



**Untersuchungen zur Membranfluidität als regulatorisches
Element der APP-Prozessierung**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

Vorgelegt im
Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von Diplom-Biochemikerin
Imke Peters
aus Bad Schwalbach

Frankfurt am Main 2007

1. Einleitung	7
1.1. Alzheimer Demenz	7
1.1.1. Die Erforschung der Erkrankung von 1907-2007.....	7
1.1.2. Diagnose.....	9
1.1.3. Epidemiologie.....	10
1.1.4. Ätiologie.....	10
1.1.5. Risikofaktoren.....	11
1.1.5.1. Die sporadische Form der Alzheimer Demenz.....	11
1.1.5.2. Die familiäre Form der Alzheimer Demenz.....	13
1.1.6. Neuropathologie.....	15
1.1.6.1. Senile Plaques.....	16
1.1.6.2. Neurofibrilläre Bündel.....	16
1.1.6.3. Abeta vs. Tau – Hypothesen zur Krankheitsinitiierung.....	17
1.2. APP Prozessierung	19
1.2.1. Das Amyloid Precursor Protein (APP).....	19
1.2.2. Die α -Sekretase.....	22
1.2.3. Die β -Sekretase.....	24
1.2.4. Die γ -Sekretase.....	27
1.2.5. Abeta Peptide.....	30
1.3. Cholesterin - ein weiterer Stein im Puzzle der Alzheimer Demenz	36
1.3.1. Biosynthese.....	36
1.3.2. Cholesterinmetabolismus.....	38
1.3.2.1. Cholesterinmetabolismus in der Körper-Peripherie.....	38
1.3.2.2. Cholesterinmetabolismus im ZNS.....	42
1.3.3. Cholesterin und die Alzheimer Demenz.....	43
1.3.3.1. Statine.....	46
1.3.3.2. Selektive Inhibitoren der Cholesterin- und Isoprenoidsynthese.....	49
1.4. Membranen – zentraler Schauplatz der Alzheimer-Pathogenese	51
1.4.1. Aufbau.....	51
1.4.2. Membranfluidität.....	53
1.4.3. Modulatoren der Membranfluidität.....	55
1.4.4. Lipid Rafts.....	57
1.4.5. Membranalterung.....	60
1.4.6. Lipid Rafts und APP-Prozessierung.....	60
1.5. Zielsetzung der Arbeit	64

2. Materialien	66
2.1. Allgemeine Chemikalien	66
2.2. Geräte und Materialien	68
2.3. Kits	69
2.4. Antikörper.....	69
2.4.1. Primärantikörper	69
2.4.2. Sekundärantikörper	69
2.5. Lösungen und Puffer	70
2.5.1. Puffer	70
2.5.2. Allgemeine Lösungen.....	71
2.5.3. Lösungen für die Cholesterin-Bestimmung	71
2.5.4. Lösungen für die Western Blot-Analyse	72
2.5.5. Lösungen für den MTT-Assay	72
2.5.6. Lösungen für die Fluoreszenz-Aktivitätsmessungen.....	73
2.6. Zellkultur-Medien.....	74
3. Methoden.....	75
3.1. Zellkultur.....	75
3.1.1. Passagieren	75
3.1.2. Einfrieren	75
3.1.3. Auftauen	75
3.1.4. Bestimmung der Zellzahl	76
3.2. Inkubationsprotokolle.....	76
3.2.1. Lovastatin	76
3.2.2. Selektive Inhibitoren der Cholesterin- und Isoprenoidbiosynthese.....	77
3.2.3. Benzyl Alkohol	78
3.2.4. Pluronic F68	78
3.2.5. γ -Sekretase Inhibitor DAPT	79
3.2.6. Amyloid-Beta Peptide	79
3.2.6.1. Fibrillen-Aggregation	79
3.2.6.2. Oligomerisierung	80
3.2.7. Cholera Toxin Subunit B.....	80
3.3. Biochemische Charakterisierung der Zell-Proben	81
3.3.1. Präparation des Zellhomogenats	81
3.3.2. Präparation des Kulturmediums.....	81
3.3.3. Proteinbestimmung nach Lowry	82

3.3.4. Fluoreszenzspektroskopischer Aktivitätsnachweis von GGTi 286 und FTi 277	83
3.3.5. Zell-Viabilität Assays	85
3.3.5.1. MTT-Assay	85
3.3.5.2. ToxiLight-Assay	87
3.3.6. Cholesterinbestimmung	88
3.3.6.1. Freies Cholesterin	88
3.3.6.2. Gesamtcholesterin	90
3.3.7. Western Blot-Analyse	91
3.3.7.1. Probenvorbereitung	91
3.3.7.2. Gelelektrophorese und Transfer	92
3.3.7.3. Blot-Entwicklung	93
3.3.8. Detektion von sezerniertem A β (1-42) und A β (1-40)	94
3.3.9. Detektion von endogenem A β (1-42)	94
3.3.10. Isolation der Plasmamembran	95
3.4. Membranfluiditätsmessungen	97
3.4.1. Grundlagen der Fluoreszenz-Polarisationsspektroskopie	97
3.4.2. Messapparatur	99
3.4.3. Verwendete Fluoreszenzsonden	100
3.4.4. Messdurchführung	101
3.4.5. Fluoreszenzmessungen mit Pyren	102
3.5. Fluoreszenzfärbungen	105
3.5.1. Filipin	106
3.5.2. GM-1	107
3.5.3. Fluo-A β (1-40)	107
4. Ergebnisse	108
4.1. Lovastatin-Effekte in SY5Y-APPwt und HEK293-APPwt Zellen	108
4.1.1. Zell-Viabilität	108
4.1.2. Cholesterinbestimmung	110
4.1.3. Sekretion von Abeta	111
4.1.4. BACE-Aktivität	113
4.2. Pleiotrope und Cholesterin-abhängige Statin-Effekte	114
4.2.1. Inhibition der Isoprenylierungen durch GGTi 286 und FTi 277	115
4.2.1.1. Zell-Viabilität	116
4.2.1.2. Enzymkinetik	117
4.2.1.3. Cholesterinbestimmung	118
4.2.1.4. Sekretion von Abeta ₍₁₋₄₀₎	120
4.2.1.5. BACE-Aktivität	121

4.2.2. Selektive Inhibition der Cholesterinbiosynthese	122
4.2.2.1. Zell-Viabilität.....	123
4.2.2.2. Cholesterinbestimmung.....	124
4.2.2.3. Sekretion von Abeta ₍₁₋₄₀₎	126
4.2.2.4. BACE-Aktivität	128
4.2.2.5. Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse	129
4.3. Modulation der Membranfluidität.....	129
4.3.1. Lovastatin	130
4.3.1.1. Anisotropiemessungen an intakten Zellen	130
4.3.1.2. Korrelation	131
4.3.1.3. Western Blot Analyse der APP-Prozessierung.....	132
4.3.2. Studien mit dem Membranfluidizer Benzyl Alkohol	135
4.3.2.1. Zell-Viabilität.....	136
4.3.2.2. Anisotropiemessungen an isolierten Membranen.....	137
4.3.2.3. Pyren-Fluoreszenzmessungen an isolierten Membranen	137
4.3.2.4. Anisotropiemessungen an intakten Zellen	138
4.3.2.5. Sekretion von Abeta	139
4.3.2.6. Korrelation	141
4.3.2.7. Western Blot Analyse der APP-Prozessierung.....	142
4.3.2.8. Cholesterinbestimmung.....	145
4.3.2.9. BACE-Aktivität	146
4.3.3. Studien mit dem Membranrigidizer Pluronic F68	147
4.3.3.1. Zell-Viabilität.....	148
4.3.3.2. Anisotropiemessungen an isolierten Membranen.....	149
4.3.3.3. Pyren-Fluoreszenzmessungen an isolierten Membranen	150
4.3.3.4. Anisotropiemessungen an intakten Zellen	151
4.3.3.5. Sekretion von Abeta	151
4.3.3.6. Korrelation	153
4.3.3.7. Western Blot Analyse.....	154
4.3.3.8. Cholesterinbestimmung.....	157
4.3.3.9. BACE-Aktivität	158
4.3.3.10. Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse	159
4.4. Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Lipid Raft Integrität.....	160
4.5. Einfluss von Abeta auf Membraneigenschaften und APP-Prozessierung	163
4.5.1. Fibrilläres Abeta ₍₁₋₄₂₎	163
4.5.1.1. Zell-Viabilität.....	163
4.5.1.2. Anisotropiemessungen an intakten Zellen	164
4.5.1.3. Sekretion von Abeta	165

4.5.2. Fibrilläres Abeta ₍₁₋₄₀₎	166
4.5.2.1. Zell-Viabilität.....	166
4.5.2.2. Anisotropiemessungen an intakten Zellen	167
4.5.2.3. Analyse der Abeta-Produktion.....	167
4.5.3. Oligomeres Aβ ₍₁₋₄₀₎	169
4.5.3.1. Zell-Viabilität.....	169
4.5.3.2. Anisotropiemessungen an intakten Zellen	170
4.5.3.3. Analyse der Abeta-Produktion.....	171
4.5.3.4. Korrelation	172
4.5.3.5. Western Blot Analyse.....	173
4.5.3.6. Cholesterinbestimmung.....	175
4.5.4. Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Abeta-Membran-Interaktion	176
4.6. Quervernetzung von Lipid Rafts mit Hilfe von Cholera toxin	178
4.6.1. Anisotropiemessungen an intakten Zellen	179
4.6.2. Sekretion von Abeta	180
4.6.3. Western Blot Analyse.....	181
4.7. Einfluss von basalen Unterschieden in der Abeta-Sekretion	182
4.7.1. Sekretion von Abeta	182
4.7.2. Anisotropiemessungen an intakten Zellen	183
4.7.3. Korrelation	184
4.7.4. Einfluss von fibrillärem Abeta ₍₁₋₄₂₎	185
4.8. γ-Sekretase Inhibitor DAPT	186
4.8.1. Zell-Viabilität.....	186
4.8.2. Sekretion von Abeta	187
4.8.3. Anisotropiemessungen an intakten Zellen	188
4.8.4. Kontrollexperimente mit untransfizierten HEK293 Zellen.....	189
4.8.5. Western Blot Analyse der APP-Prozessierung	190
5. Diskussion	192
5.1. Statine und APP-Prozessierung – cholesterinabhängige vs. pleiotrope Effekte	192
5.1.1. Lovastatin	193
5.1.2. Selektive Inhibition von Protein Isoprenylierungen	194
5.1.3. Selektive Inhibition der Cholesterinsynthese.....	196
5.2. Membranfluidität – ein regulatorisches Element in der APP-Prozessierung?	199
5.3. Die Rolle von Lipid Rafts in der Amyloidogenese	203
5.4. Abeta als selbstverstärkendes Produkt der amyloidogenen APP-Prozessierung	207

5.5. Analyse der Interaktion zwischen Abeta und der Membran.....	212
5.6. Abeta-Aggregation führt zur Assemblierung von Lipid Rafts	216
5.7. Neue Aspekte der Amyloid Kaskaden Hypothese	220
5.8. Membranalterung als Risikofaktor der Alzheimer Demenz.....	221
6. Zusammenfassung.....	224
7. Anhang.....	226
7.1. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	226
7.2. Literaturverzeichnis	232
7.3. Abkürzungen	253
7.4. Curriculum Vitae	254
7.5. Danksagung.....	255

1. Einleitung

1.1. Alzheimer Demenz

1.1.1. Die Erforschung der Erkrankung von 1907-2007

Als Alois Alzheimer vor 100 Jahren erstmals anhand einer Patientin die klinischen und neuropathologischen Merkmale einer progredienten Demenzform beschrieb, ahnte er sicherlich nicht, welchen Stellenwert die Erkrankung, die von nun an seinen Namen tragen sollte, im 20. Jahrhundert einnehmen würde. Seine Patientin, die damals 52-jährige Auguste Deter, litt an gravierendem Gedächtnisverlust und eingeschränkten kognitiven Fähigkeiten, sowie an Wahnvorstellungen und einer starken Sprachstörung. Nach ihrem Tod untersuchte Alzheimer das Gehirn und beschrieb auffallende histopathologische Veränderungen der Organmorphologie, die bis heute als charakteristische Merkmale der Erkrankung gelten. Die gesamte Hirnrinde wies eine massive Atrophie, sowie Plaque-artige Ablagerungen von bis dato unbekanntem Stoffwechselprodukt auf. Intrazellulär zeigte sich eine atypische Akkumulationen an fibrillären Proteinstrukturen (Alzheimer, 1907).

Die Charakterisierung der von Alzheimer beschriebenen pathologischen Merkmale sollte nach ihrer Entdeckung noch weitere acht Jahrzehnte in Anspruch nehmen. Erst Anfang der 80er Jahre konnten Amyloid-Beta (A β) Peptide als Hauptbestandteile der senilen Plaques identifiziert werden (Glennner und Wong., 1984). Die Sequenz von A β ist Teil eines Vorläuferproteins (*Amyloid Precursor Protein* = APP), das multiplen proteolytischen Spaltungen unterliegt (Kang et al., 1987). Noch bevor die prozessierenden Enzyme der A β Bildung identifiziert wurden, bezeichnete man sie als β - und γ -Sekretase. Auch die intrazellulär lokalisierten fibrillären Bündel wurden intensiv untersucht und als abnormale Zusammenlagerungen aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein beschrieben.

Die Alzheimer Demenz (AD) ist eine fortschreitende neurodegenerative Erkrankung des Gehirns, welche sich über mehrere Jahrzehnte hinziehen kann (Braak und Braak, 1996). Erste klinische Symptome sind Vergesslichkeit und eine reduzierte Konzentrations- und Leistungsfähigkeit. Im Frühstadium kommt es außerdem zu Schwierigkeiten bei der Wortfindung und zu Problemen mit dem Zeitgefühl. Die kognitiven Defizite verschlimmern sich im Laufe der Erkrankung, so dass schließlich auch der Orientierungssinn und die Urteilsfähigkeit gestört werden. Im Zuge der Veränderungen kommt es bei den meisten Patienten, bzw. deren Angehörigen zu der bewussten Wahrnehmung einer krankhaften Störung, so dass in diesem Stadium die meisten Diagnosen gestellt werden. Im mittleren Stadium der Demenz verschlimmern sich die kognitiven Ausfälle, die mit Wahrnehmungsstörungen, Stimmungsschwankungen und einem reduzierten Tag-Nacht-Gefühl einhergehen. Die Patienten können jedoch ihren Alltag mit Unterstützung noch selbst bewältigen, auch wenn aufgrund der zunehmenden Vergesslichkeit verstärkt Schwierigkeiten bei alltäglichen Verrichtungen auftreten. Im fortgeschrittenen Stadium leiden die Patienten zunehmend unter Kontrollverlust. Neue Informationen können nicht mehr gespeichert werden, Angehörige werden oft nicht mehr erkannt. Einhergehend kommt es zu Wesensveränderungen, die sich durch Passivität oder aber aggressives Verhalten äußern. Auch die Körperhaltung verändert sich. Typisch ist ein schleppender und kleinschrittiger Gang mit vorgeneigtem Oberkörper. Die Patienten sind vollkommen auf externe Hilfe angewiesen, so dass in den meisten Fällen eine Heimeinweisung notwendig ist. Das Endstadium der Alzheimer Demenz ist durch massiven physischen und psychischen Verfall gekennzeichnet. Todesursache der körperlich geschwächten Patienten sind meist Sekundärerkrankungen wie Pneumonie (Yaari und Corey-Bloom, 2007; Deutsche Alzheimer Gesellschaft; Alzheimerinfo).

Die durchschnittliche Lebenserwartung nach der Diagnose beträgt je nach Alter, Geschlecht und Grad des Verfalls zwischen 2,3 und 5,7 Jahren (Bracco et al., 1994). Anfang der 70er Jahre wurden die Symptome der Erkrankung unter dem Begriff der Alzheimer Demenz zusammengefasst und gegenüber der vaskulären Demenz als eigenständiges Krankheitsbild abgegrenzt (Kurz et al., 1995).

1.1.2. Diagnose

Die eindeutige klinische Diagnose der Alzheimer Demenz am Patienten ist zwar bis heute noch immer mit Unsicherheiten behaftet, kann aber trotzdem meistens gestellt werden. Kriterien zur Beurteilung von Verdachtsfällen wurden vom „*National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke*“, sowie von der „*Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*“ entwickelt (NINCDS-ADRDA-Kriterien; McKhann et al., 1984). Zusätzlich können progrediente Atrophien bestimmter Hirnregion mit Hilfe bildgebender Verfahren wie der Magnetresonanztomographie (MRT), der Positronenemissionstomographie (PET) oder der *single-photon-emission-Computertomographie* nachgewiesen werden (Herholz, 1995; Scheltens, 1999). Die Validierung von Bio-Markern in der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) unterliegt ebenfalls intensiver Forschungsarbeit (Motter et al., 1995; Blennow und Vanmechelen, 1998). Vor allem CSF-Abeta, als Marker des Amyloidmetabolismus, aber auch die Menge an Gesamt-CSF-Tau und phosphoryliertem CSF-Tau werden untersucht (Andreasen et al., 2003). Die endgültige Diagnose kann jedoch nach wie vor erst postmortem durch die histopathologische Untersuchung des Gehirns gestellt werden.



Abbildung 1 Morphologie eines gesunden Gehirns (linke Seite) und eines AD-Gehirns (rechte Seite)

1.1.3. Epidemiologie

Heute leiden rund 1,2 Millionen Menschen in Deutschland an der Alzheimer Demenz. Weltweit beträgt die Zahl der Erkrankten um die 12 Millionen, von denen ein Großteil bereits das 4. Lebensquartal erreicht hat und nicht mehr in der Lage ist, sich selbst zu versorgen. Epidemiologische Studien zeigen einen engen Zusammenhang zwischen fortschreitendem Lebensalter und dem Erkrankungsrisiko. Die altersbedingte Prävalenzrate steigt dabei zwischen dem 65. und 85. Lebensjahr um den Faktor 100, so dass sich das Risiko einer Erkrankung ab diesem Alter alle fünf Jahre verdoppelt (Cooper und Bickel, 1989). Aufgrund der steigenden Lebenserwartung in den Industrienationen wurde in den letzten Jahrzehnten ein beständiger Zuwachs an Neuerkrankungen verzeichnet. Statistische Hochrechnungen lassen befürchten, dass im Jahre 2050 weltweit bis zu 45 Millionen Menschen an AD leiden werden, mit allen sozio-ökonomischen Konsequenzen.

1.1.4. Ätiologie

Auch wenn die genauen Ursachen für das Auftreten der Erkrankung bislang nicht geklärt sind, zeichnen sich Risikogruppen und -Faktoren ab, die in Zusammenhang mit dem Ausbruch der Krankheit gebracht werden können. Prinzipiell unterscheidet man die sporadische und die familiäre Form der Alzheimer Demenz. Der Begriff sporadisch bedeutet hierbei, dass bislang keine genetischen Defekte identifiziert werden konnten, die mit dem Ausbrechen der Krankheit assoziiert sind.

1.1.5. Risikofaktoren

1.1.5.1. Die sporadische Form der Alzheimer Demenz

Circa 90% aller Erkrankten leiden an der sporadischen Form, deren größter Risikofaktor ein fortgeschrittenes Lebensalter ist (Gao et al., 1998; Jorm und Jolly, 1998). Unklar ist jedoch, welche biologischen Mechanismen im Zuge des Alterns die Entstehung einer Demenz initiieren. Alterungsprozesse im Gehirn führen zu komplexen Veränderungen der Organphysiologie, die kausal mit der Entstehung einer Demenz verknüpft sein könnten. Diskutiert wird die Abnahme an antioxidativer Kapazität (Vohra et al., 2001; Sandhu und Kaur, 2002), sowie Änderungen in der Membranzusammensetzung (Grange-Midroit et al., 2002; Clayton et al., 2002). Auch die physikalisch-chemischen Eigenschaften von Membranen unterliegen alterungsbedingten Veränderungen. Unter anderem kommt es zu einer fortschreitenden Abnahme der Membranfluidität, die in direktem Zusammenhang mit der Aktivität und Funktionalität von membranassoziierten Proteinen steht (Eckert et al., 2001). Aufgrund des geringen Lipid-Stoffwechsels von neuronalen Membranen ist das Gehirn in besonders ausgeprägtem Maße von diesem Alterungsprozess betroffen (Igbavboa et al., 2001).

Zusätzlich gibt es Hinweise auf ein erhöhtes, altersunabhängiges Erkrankungsrisiko nach Schädel-Hirntraumata, sowie bei Hypothyreose, Hypercholesterinämie und Östrogenmangel (Dosunmu et al., 2007; Tang et al., 1996; Turner et al., 2001, 2006). Ebenso scheinen kalorien- und fettreiche Ernährungsgewohnheiten den Ausbruch einer Demenz zu begünstigen (Dosunmu et al., 2007). Studien belegen weiterhin einen protektiven Effekt von mehrfach ungesättigten Fettsäuren in der Nahrung (Kalmijn et al., 1997; Friedland, 2002), was in Übereinstimmung mit dem Befund steht, dass die Alzheimer Prävalenz in Ländern mit hohem Fischkonsum wie z.B. Japan im weltweiten Vergleich geringer ist (Yamada et al., 2002).

Auch für die sporadisch auftretende Form der Alzheimer Demenz zeichnen sich bestimmte Gene als Risikofaktoren ab, wobei hier keine Mutationen, sondern erblich bedingte Ausprägungen von Isoformen das Risiko einer Erkrankung erhöhen. Besonders in den Vordergrund tritt in diesem Zusammenhang das Apolipoprotein E (ApoE)-kodierende Gen auf Chromosom 19 (Saunders et al., 1993). ApoE stellt einen wichtigen Bestandteil der *low density* Lipoproteine dar und beeinflusst den Lipidtransport im Gehirn und in der Peripherie (Stryer, 2000). Es existieren drei Isoformen des Proteins (ApoE2, E3 und E4), die durch drei verschiedene Allele kodiert werden ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ und $\epsilon 4$) und sich an zwei Stellen in ihrer Aminosäuresequenz unterscheiden. Daraus resultiert eine unterschiedliche Anzahl an Cystein-Resten in den Isoformen, wobei $\epsilon 2$ zwei Cysteine, $\epsilon 3$ eines und $\epsilon 4$ kein Cystein aufweist (Voet, 2000). Genetische Analysen belegen, dass homozygote Träger des $\epsilon 4$ -Allels ein erhöhtes Risiko aufweisen, an Alzheimer Demenz zu erkranken (Corder et al., 1993; Saunders et al., 1993).

Eine genaue mechanistische Begründung ist bislang nicht bekannt. Die erhöhte Plaque-Dichte in $\epsilon 4$ -Trägern deutet jedoch darauf hin, dass das Allel zu einer verstärkten Abeta-Bildung/-Aggregation oder aber zu einem reduzierten Abbau des Peptids führt (Schmechel et al., 1993). In (APP / ApoE4^{-/-}) transgenen Mäusen konnte eine verminderte Aggregation von Abeta beobachtet werden, während es in ApoE4^{+/+} *knockin*-Mäusen zu einem signifikanten Anstieg an Abeta Ablagerungen kam (Bales et al., 1997). Die Daten deuten darauf hin, dass ApoE4 möglicherweise als Chaperon der Abeta Aggregation dient.

Neben der direkten Interaktion mit Abeta wird auch die ApoE4-induzierte Anreicherung von Cholesterin als potentieller Faktor für eine verstärkte amyloidogene Prozessierung diskutiert (Sing et al., 1985; Michikawa et al., 2000). Träger der ApoE4-Isoform weisen höhere LDL- und Gesamtcholesterinspiegel auf als Individuen mit ApoE2 oder ApoE3 (Sing et al., 1985, Rapp et al., 2006). In anderen Arbeiten wird spekuliert, dass ApoE4 unabhängig vom Amyloidmetabolismus selbst einen pathogenen Faktor in der Alzheimer Demenz darstellt (Crutcher et al., 2004). Neurotoxische Effekte sind dabei vor allem auf die ApoE4-induzierte Schädigung mitochondrialer Funktionen und dem daraus resultierenden Anstieg an oxidativem Stress zurückzuführen (Gibson et al., 2000; Chang et al., 2005; Mahley et al., 2006).

1.1.5.2. Die familiäre Form der Alzheimer Demenz

Der familiären Form der Alzheimer Demenz (FAD) liegen genetische Defekte zugrunde, die bereits in jungen Jahren den Ausbruch der Krankheit initiieren (Rocchi et al., 2003). Die FAD wird autosomal dominant vererbt (Standridge et al., 2006). Insgesamt sind zurzeit drei Gene bekannt, die in kausalem Zusammenhang mit einer frühen Ausprägung der Demenz stehen (Rocchi et al., 2003). Definitionsgemäß bedeutet ein früher Beginn der Erkrankung, dass deutliche Symptome vor Beginn des 65. Lebensjahrs auftreten (Rocchi et al., 2003).

Der erste pathologisch relevante Genort, dessen Mutation direkt mit der Alzheimer Demenz assoziiert wurde, war der des auf Chromosom 21 lokalisierten Amyloid Precursor Proteins (APP) (Turner, 2006). Zurzeit sind 16 Mutationen des Gens beschrieben, von denen jedoch nicht alle direkten Einfluss auf die Entstehung der Demenz nehmen (Rocchi et al., 2003).

Die Alzheimer-assoziierten Mutationen befinden sich im Bereich der für die Prozessierung relevanten Sekretase-Schnittstellen und führen zu einer gesteigerten Bildung von Abeta (s.1.2; Turner, 2006). Ist die Prozessierung der β -Sekretase betroffen, kommt es zu einer verstärkten Gesamtproduktion von Abeta₍₁₋₄₀₎ und Abeta₍₁₋₄₂₎, wohingegen Mutationen im Bereich der γ -Sekretase Schnittstelle eine Verschiebung der Ratio beider Fragmente zugunsten von Abeta₍₁₋₄₂₎ bewirken (Rocchi et al., 2003). Mutationen in der Kernregion der Abeta Sequenz führen zu Isoformen, die eine stark erhöhte Aggregationstendenz aufweisen (Abbildung 2; Turner, 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde mit der „schwedischen Mutation“ von APP gearbeitet. Die Doppelmutation (K670N/M671L) wurde erstmals in zwei großen schwedischen Familien identifiziert, deren Mitglieder durchschnittlich im Alter von 50 Jahren an der Alzheimer Demenz erkrankten (Rocchi et al., 2003). Die Mutation begünstigt die amyloidogene Prozessierung von APP durch die β -Sekretase (Haass et al., 1995) und führt so zu einer massiv erhöhten Gesamtproduktion von Abeta (Citron et al., 1992; Cai et al., 1993).

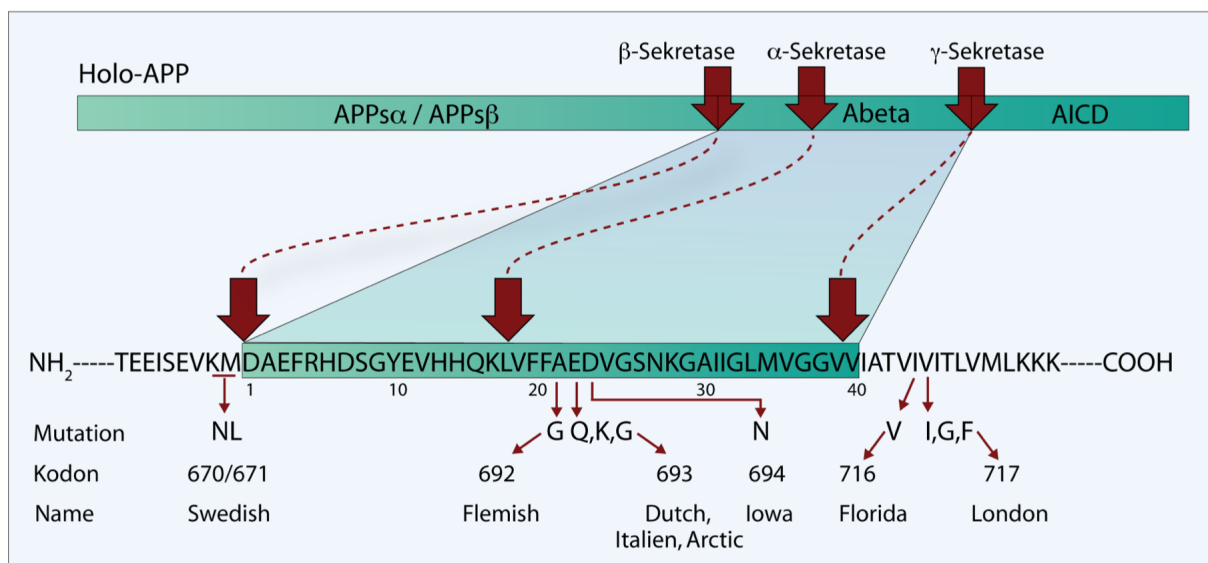


Abbildung 2 AD-relevante Mutationen in der APP-Sequenz; die Kodonnummerierung bezieht sich auf das Gesamtgen

Die anderen beiden Genorte betreffen das Presenilin-1 auf Chromosom 14 und das Presenilin-2 auf Chromosom 1. Bislang konnten 136 Präsenilin-1 und 10 Präsenilin-2 Mutationen identifiziert werden. Anders als die „schwedische Mutation“ von APP führen Defekte dieser beiden Genorte zu einer selektiven Steigerung der $A\beta_{(1-42)}$ Produktion (Rocchi et al., 2003; Turner, 2006).

1.1.6. Neuropathologie

Als pathologische Hauptmerkmale in der postmortem Diagnose einer Alzheimer Demenz gelten nach wie vor die, von Alois Alzheimer erstmals beobachteten parenchymatisch abgelagerten senilen Plaques (Selkoe, 1994; Yamagushi et al. 1988; Abbildung 3) sowie intrazelluläre neurofibrilläre Bündel (Braak et al., 1996; Dickson, 1997; Abbildung 3). Neben den senilen Plaques kommt es zur Akkumulation von löslichen $A\beta$ Monomere und oligomere Strukturen. Die Neuropathologie der Alzheimer Demenz verläuft anatomisch stereotyp. Die ersten betroffenen Hirnareale sind der entorhinale Kortex und der Hippocampus, gefolgt von limbischen Strukturen und dem Neokortex (Braak und Braak, 1991; Turner, 2006). Noch zu Lebzeiten der Patienten kann über bildgebende Verfahren ein zunehmender Verlust synaptischer Funktionen, sowie eine massive Neuronenatropie im Hippocampus und im gesamten Kortex beobachtet werden (Terry et al., 1991).

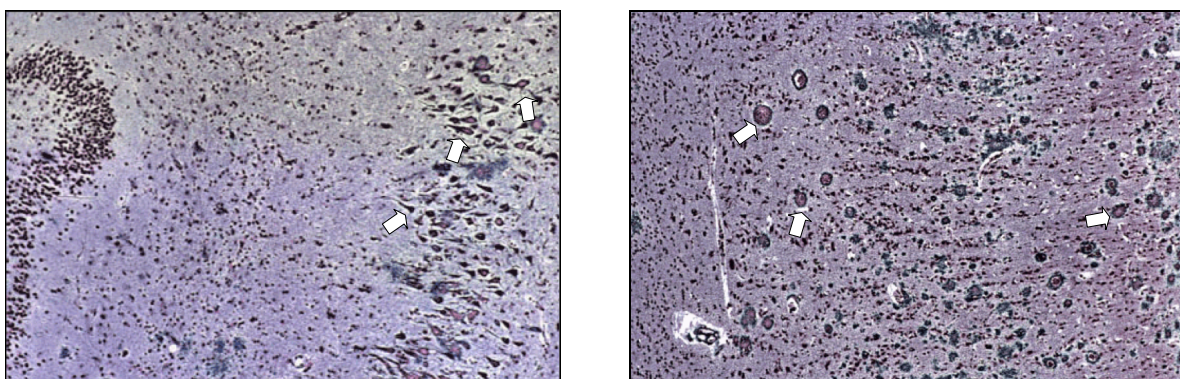


Abbildung 3 Neurofibrilläre Bündel (linke Seite) und senile Plaques (rechte Seite)

1.1.6.1. Senile Plaques

Die 5-200µm großen extrazellulär abgelagerten Plaques können als Agglomerate aus diversen Proteinen und Lipiden beschrieben werden. Mitte der 80er Jahre wurde das Amyloid-Beta Peptid (Abeta) als Hauptbestandteil der Kernregion von senilen Plaques identifiziert (Glennner und Wong, 1984; Masters et al., 1985). Das 4kDa große Peptid tritt in mehreren Fragmenten von 39-42 Aminosäuren auf und liegt innerhalb der Plaques in aggregierter Form vor. Abeta Peptide entstehen durch proteolytische Prozessierung des membranständigen Vorläuferproteins APP (*amyloid precursor protein*) und werden größtenteils in den Extrazellularraum sezerniert. Der Befund, dass Plaques häufig mit dystrophisch veränderten Neuronen und aktivierten Mikroglia assoziiert vorliegen, führte zu dem Schluss, dass die Peptidformationen maßgeblich an der Auslösung der Erkrankung beteiligt sind (Hardy und Higgins, 1992; Selkoe, 1999).

1.1.6.2. Neurofibrilläre Bündel

Die intrazellulär auftretenden neurofibrillären Bündel bestehen aus hyperphosphorylierten Tau-Proteinen, die sich zu „paarig-helikalen Filamenten“ (PHF) zusammenlagern. Tau-Proteine stabilisieren unter physiologischen Bedingungen Mikrotubuli und sind somit an intrazellulären Transportvorgängen beteiligt (Drubin et al., 1986). Die pathologische Hyperphosphorylierung führt dazu, dass die Proteine nicht mehr mit den Mikrotubuli assoziieren, was Störungen im Transportsystem zur Folge hat. In neuronalen Zellen ist dabei vor allem der axonale Transport betroffen. Die Akkumulation der hyperphosphorylierten Tau-Proteine führt schließlich zur Degeneration der Neuronen (Garcia und Cleveland, 2001).

1.1.6.3. Abeta vs. Tau – Hypothesen zur Krankheitsinitiierung

Das parallele Auftreten von zwei gravierenden Veränderungen der Zellphysiologie legt die Vermutung eines kausalen Zusammenhangs nahe. Daraus ergibt sich die Frage, ob es sich um eine Ursache-Wirkungsbeziehung handelt, oder ob beide pathologisch veränderten Prozesse unabhängig voneinander initiiert werden. Eine Reihe von experimentellen Befunden führte zur Formulierung der Amyloid-Kaskaden Hypothese, die besagt, dass die Akkumulation von Abeta-Aggregaten der Auslöser der Alzheimer Demenz ist, in deren kausaler Folge es zu neurotoxischen Effekten, synaptischen Dysfunktionen und dem forcierten Untergang von Neuronenpopulationen kommt (Abbildung 4). Fakten, die für die Hypothese sprechen sind die beobachtete Kollokalisierung von Abeta-Aggregaten und dystrophen Neuronen, sowie die identifizierten Genorte, die in Zusammenhang mit der familiären Form der Alzheimer Demenz (FAD) stehen und sich einheitlich auf die APP-Prozessierung beziehen. Des Weiteren weisen die FAD-assoziierten Abeta-Isoformen eine höhere Aggregationstendenz auf. Die Überproduktion von APP im transgenen Mausmodell oder die Überproduktion von Abeta in Folge einer verstärkten APP-Prozessierung führen zur Ausbildung eines AD-Phänotyps. Patienten mit Trisomie 21 (Down Syndrom) tragen eine zusätzliche Kopie des APP-Gens und entwickeln bereits ab dem 40. Lebensjahr neuropathologische Charakteristika der Alzheimer Demenz (Evenhuis, 1990).

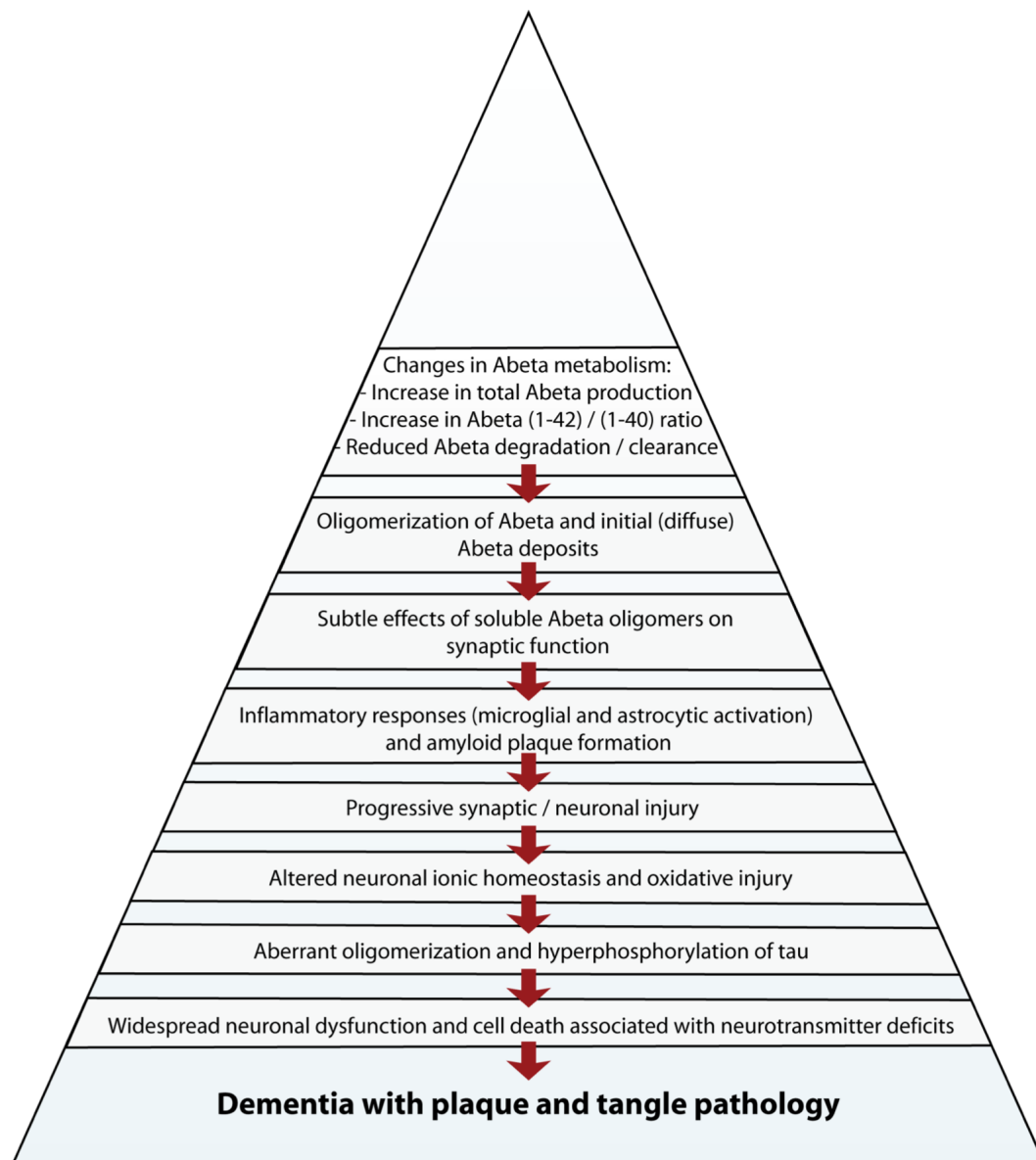


Abbildung 4 Amyloid Kaskaden Hypothese (modifiziert nach Haass und Selkoe, 2006)

Mutationen im Bereich der Tau-Proteine hingegen führen zwar zur Ausbildung einer frontotemporalen Demenz mit Parkinson-Symptomatik, ohne jedoch die pathologischen Merkmale der Alzheimer Demenz zu induzieren. Außerdem ist das Auftreten von neurofibrillären Bündeln im Gegensatz zur Plaquetbildung nicht in allen Fällen von AD nachweisbar. Vielmehr scheint es so, dass die Formation von Abeta-Aggregaten erst die Bildung von neurofibrillären Bündeln einleitet (Hardy und Selkoe, 2006).

1.2. APP Prozessierung

1.2.1. Das Amyloid Precursor Protein (APP)

Das Amyloid Precursor Protein zählt zu einer heterologen Familie von Typ I-Transmembranproteinen mit einem Molekulargewicht von 110-140kDa (reviewed in Mattson et al., 1997). Der N-Terminus ragt mit fast 90% der Proteinmasse in den Extrazellularraum, während der C-Terminus im Zytoplasma lokalisiert ist (reviewed in Turner et al., 2003; Reinhard et al., 2005). Die Heterogenität der Proteinfamilie resultiert aus posttranslationalen Modifikationen wie N- und O-Glykosylierungen, sowie Tyrosin-Sulfatierungen und alternativen Splice-Varianten (Weidemann et al., 1989). Die drei bekannten Isoformen setzen sich aus 695, 751 und 770 Aminosäuren zusammen, wobei die beiden 700er Formen ubiquitär in neuronalen und nicht-neuronalen Zellen exprimiert werden, während die 695er Isoform verstärkt in Neuronen zu finden ist (Neve et al., 1988; Haass et al., 1994). Das neuronale APP695 unterscheidet sich von den längeren Isoformen vor allem durch das Fehlen einer Kunitz-Typ Proteaseinhibitor (KPI) Sequenz (Tanzi et al., 1988; Tanaka et al., 1988). Die KPI-Domäne scheint eine unabhängige Faltungseinheit darzustellen und wirkt als Ligand der LDL-Rezeptor Proteine (LRP), so dass die beiden nicht-neuronalen APP-Isoformen via Bindung an den Rezeptor internalisiert werden können (Kounnas et al., 1995).

Alle APP-Isoformen sind in der Zellmembran und deren endozytotischen Einschlüssen, sowie in den Membranen von endoplasmatischem Retikulum (ER), trans-Golgi Netzwerk (TGN) und den Mitochondrien lokalisiert (Selkoe et al., 1996; Hartmann et al., 1997; Anandatheerthavarada et al., 2003). Das Protein wurde sowohl in Assoziation mit Lipid Raft Strukturen, als auch in Membranregionen außerhalb der Raft-Domänen gefunden (Ehehalt et al., 2003; Abad-Rodriguez et al., 2004).

APP kann auf zwei alternativen Wegen prozessiert werden (reviewed in Mattson et al., 1997). Die proteolytische Spaltung wird von drei unabhängigen membranständigen Sekretasen katalysiert (Turner et al., 2003). Während die amyloidogene Prozessierung durch β - und γ -Sekretase zur Freisetzung von Abeta führt, verhindert die Spaltung durch die α -Sekretase die Abeta-Bildung (Abbildung 5; Mattson et al., 1997). Beide Prozessierungswege führen zur Freisetzung eines N-terminalen löslichen Rests (APPs α bzw. APPs β) und einem membranständigen C-terminalen Fragment (CTF α : C83 bzw. CTF β : C99), welches das Substrat für die γ -Sekretase darstellt (Turner et al., 2003).

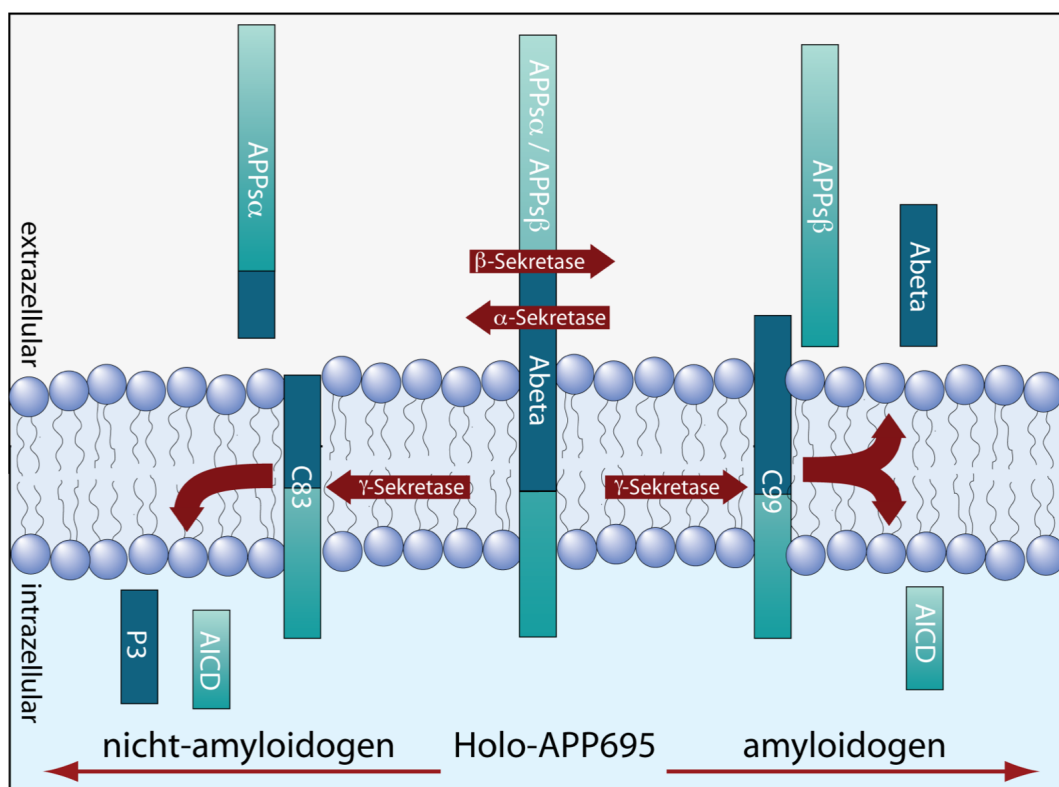


Abbildung 5 Prozessierung des Amyloid Precursor Proteins

Die physiologische Funktion von APP und seinen Fragmenten ist bislang weitestgehend ungeklärt. Strukturell scheint die extrazelluläre Sequenz eine Aneinanderreihung von mehreren individuellen Domänen mit eigenständigen Faltungseinheiten. Bislang liegt keine Kristallstruktur des Holo-Proteins vor. Einzelne Einheiten konnten jedoch in den letzten Jahren sequentiell und strukturell charakterisiert werden (reviewed in Reinhard et al., 2005; Gralle und Ferreira, 2007; Abbildung 6). Die N-terminale Sequenz E1 setzt sich aus einer Heparin-Bindungsdomäne (HBD-1) und einer Kupfer-Bindungsdomäne (CuBD) zusammen. Daran schließt sich eine saure Linker-Region an, die den Übergang zur Kohlenhydrateinheit bildet, in der die beiden N-Glykosylierungsstellen liegen. Die Einheit besteht aus einer zweiten Heparin-Bindungsdomäne (HBD-2) und einer Kollagen-Bindungsdomäne. Beide Domänen liegen innerhalb der zentralen APP Domäne (CAPPD/E2). HBD-2 weist im Vergleich zu HBD-1 eine wesentliche stärkere Bindungsaffinität auf. Eine weitere Linker-Region mit undefinierter Sekundärstruktur verbindet die CAPPD mit dem N-terminalen Ende der Abeta-Sequenz (Multhaup et al., 2006; Reinhard et al., 2005; Gralle et al., 2007). Der N-Terminus der Abeta Region ist somit noch Teil der Ektodomäne während der C-terminale Abschnitt der Sequenz bereits in der Transmembrandomäne von APP lokalisiert ist. Die C-terminale, zytosolische Sequenz von APP wird als APP-intrazelluläre Domäne (AICD) bezeichnet (Mattson et al., 1997, siehe 1.2.4.).

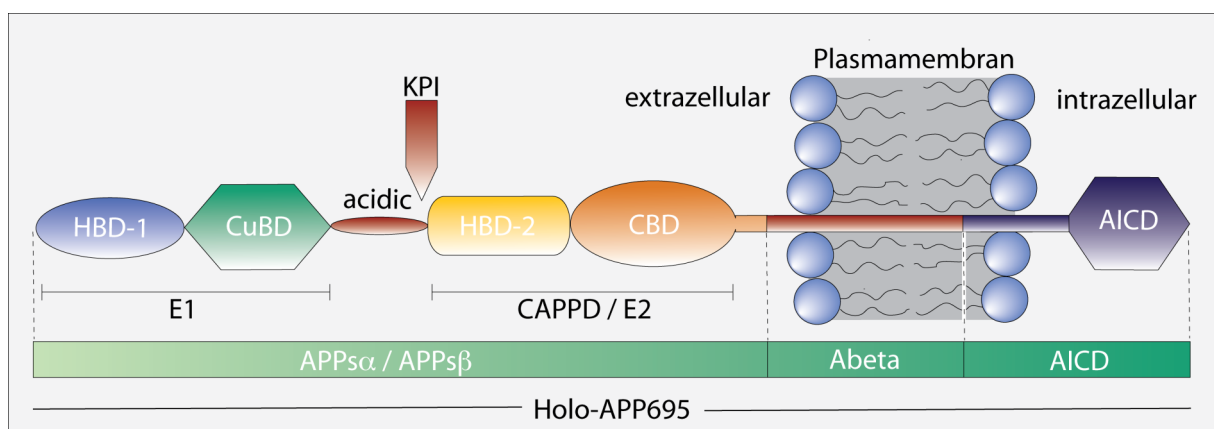


Abbildung 6 Domänenstruktur des Amyloid Precursor Proteins

Etliche Interaktions- und Bindungspartner konnten identifiziert werden, unter anderem G₀, ein membranständiges G-Protein, das in die extrazelluläre Signaltransduktion involviert ist und Kinesin I, welches für axonale Transport Prozesse verantwortlich ist (Kamal et al., 2000, 2001; Matsuda et al., 2003; Lazarov et al., 2005). Auch Proteine wie Calreticulin und Clathrin, die für Proteinreifung und endozytotische Prozesse notwendig sind, scheinen mit dem membranständigen APP Holo-Protein zu interagieren (reviewed in Mattson et al., 1997; Turner et al., 2003). *Knockout*-Experimente deuten zusätzlich auf Funktionen im Bereich des Neuritenwachstums und der Synaptogenese hin (Small et al., 1999). Alle postulierten Funktionen und Prozesse bedürfen einer hoch organisierten Zell-Zell- bzw. Zell-Substrat-Interaktion, zu der APP potentiell beiträgt (Gralle et al., 2007). Der rasche *turnover* des Proteins von 30-90 Minuten erschwert die Untersuchungen *in vivo* und ließ zudem Spekulationen über eine mögliche regulatorische Rolle aufkommen (Turner et al., 2003). Mit Hilfe von *fluorescence resonance energy transfer* (FRET) konnte gezeigt werden, dass APP in der Zelle Homodimere ausbildet (Soba et al., 2005). Weiterführende Experimente deuten darauf hin, dass die Dimerisierung zusätzlich Einfluss auf die Funktion und/oder die Prozessierung hat (Multhaup et al., 2006). Zusammengenommen scheint APP selbst in eine Reihe von zellulären Prozessen einzugreifen und zusätzlich die Fragmente zu stellen, die ihrerseits eigenständige Funktionen übernehmen (Reinhard et al., 2005; Gralle et al., 2007).

1.2.2. Die α -Sekretase

Die Schnittstelle der α -Sekretase ist dicht an der Transmembrandomäne zwischen Lys687 und Leu688 und somit innerhalb der kritischen Abeta-Sequenz lokalisiert (Abbildung 2). In den letzten Jahren wurden einige membranständige Proteinfamilien als Kandidaten für die enzymatische Aktivität der α -Sekretase beschrieben. Besonders zwei Mitglieder der Adamalysin (ADAM)-Familie, die Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17, scheinen für die nicht-amyloidogene APP-Prozessierung verantwortlich zu sein (Lammich et al., 1999; Asai et al., 2003; reviewed in Allinson et al., 2003).

Letztere ist auch als *tumor necrosis factor α converting enzyme* = TACE bekannt. TACE *knockout*-Mäuse weisen deutliche Defizite in der Sekretion von APP α auf (Buxbaum et al., 1998a). Das gleiche gilt für ADAM10, wobei die inaktive Form des Enzyms zusätzlich zu einer erhöhten Anzahl von signifikant vergrößerten senilen Plaques führt (Postina et al., 2004).

Der größte Teil der APP-Population unterliegt der Prozessierung durch die α -Sekretase in der Zellmembran (Turner et al., 2003). Dem resultierenden löslichen Fragment APP α konnten neurotrophe und neuroprotektive Eigenschaften nachgewiesen werden (Small et al., 1994; Furukawa et al., 1996). In neuronalen und nicht-neuronalen Zellen wirkt APP α als Proliferationsfaktor (Pietrzik et al., 1998; Saitoh et al., 1989; Caille et al., 2004). Neben der gesteigerten Proliferationsrate kam es in neuronalen Zellen zusätzlich zu einem erhöhten Neuritenwachstum (Milward et al., 1992). Wie APP selbst unterliegt auch APP α in der perinatalen Phase axonalem Transport (Lyckman et al., 1998; Moya et al., 1994) und moduliert die synaptische Transmission. Die intrazerebrale Injektion von APP α in ausgewachsenen Ratten führt zu einer Steigerung der Gedächtnisleistung, was möglicherweise auf die beobachtete synaptische Modulation zurückzuführen ist (Meziane et al., 1998). Das membranständige Fragment C83 enthält die C-terminale Abeta Sequenz sowie die zytosolische Domäne von APP und unterliegt einer regulierten Prozessierung durch die γ -Sekretase (Abbildung 5; Mattson et al., 1997).

1.2.3. Die β -Sekretase

Der Prozessierungsort der β -Sekretase liegt zwischen den Resten 596 und 597 von APP695 und markiert den N-Terminus der Abeta Sequenz (Abbildung 2, entspricht den Kodons 671 und 672 im Gesamtgen). Das resultierende lösliche Fragment APPs β ist 17 Aminosäuren kürzer als APPs α . Die fehlende Sequenz kodiert für die beschriebene Heparin-Bindungsstelle, die essentiell für die beobachteten Funktionen von APPs α zu sein scheint (Furukawa et al., 1996). Entsprechend konnten die beschriebenen Effekte für APPs β wenn überhaupt, nur in schwacher Ausprägung detektiert werden. Einige Studien weisen sogar gegenteilige Befunde auf, in denen APPs β beispielsweise zu einem verminderten Neuritenwachstum führt (Li et al., 1997).

Als katalysierende Enzyme wurden die Aspartyl Protease BACE-1 (BACE = *beta-site APP cleaving enzyme*) (Yan et al., 1999; Vassar et al., 1999) und deren Isoform BACE-2 identifiziert (Farzan et al., 2000). Beide Enzyme sind membranständig und werden vornehmlich in neuronalem Gewebe exprimiert, wobei die Menge an BACE-2 deutlich unter der von BACE-1 liegt (Bennett et al., 2000). Die Sekretase-Aktivität von BACE-2 ist nicht spezifisch, so dass die Prozessierung auch innerhalb der Abeta Sequenz stattfindet (Bennett et al., 2000; Farzan et al., 2000). Der Befund deutet darauf hin, dass BACE-2 keine Schlüsselrolle in der Pathologie der Alzheimer Demenz einnimmt. BACE-1 hingegen zeigt eine 10fach höhere Affinität gegenüber der Alzheimer relevanten „schwedischen Mutation“ im APP (Yan et al., 1999, Abbildung 2). Im Zellmodell führt die Überexpression von BACE-1 zu einer deutlichen Steigerung der Abeta₍₁₋₄₂₎ und Abeta₍₁₋₄₀₎ Produktion (Vassar et al., 2000). BACE-1 *knockout*-Mäuse scheinen phänotypisch normal, weisen aber stark reduzierte Abeta Spiegel auf (Luo et al., 2001; Cai et al., 2001).

Zusammengenommen deuten die Ergebnisse darauf hin, dass BACE-1 den ersten Schritt der kritischen Aβ-Bildung katalysiert. Eine verstärkte Enzymaktivität scheint in kausalem Zusammenhang mit der sporadischen Form der Alzheimer Demenz zu stehen (Holsinger et al., 2004; Li et al., 2004; Yang et al., 2003). Quantitative Analysen haben gezeigt, dass die Menge an BACE Protein im frontalen Cortex von AD-Patienten gegenüber Kontroll-Patienten um das zweifache erhöht war (Holsinger et al., 2002). Die mRNA Spiegel wiesen hingegen keine signifikanten Unterschiede auf, was darauf hindeutet, dass es im Zuge der Erkrankung entweder zu einer Stabilisierung des Proteins oder zu einem veränderten *turnover* kommt. Zusätzlich konnte ein 63%iger Anstieg der enzymatischen Aktivität der β-Sekretase im temporalen Cortex von AD-Patienten detektiert werden (Fukumoto et al., 2002).

BACE-1 (Synonym: *Aspartic Protease-2*, Asp-2) ist ein 54kDa großes Transmembranprotein mit vier potentiellen N-Glykosylierungsstellen. Drei der Stellen werden nachweislich im ER glykosyliert und im Golgi prozessiert, so dass ein Glykoprotein mit heterologen Oligosacchariden entsteht, das in der ausgereiften Form ein Molekulargewicht von 70kDa aufweist (Haniu et al., 2000; Huse et al., 2000). Die Sekretase wird als inaktives Zymogen produziert und im Zuge des Reifungsprozess via Autokatalyse und der enzymatischen Aktivität von Furin aktiviert (Sidera et al., 2002; Bennett et al., 2000). BACE-1 ist sowohl in der monomeren Form, als auch in der dimerisierten Form aktiv, wobei Homodimere eine deutlich höhere (30x) Aktivität aufweisen als Monomere (Westmeyer et al., 2004).

Die zelluläre Lokalisation des Enzyms steht in Übereinstimmung mit der seines Substrates. Wie APP konnte BACE-1 in der Plasmamembran, sowie in den Membranen des ER und TGN nachgewiesen werden (Huse et al., 2000; Abad-Rodrigues et al., 2004). Das pH-Optimum der Sekretase liegt im sauren Milieu, wie beispielsweise in den Endosomen (Haass et al., 1995; Vassar et al., 1999; Walter et al., 2001). BACE-1 konnte in diversen Modellen in Assoziation mit Raft-Markern nachgewiesen werden, obwohl das Protein selbst keine typischen Merkmale eines Raft-Proteins wie GPI-Anker oder Acetylierungen aufweist.

Allerdings weist BACE-1 eine Reihe von Cystein-Palmitoylierungen auf, die für die Raft-Lokalisation essentiell sind (Parsons et al., 2006). Die Hinweise verdichten sich zudem, dass die aktive Sekretase mit weiteren Proteinen, unter anderem Komponenten der γ -Sekretase, komplexiert ist. Die Assoziation mit GPI-Ankerproteinen könnte ebenfalls die Rekrutierung in Lipid Rafts bewirken und stabilisieren (Tun et al., 2002).

Das membranständige Fragment C99 stellt neben C83 das zweite physiologische Substrat der γ -Sekretase dar (Abbildung 5). Die Extraktion von C99 erfordert stringente Bedingungen, was die Quantifizierung im Gewebe erschwert (Evin et al., 2003). Im Cortex von AD-Patienten konnte jedoch ein zweifacher Anstieg der C99 Konzentration gegenüber Kontroll-Patienten beobachtet werden (Evin et al., 2003), was in Übereinstimmung mit der zuvor detektierten Zunahme an BACE Protein und -Aktivität steht (Holsinger et al., 2002). Die hohen Spiegel an C99 deuten außerdem darauf hin, dass nur ein Teil der Fragmente zu amyloidogenen Spezies prozessiert wird und dass die Formation einem Regulierungsmechanismus unterliegt oder die CTFs in zusätzliche alternative Stoffwechselwege eingebunden sind (Nunan et al., 2001). Die Überexpression von C99 in transgenen Maus Neuronen führt beispielsweise zur proteasomalen Prozessierung (Nunan et al., 2001), einem endogenen Stoffwechselweg, der im Zuge der Alzheimer Demenz verändert wird (Keller et al., 2000) und so eine mögliche Erklärung für die detektierte CTF-Akkumulierung darstellt.

1.2.4. Die γ -Sekretase

Die aktive γ -Sekretase konnte als Komplex aus Präsenilinen, Nicastrin, APH-1 (*Anterior Pharynx Defective*) und PEN-2 (*Präsenilin Enhancer-2*) identifiziert werden (De Strooper 2003; Capell et al., 2005). Die beiden Präsenilin-Homologe PS1 und PS2 durchspannen die Membran mit neun Transmembrandomänen und bilden das aktive Zentrum des Enzymkomplexes (Haass et al., 2004; Abbildung 7). Kurz nach der Identifizierung der Komplexkomponenten wurden weitere, APP-unabhängige Substrate der γ -Sekretase gefunden. Dazu zählen der Notch-1 Rezeptor (Notch-1), sowie dessen Liganden *Delta-like Protein 1* (Delta-1) und *Jagged 2* (Jag-2).

Der Enzymkomplex ist nicht nur in der molekularen Zusammensetzung ungewöhnlich, sondern auch in der proteolytischen Aktivität, da die beiden APP-relevanten Substrate C83 und C99 innerhalb der Membran geschnitten werden (Haass und Kaether, 2004). Die Schnittstelle markiert das C-terminale Ende der Abeta-Sequenz. Die Spaltung von C99 führt zur Freisetzung von multiplen Abeta Isoformen und der C-terminalen, zytosolischen „APP intrazellulären Domäne“ (AICD).

Die nicht-amyloidogene Prozessierung von C83 generiert statt Abeta das lösliche APP-Fragment p3 und ebenfalls AICD. Letzteres Fragment kann in den Zellkern eindringen und die Gen Regulation beeinflussen (Cao und Südhof, 2001). Die *in vivo* Targetgene dieses, möglicherweise regulatorischen, Stoffwechselfades konnten bislang nicht vollständig identifiziert werden. Beschrieben wurde auf der einen Seite die Stimulation apoptotischer Gene (Leissring et al., 2002), so wie ein verändertes Expressionsmuster von GSK-3 β (Kim et al., 2003). Auf der anderen Seite korrelierten im Tiermodell gesteigerte Gedächtnisleitung und synaptische Plastizität mit erhöhten Spiegeln an AICD (Ma et al., 2007).

Die γ -Sekretase weist, anders als die α - und β -Sekretase keine spezifische Schnittstelle auf, sondern kann APP an mehreren Stellen spalten, wodurch unterschiedliche Isoformen von Abeta entstehen. Die prominenteste Schnittstelle liegt nach Val40 und resultiert in der Freisetzung von Abeta₍₁₋₄₀₎ (Abbildung 7). Weit weniger häufig ist die Prozessierung nach Ala42, welche zur Generierung von Abeta₍₁₋₄₂₎ führt. Zusätzlich konnten aber auch Abeta-Fragmente mit 38-49 Aminosäuren nachgewiesen werden.

Zwei unabhängige Studien aus dem Jahr 2005 zeigen, dass die multiplen Prozessierungswege nicht nur auf einer variablen Schnittstelle beruhen, sondern dass die Freisetzung von Abeta zusätzlich einen mehrstufigen, sequentiellen Mechanismus darstellt (Abbildung 7; Qi-Takahara et al., 2005; Zhao et al., 2005). Zunächst erfolgt ein Schnitt am zytoplasmatischen Ende der Transmembransequenz, an den Resten 49 oder 48 von C99, die die sogenannte ϵ -Schnittstelle markieren (Sastre et al., 2001; Weidemann et al., 2002). Die resultierenden Fragmente Abeta 49/Abeta 48 werden nachfolgend an der ζ -Schnittstelle zu Abeta 46/Abeta 45 prozessiert (Zhao et al., 2004). Aus Abeta 46 wird über die Zwischenstufe von Abeta 43 letztlich das 1-40er Fragment generiert, während Abeta 45 die direkte Vorstufe des Abeta 1-42er Fragments darstellt (Zhao et al., 2005; Qi-Takahara et al., 2005). Ein ähnlicher Mechanismus konnte auch für die γ -Sekretase Prozessierung von Notch nachgewiesen werden (Chandu et al., 2006).

Das APP-Holoprotein selbst stellt kein Substrat für die γ -Sekretase dar, d.h. die intramembranäre Spaltung tritt erst auf, nachdem die Ektodomäne von APP durch α - oder β -Sekretase Prozessierung entfernt wurde (Goo und Park, 2004; Struhl und Adachi, 2000). Die Aktivität der γ -Sekretase konnte in der Plasmamembran und in Endosomen nachgewiesen werden (Xia et al., 2000, 2001 & 2003; Weidemann et al., 1997). Mitglieder des Enzymkomplexes ebenso wie Abeta als Produkt der Prozessierung wurden in Assoziation mit Lipid Rafts detektiert (Li et al., 2000; Wahrle et al., 2002).

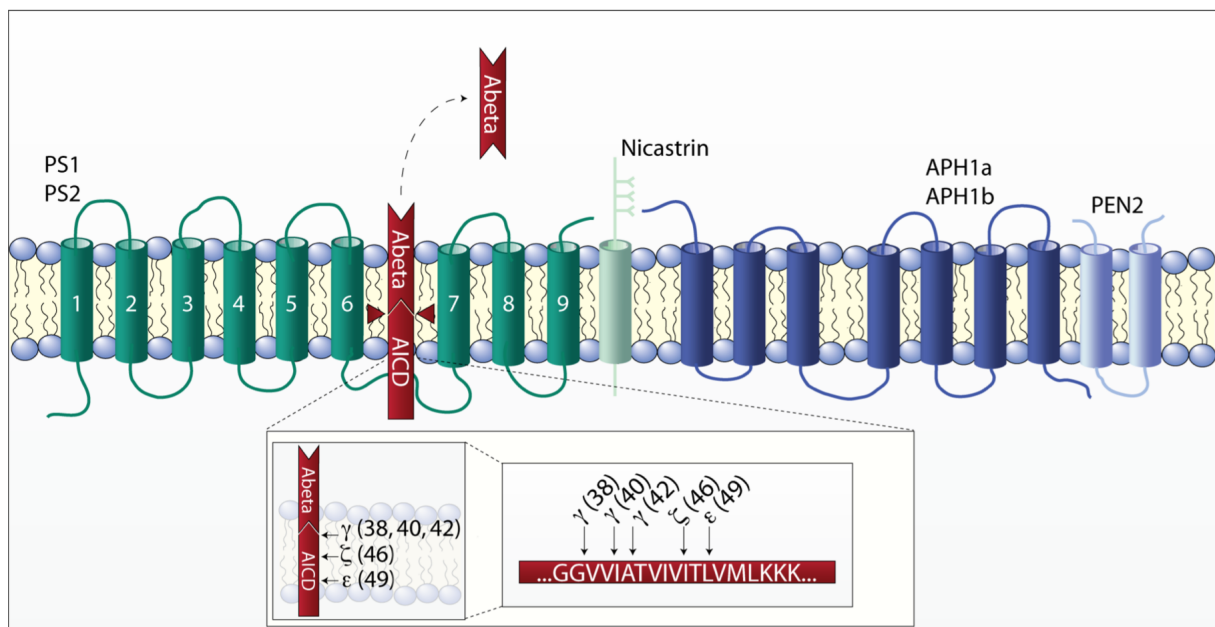


Abbildung 7 Prozessierung durch die γ -Sekretase

1.2.5. Abeta Peptide

Abeta Peptide variieren in der Größe zwischen 39 und 42 Aminosäuren und weisen eine unterschiedlich starke Tendenz zur Selbstaggregation auf. Entsprechend existieren sie als lösliche Monomere, Dimere oder höhere Oligomere (reviewed in FINDER und GLOCKSHUBER, 2007). Eine weitere Aggregation führt zu unlöslichen Protofibrillen und schließlich zu durchaggregierten Fibrillen, die den Kern von senilen Plaques bilden (Haass und Selkoe, 2007). Die prominentesten Vertreter sind die Isoformen Abeta₍₁₋₄₀₎ und Abeta₍₁₋₄₂₎. Das Abeta 1-42er Fragment macht nur ungefähr 5-10% der Gesamtmenge an Abeta aus, weist allerdings das höchste Aggregationspotential auf (FINDER und GLOCKSHUBER, 2007).

In vivo und *in vitro* Experimente belegen, dass Abeta ein hohes Maß an Neurotoxizität aufweist (reviewed in Haass und Selkoe, 2007). Aufgrund der Tatsache, dass Abeta in senilen Plaques in stark aggregiertem Zustand vorliegt, ging man zunächst davon aus, dass die Toxizität mit dem Grad der Aggregation korreliert (Pike et al., 1993). Neuere Studien zeigen hingegen, dass lösliche oligomere Abeta-Strukturen stark neurotoxisch wirken (McLean et al., 1999; Walsh et al., 2002; Haass und Selkoe, 2007). Unterstützt wird der Befund durch die Beobachtung, dass synaptische Dysfunktionen in transgenen Tiermodellen bereits vor der Ausbildung von unlöslichen Abeta-Aggregaten auftreten (Hsia et al., 1999; Terry et al., 1991). Auch in AD-Patienten korrelieren Symptome wie Gedächtnisverlust und abnehmende kognitive Fähigkeiten mit der Menge an löslichen Abeta-Oligomeren, nicht aber mit der Anzahl an senilen Plaques (Dahlgren et al., 2002). Möglicherweise stellt die Ausbildung von Plaques sogar einen Schutzmechanismus dar, in dem die löslichen reaktiven Oligomere abgefangen und gebunden werden (Lansbury et al., 1999; Terry et al., 1991)

Abeta Peptide wurden erstmals Mitte der 80er Jahre aus Blutgefäßen der Hirnhaut von AD- und Down-Syndrom Patienten isoliert und sequenziert (Glennner und Wong, 1984). Die Struktur der monomeren Peptide weist einen amphiphilen Charakter mit einem hydrophilen N-Terminus und einem hydrophoben C-Terminus auf (Selkoe et al., 2004). Monomeres Abeta kann sowohl in α -helikaler Struktur, als auch in β -Faltblattkonformation vorliegen (Coles et al., 1998; Crescenzi et al., 2002). Unter physiologischen Bedingungen existieren beide Konformationen in einem Fließgleichgewicht mit Überhang zur α -Helix (Finder und Glockshuber, 2007).

Die Aggregation beginnt aus der β -Faltblattkonformation heraus, so dass diese Form dem Gleichgewicht entzogen wird (Finder und Glockshuber, 2007). Der Übergang von α -Helix zu β -Faltblattkonformation kann jedoch auch erst in oligomeren Strukturen stattfinden (Walsh et al., 1999). Welche Faktoren den Prozess initiieren und über welche Intermediate der Aggregationspfad verläuft, ist bislang ungeklärt (Haass und Selkoe, 2007).

Der Vergleich von unterschiedlichen Abeta-Isoformen zeigt, dass das Abeta 1-42er Fragment bei physiologischem pH-Wert häufiger als die anderen Fragmente in der β -Faltblattkonformation vorliegt (Barrow et al., 1991). Auch Mutationen im Bereich der Abeta-Sequenz, die mit der FAD assoziiert sind, führen zu einer stärkeren Aggregationstendenz. Auffällig ist, dass bei einer Reihe von bekannten Mutationen wie der Dutch (E22Q), Italien (E22K), Iowa (D23N) oder der Arctic (E22G) die Reste 22 und 23 betroffen sind (Abbildung 2), was darauf hindeuten könnte, dass dieser Teil der Sequenz in Zusammenhang mit der Stabilität der β -Faltblattkonformation steht (Finder und Glockshuber, 2007). *In vitro* Experimente zeigen, dass die Aggregation abhängig vom pH-Wert ist. Bei pH 5-6 ist die Aggregationsrate maximal wohingegen niedrigere und höhere pH-Werte die Fibrillenbildung verhindern. Dazu passt, dass die α -Helix Konformation bei pH 1-4 und 7-10 auftritt, während bei pH 5-6 β -Faltblattstrukturen dominieren (Fraser et al., 1991; Wood et al., 1996). Tabelle 1 zeigt eine Zusammenfassung der identifizierten Abeta-Aggregate, sowie deren Eigenschaften und Vorkommen.

Abeta Spezies	Charakteristika	Referenzen
Monomere	Lösliche amphiphile Moleküle; Generierung aus APP-Prozessierung; potentiell α -helikale, <i>random coil</i> oder β -Faltblattkonformation	Selkoe, 2004; Zhang et al., 2000; Barrow et al., 1991; Lazo et al., 2005; Xu et al., 2005
Dimere	<i>In vivo</i> : intrazellulär lokalisiert; Nachweis in humanem Hirngewebe und <i>in vitro</i> ; hydrophober Kern; Durchmesser ~ 35nm	Garzon-Rodriguez et al., 1997; Hilbich et al., 1992; Roher et al., 1996; Podlisny et al., 1995; Walsh et al., 2000; Nakabayashi et al., 1998
Trimere	Nachweis <i>in vivo</i> im Mausmodell; potentielle Rolle als Untereinheit von toxischen Oligomeren	Lesne et al., 2006; Townsend et al., 2006
Kleine Oligomere	Nachweis sowohl <i>in vivo</i> in AD-Patienten und im Mausmodell als auch <i>in vitro</i> ; heteromorphes Molekül aus 3-50 Monomeren; meist transient und instabil, nachweislich toxisch	Dahlgren et al., 2002; Walsh et al., 2002; Kuo et al., 1996; McLean et al., 1999; Cleary et al., 2005; Lesne et al., 2006; Bitan et al., 2003
Ringförmige Oligomere	Nachweis im Zellmodell und in <i>in vitro</i> Experimenten; potentielle Rolle als membranspaltende Pore oder Ionenkanal	Kagan et al., 2002; Lashuel et al., 2002; Quist et al., 2005; Mattson et al., 2003;
ADDLs	Nachweis in murinem und humanem Hirngewebe und <i>in vitro</i> ; nicht-fibrillär; neurotoxisch; 17-42kDa; Trimer bis 24mere	Chromy et al., 2003; Klein et al., 2004; Lambert et al., 1998; Harper et al., 1999; Georganopoulou et al., 2005
Protofibrillen	Nachweis <i>in vitro</i> ; kurze, flexible, stabförmige Strukturen; max. Größe: 8x200nm; binden Congo Rot und Thioflavin T; Vorstufe der ausgereiften Fibrillen; toxisch	Harper et al., 1999; Arimon et al., 2005; Harper et al., 1997; Harper et al., 1997; Kheterpal et al., 2003; Walsh et al., 1997; Williams et al., 2005; Walsh et al., 1999; Hartley et al., 1999; Rochet et al., 2000; Ward et al., 2000
Fibrillen	Nachweis in AD-Patienten, im Mausmodell und <i>in vitro</i> ; binden Congo Rot und Thioflavin T; stabile filamentöse Abeta-Aggregate aus sich wiederholenden Abeta-Einheiten, die senkrecht zur Fibrillenachse stehen	Ross et al., 2005; Klunk et al., 1999; LeVine et al., 1999; Stromer et al., 2005; Luhrs et al., 2005; Malinchik et al., 1998
Plaques	Nachweis <i>in vivo</i> in AD-Patienten und im Maus-Modell; große extrazelluläre Abeta Ablagerungen; hauptsächlich aus Fibrillen; nicht toxisch; umgeben von dystrophen Neuronen, aktivierten Mikroglia und reaktiven Astrozyten	Selkoe et al., 2004, Lansbury et al., 1999; Muller-Hill et al., 1989; Terry et al., 1991

Tabelle 1 Identifizierte Abeta Strukturen sowie deren Eigenschaften und Vorkommen (modifiziert aus Finder und Glockshuber, 2007 und Haass et al., 2007)

In Bezug auf den Mechanismus der Aggregation stellt sich die Frage, ob es sich um einen linearen oder um einen kooperativen Prozess handelt, bei dem ein „Aggregationskeim“ eine Reaktionskaskade auslöst. Das Modell der Abeta-Fibrillierung favorisiert letzteres Szenario, bei dem es, ausgehend von einem germinalen Kern aus geordneten Abeta-Oligomeren zu einer fortschreitenden Polymerisierung von Abeta Molekülen kommt (reviewed in Finder und Glockshuber, 2007).

Die Formation eines Kerns mit Keim-Eigenschaften stellt in diesem Modell den limitierenden Faktor dar, was mit der beobachteten Verzögerung in der Fibrillenformation übereinstimmt. *In vitro* konnte diese Verzögerungsphase durch Zugabe eines externen Keims eliminiert werden (Jarrett et al., 1993; Arimon et al., 2005; Harper et al., 1997). Diskutiert werden auch noch zusätzliche Faktoren wie Metallionen, Glycosaminglykane und andere Komponenten der extrazellulären Matrix als essentielle Komponenten des Aggregationsprozesses.

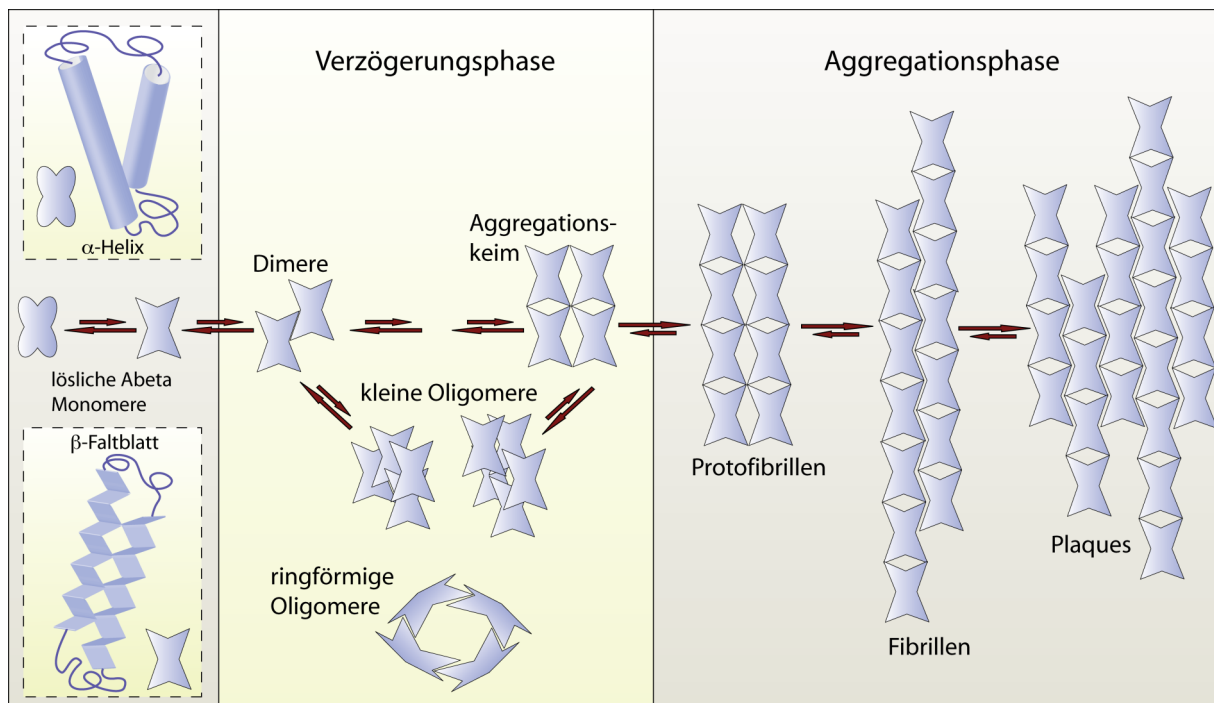


Abbildung 8 Modell der Abeta-Aggregation

Die bislang formulierte Hypothese geht davon aus, dass der Keim aus spontan gebildeten Abeta-Oligomeren besteht (Finder und Glockshuber, 2007). Ein weiteres Modell postuliert, dass Konformationsänderungen durch posttranslationale Modifikationen der Peptide, oder aber die Bindung an ein nicht-amyloidogenes Molekül die Aggregation initiieren. Monomeres und dimeres Abeta konnte in Assoziation mit Lipid Rafts nachgewiesen werden (Kawarabayashi et al., 2004; Ariga et al., 2001; Kakio et al., 2001). Weiterführende Befunde zeigen, dass Abeta an GM-1, ein Raft spezialisiertes Gangliosid bindet (Yanagisawa et al., 1995). Die Bindung führt zu konformationellen Änderungen der mittleren Region von Abeta, was in einer erhöhten Aggregationstendenz resultiert (Yanagisawa et al., 1995, 1997; Yanagisawa und Ihara, 1998; Hayashi et al., 2004). Der Komplex aus GM-1 und Abeta (G-Abeta) wirkt somit ebenfalls als Keim, der die Aggregation von löslichem, monomerem Abeta initiiert. Die Generierung von G-Abeta konnte bereits im Gehirn nachgewiesen werden (Hayashi et al., 2004).

Offen bleibt die Frage, wie die Assemblierung von Abeta Peptiden Neurotoxizität induziert. Eine Reihe von Effekten wurde im Zusammenhang mit Abeta-Aggregaten beschrieben. Hierzu zählen die Auslösung von oxidativem Stress und die Formation von Ionenkanälen bzw. allgemein eine massive Störung der Membranintegrität. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Abeta die Rekrutierung bestimmter zellulärer Faktoren, sowie die Aktivierung von zellulären Prozessen, wie Entzündungsreaktionen oder auch Apoptose induziert (Hardy und Selkoe, 2002; Nakagawa et al., 2000; Soto et al., 2003; Roberson und Mucke, 2006).

Lange Zeit wurde Abeta als pathologisches Produkt eines fehlgeleiteten Prozessierungswegs angesehen. Mittlerweile konnte das Peptid jedoch auch in der Cerebrospinalflüssigkeit und im Blutplasma gesunder Personen nachgewiesen werden (Haass et al., 1992). Die Konzentrationen in der CSF sind wesentlich geringer als in AD-Patienten, so dass sich keine Ablagerungen oder Plaques bilden (Kuo et al., 1996). Dennoch weist der Befund darauf hin, dass die amyloidogene Prozessierung auch unter physiologischen Bedingungen stattfindet und Abeta im gesunden Organismus möglicherweise funktionelle Aufgaben hat. Spekuliert wurde unter anderem über eine potentielle Rolle als Regulator von Ionenkanälen (Ramsden et al., 2001, 2002). Konkretere Ergebnisse brachten Experimente, in denen gezeigt wurde, dass Abeta von Neuronen als Antwort synaptischer Aktivität sezerniert wird, um dann im Gegenzug die synaptische Transmission zu reduzieren (Kamenetz et al., 2003).

Die Tatsache, dass Abeta auch unter physiologischen Bedingungen gebildet wird, wirft die Frage auf, ob die beobachtete Akkumulation im Zuge der AD auf eine verstärkte Prozessierung oder eine veränderte Degradierung zurückzuführen ist. Im Gehirn bindet Abeta an ApoE, was die Elimination über einen periarteriellen Transportweg ermöglicht (Evin et al., 2002; reviewed in Standridge, 2006). Im Zuge des Alterns wird die Drainage vermindert, was zu einem Rückstau an Abeta im Gehirn führt. Zusätzlich konnten die beiden Metalloproteasen *Insulin-Degrading Enzyme* (IDE) und Neprilysin (NEP) als Abeta degradierende Enzyme identifiziert werden (Evin et al., 2002; Caccamo et al., 2005). Im Hippocampus, einer AD-relevanten Hirnregion, gehen die *steady-state* Spiegel beider Enzyme mit zunehmendem Alter zurück (Caccamo et al., 2005), was ebenfalls zu einer Akkumulation von Abeta führt. Die detektierte Zunahme an BACE-1 Aktivität und Proteinmenge im Gehirn von AD-Patienten lässt zusätzlich auf eine verstärkte amyloidogene Prozessierung schließen.

Zusammengenommen scheint es in der Alzheimer Demenz zu einer Störung der Balance zwischen Abeta Produktion und Degradierung zu kommen. Unklar ist jedoch, welche physiologischen Veränderungen im alternden Gehirn dieses Ungleichgewicht initiieren.

1.3. Cholesterin - ein weiterer Stein im Puzzle der Alzheimer Demenz

Zwei wesentliche Befunde deuteten initial auf einen Zusammenhang zwischen Cholesterin-metabolismus und Alzheimer Demenz hin. Zum einen belegen genetische Untersuchungen, dass der Genotyp 4 von Apolipoprotein E, dem bedeutendsten Cholesterin-Transporter im ZNS, neben dem Alter den Haupt-Risikofaktor für die Entwicklung einer sporadischen Alzheimer Demenz darstellt (s. 1.1.5). Zum anderen zeigten zwei epidemiologische Studien im Jahr 2000, dass die Einnahme von cholesterinsenkenden Statinen das Risiko einer Erkrankung reduzierte (Wolozin et al., 2000; Jick et al., 2000). Seither wurde eine Vielzahl von Untersuchungen und Studien durchgeführt, um den mechanistischen Zusammenhang zwischen Cholesteringehalt/metabolismus und AD-Pathogenese aufzuklären.

Cholesterin ist auf der einen Seite essentiell für die Struktur und Funktionalität von Zellen und Geweben, auf der anderen Seite führen hohe Konzentration zu Ablagerungen in den Gefäßen und somit zur Entstehung von arteriosklerotischen Erkrankungen. Die Synthese und der Transport unterliegen daher komplexen Regulationsmechanismen.

1.3.1. Biosynthese

Das körpereigene Cholesterin kann entweder mit der Nahrung aufgenommen oder *de novo* synthetisiert werden (Brown und Goldstein, 1997). Unter physiologischen Bedingungen weisen Säugetierzellen trotz schwankendem Angebot und Bedarf einen weitestgehend konstanten intrazellulären Cholesterinspiegel auf (Johnson et al., 1997; Liscum und Munn, 1999). Grund hierfür ist die fein regulierte Neusynthese, die größtenteils im ER der Hepatozyten stattfindet und über mehrere Rückkopplungsmechanismen dem aktuellen Angebot angepasst wird (Brown und Goldstein, 1997; Simons und Ikonen, 2000). Ausgehend von Acetyl-CoA und Acetoacetyl-CoA wird zunächst 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) synthetisiert, welches in der folgenden Reaktion zu Mevalonat reduziert wird. Durch Kondensation und Addition wird das C30-Übergangsprodukt Squalen gebildet. Die Zyklisierung generiert Lanosterin, aus dem durch Modifikationen das C27-Endprodukt Cholesterin hervorgeht (Stryer, 2000; Abbildung 9).

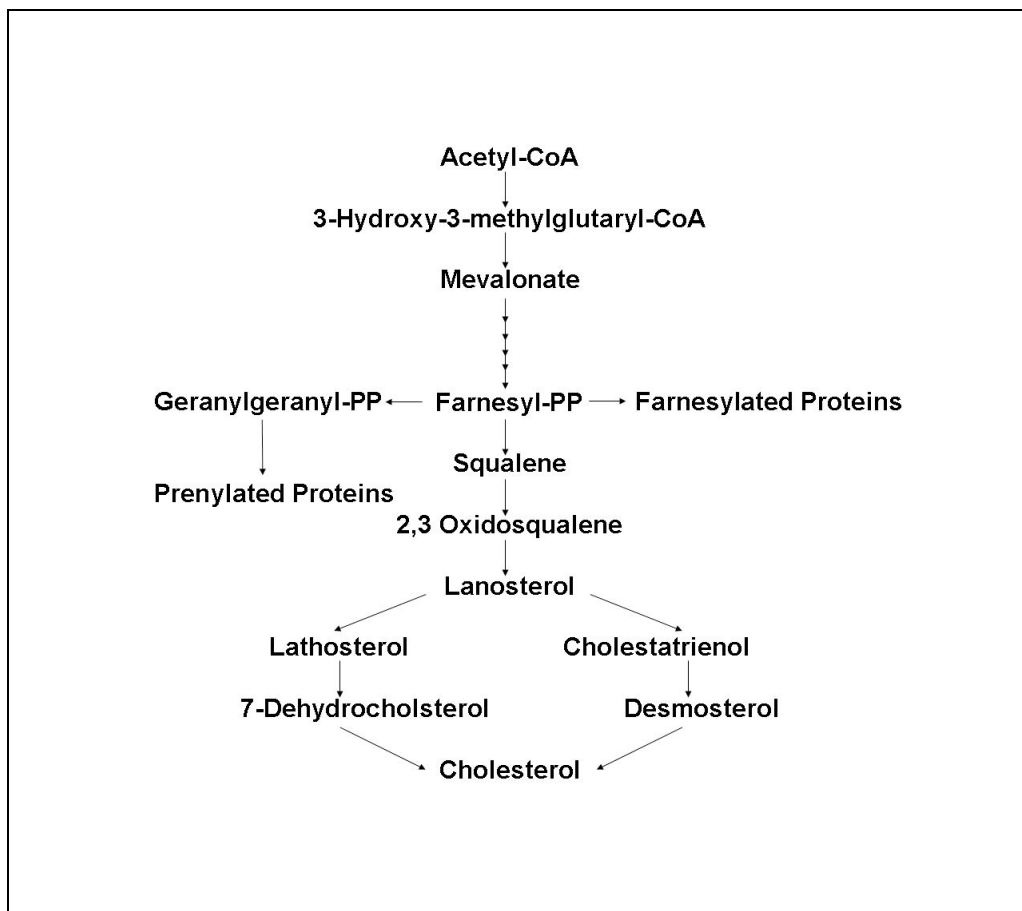


Abbildung 9 Cholesterinbiosynthese

Das Schlüsselenzym der Cholesterinbiosynthese ist die 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reduktase (HMG-CoA Reduktase), die den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Mevalonatsynthese katalysiert. Die Regulation des Enzyms beginnt bereits auf der mRNA-Ebene. Eine kurze Sequenz auf der 5'-Seite des Reduktasegens dient als regulatorisches Element, das die Geschwindigkeit der Transkription kontrolliert. Bei einer ausreichenden Menge an zellulären Steroiden wird dadurch die Bildung der mRNA gehemmt (Brown und Goldstein, 1997, Simons und Ikonen, 2000). Zusätzlich verhindern nicht-steroidale, vom Mevalonat abgeleitete Metabolite, die Translation von bereits vorhandener mRNA.

Auch auf der Proteinebene unterliegt die Aktivität des Enzyms Kontrollmechanismen. Die membranständige Domäne enthält eine regulatorische Sequenz, die auf die Konzentration an Cholesterin und Mevalonat reagiert und im Fall einer Überproduktion den Abbau der Reduktase initiiert. Zusätzlich ist die Aktivität über Phosphorylierung durch eine AMP-Protein Kinase an den ATP Haushalt der Zelle gekoppelt. Bei einem niedrigen ATP-Spiegel wird die Cholesterinsynthese somit fast vollständig gehemmt (Brown und Goldstein, 1997).

1.3.2. Cholesterinmetabolismus

1.3.2.1. Cholesterinmetabolismus in der Körper-Peripherie

Die sterioide Struktur des Cholesterins macht es zu einem absolut lipophilen Molekül. Um dennoch den Transport im wässrigen Milieu des Körpers zu ermöglichen, wird das Cholesterin mit sogenannten Apolipoproteinen assoziiert (Johnson et al., 1997). Es existieren eine Reihe von unterschiedlichen Apolipoproteinen (Typ A, B, C, D, E, F, G, H, J), die zusätzlich unterschiedliche Isoformen ausbilden. Die Proteinkomponenten lagern sich um die hydrophoben Lipide an, um diese abzuschirmen und den Komplex so zu solubilisieren (Johnson et al., 1997). Zusätzlich enthalten sie Bindungsdomänen für zelluläre Lipoproteinrezeptoren, die den Transport und die Aufnahme in bestimmte Zellen regulieren. Entsprechend ihrer Dichte werden Lipoproteine in unterschiedliche Klassen eingeteilt (Tabelle 2).

Lipoprotein	Lipidklasse im Kern	Apolipoprotein	Lipidabgabe
Chylomikronen	Nahrungstriacylglycerine	B-48, C, E	Hydrolyse / Lipasen
Chylomikronen-Remnants	Nahrungscholesterinester	B-48, E	Endozytose
VLDL (<i>very low density lipoproteins</i>)	Endogene Triacylglycerine	B-100, C, E	Hydrolyse / Lipasen
IDL (<i>intermediate density lipoproteins</i>)	Endogene Cholesterinester	B-100, E	Endozytose / LDL-Bildung
LDL (<i>low density lipoproteins</i>)	Endogene Cholesterinester	B-100	Endozytose
HDL (<i>high density lipoproteins</i>)	Endogene Cholesterinester	A	Transfer auf IDL und LDL

Tabelle 2 Eigenschaften von Plasmalipoproteinen

Die wichtigsten Cholesterintransporter sind die Lipoproteine geringer Dichte (LDL: *low density lipoproteins*). Sie haben einen Durchmesser von 22nm und eine molekulare Masse von ungefähr 3 Millionen Dalton (Dietschy et al., 1997). Der lipophile Kern wird aus circa 1500 veresterten Cholesterinmolekülen gebildet und von einer Hülle aus Phospholipiden und unverestertem Cholesterin umgeben. Zusätzlich wird der Komplex von einem einzigen Molekül des Apolipoprotein B-100 umschlossen, welches an Rezeptoren in der Plasmamembran von Zielzellen binden kann (Stryer, 2000).

Der gesamte Komplex von Rezeptor und LDL-Partikel wird via Endozytose in die Zelle aufgenommen. Im Zytosol verschmelzen die Vesikel mit Lysosomen, die sowohl Peptidasen, als auch Lipasen enthalten (Schmitz und Orso, 2001; Abbildung 10). Es folgt die lysosomale Hydrolyse des LDL-Partikels, bei der die Proteinbestandteile in freie Aminosäuren, und die Cholesterinester in freie Cholesterinmoleküle zersetzt werden. Für den weiteren endozytotischen Transport des Cholesterins scheint das Niemann-Pick Typ C (NPC) Protein essentiell, dessen Funktion im Zuge der Niemann-Pick Typ C-Krankheit gestört ist, was eine intrazelluläre Anreicherung von freiem Cholesterin zur Folge hat (Ioannou, 2000; Schmitz und Orso, 2001; Yamazaki et al., 2001).

Der Rezeptor kehrt in der Regel unversehrt zur Plasmamembran zurück, um erneut LDL-Partikel zu binden. Jeder Umlauf eines Rezeptors dauert in etwa 10 Minuten, wobei die Anzahl an Rezeptoren einer Rückkopplungsregulation unterworfen ist. Weist die Zelle einen hohen Cholesterinspiegel auf, werden keine neuen Rezeptormoleküle synthetisiert, so dass die Neuaufnahme reduziert wird. Die Regulation erfolgt analog zur HMG-CoA-Reduktase auf Ebene der mRNA (Stryer, 2000).

Das unveresterte Cholesterin kann nun in die Plasmamembran eingebaut werden oder für die intrazelluläre Speicherung wieder verestert werden (Liscum und Munn, 1999). Intrazelluläres verestertes Cholesterin enthält hauptsächlich einfach ungesättigte Fettsäuren und unterscheidet sich dadurch von den Cholesterinestern, die in LDL-Partikeln vorliegen und hauptsächlich mehrfach ungesättigte Fettsäuren aufweisen. Die Veresterung wird von der Acyl-CoA:Cholesterin-Acyltransferase (ACAT) katalysiert, wobei freies Cholesterin im Zytoplasma zur Aktivierung des Enzyms führt (Stryer, 2000; Abbildung 10)

Die Gesamtmenge an Cholesterin in einer Zelle setzt sich aus freiem, unverestertem Membrancholesterin und intrazellulären Cholesterinestern zusammen, wobei beide Pools ein dynamisches System bilden (Liscum und Munn, 1999; Uittenbogaard et al., 1998). Der Anteil an freiem Cholesterin in den Membranen der einzelnen Kompartimente der Zelle weist deutliche Unterschiede auf (Liscum und Munn, 1999). Die Membranen der intrazellulären Organellen wie ER und Mitochondrien sind unter physiologischen Bedingungen nahezu cholesterinfrei.

Das Verhältnis von Cholesterin zu Phospholipid nimmt dabei im sekretorischen Transportsystem stetig zu, so dass 65-80% des zellulären Cholesterins in der Plasmamembran lokalisiert sind (Ikonen, 1997; Slotte, 1997; Liscum und Munn, 1999).

Überschüssiges Cholesterin kann mittels der ABC (ATP-Binding Cassette)-Transporter ABCA-1 und ABCG-1 aus der Zelle entfernt werden (Johnson et al., 1991; Liscum und Munn, 1999; Eckert et al., 2005). Im Serum wird das sezernierte Cholesterin in Form von Lipoproteinen mit hoher Dichte (HDL: *high density lipoproteins*) transportiert (Schmitz und Orso, 2001).

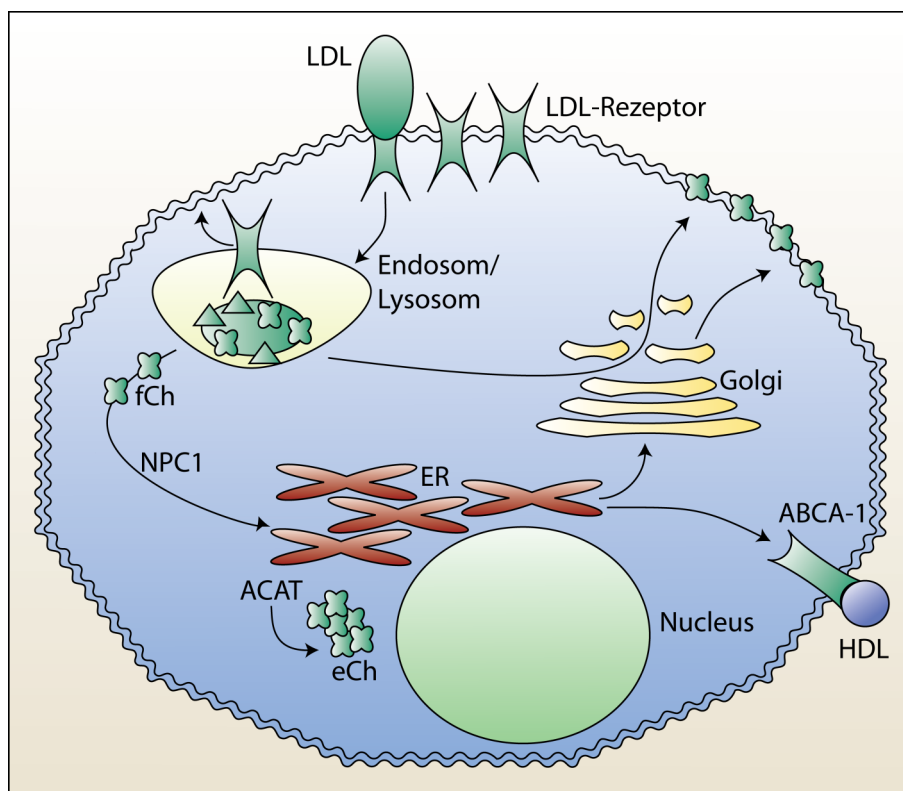


Abbildung 10 Cholesterinmetabolismus in peripheren Zellen; fCh: freies Cholesterin; eCh: verestertes Cholesterin

1.3.2.2. Cholesterinmetabolismus im ZNS

Cholesterin kommt eine fundamentale Rolle in der Entwicklung der Gehirnstrukturen zu. Entsprechend hoch ist der prozentuale Anteil im ZNS. Ein Viertel des gesamten Körpercholesterins ist hier auf gerade mal 2% des Körpergewichtes konzentriert (Dietschy und Turley, 2001). Das *zentrale Cholesterin* ist weitestgehend unabhängig und unbeeinflusst vom *peripheren Serum-Cholesterin*, da Lipoproteine die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren können (Turley et al., 1998). Der Cholesterin *turnover* im Gehirn ist vergleichsweise langsam. Die geschätzte Halbwertszeit liegt in Nagetieren bei 4-6 Monaten und in Menschen bei bis zu 5 Jahren (Björkhem et al., 1998).

Überschüssiges Cholesterin kann das zentrale Kompartiment nur in Form von 24(S)-Hydroxycholesterin (24-OHC) verlassen (Lutjohann et al., 1996, 2001; Björkhem et al., 1998). Die Oxidation wird von der Cholesterin 24-Hydroxylase CYP46, einem Mitglied der Cytochrom P450 Familie, katalysiert (Lund et al., 1999). 24-OHC kann die Blut-Hirn-Schranke passieren und über die Leber ausgeschieden werden.

Mittlerweile konnte ein zweites Oxysterol, 27-Hydroxycholesterin (27-OHC), nachgewiesen werden, dass in entgegengesetzter Richtung aus der Peripherie ins Gehirn transportiert wird (Heverin et al., 2005). Aufgrund einer sehr hohen metabolischen Umsatzrate sind die basalen Spiegel an 27-OHC im ZNS unter physiologischen Bedingungen sehr niedrig (Meaney et al., 2007).

Das Cholesterin im ZNS liegt hauptsächlich in freier, unveresterter Form vor. Der größte Teil ist mit Myelin assoziiert (Dietschy und Turley, 2001), während der Rest in den Membranen von Astrozyten und Neuronen lokalisiert ist. Der Bedarf wird nahezu vollständig durch die *in situ* Synthese im ZNS gedeckt. Die höchste Syntheserate tritt in der Phase der aktiven Myelinisierung kurz nach der Geburt auf. Im ausgewachsenen Organismus erreicht die Cholesterinsynthese eine Plateauphase, so dass in Neuronen nur noch der basale *turnover* durch die Eigensynthese abgedeckt wird.

Für Reparaturprozesse und Membranerweiterungen sind sie dann auf das in Astrozyten gebildete Cholesterin angewiesen. Im alternden Organismus wird auch hier die Synthese zunehmend eingestellt (Dietschy, 1997; Morell und Jurevics, 1997; Turley et al., 1998). Der Transport geschieht hauptsächlich durch ApoE-assoziierte Lipoproteine mit der Größe und Dichte von HDLs. Die Sekretion wird analog zur Peripherie über ABCA-1 vermittelt, ebenso wie die Internalisierung der Lipoproteine durch Rezeptor-vermittelte Endozytose.

Obwohl der zentrale Cholesterinmetabolismus durch die Blut-Hirn-Schranke vom peripheren Metabolismus getrennt ist, zeigen Studien, dass cholesterinreiche Ernährung zu Veränderungen des Cholesterinspiegels im ZNS führten und die APP-Prozessierung beeinflussten (Sparks et al., 1994; Howland et al., 1998; Refolo et al., 2000).

1.3.3. Cholesterin und die Alzheimer Demenz

Der Zusammenhang zwischen Cholesterin und AD konnte mittlerweile in einer Vielzahl von Studien und experimentellen Daten belegt werden. Unklar ist jedoch, welche mechanistische Rolle Cholesterin einnimmt. Der Großteil an Daten bestätigt den schädigenden Einfluss von hohen Cholesterinspiegeln, der vor allem auf eine Stimulation der Abeta-Produktion zurückzuführen ist. Im Gehirn von Alzheimer Patienten und im transgenen Maus Modell konnten Cholesterinakkumulationen in Assoziation mit neuritischen Plaques beobachtet werden (Mori et al., 2001). Sowohl die Level an Gesamtcholesterin, als auch die Menge an LDL im Serum korrelieren dabei mit der Menge an Abeta (Kuo et al., 1998). Unterstützt wurde die Cholesterin-Hypothese durch Tiermodellstudien, in denen gezeigt werden konnte, dass cholesterinreiche Diäten zu Abeta-Akkumulationen im Gehirn führen (Refolo et al., 2000), wohingegen die Senkung der Cholesterinspiegel eine Inhibition der Abeta-Produktion bewirkt (Chauhan et al., 2004).

Der gleiche Effekt konnte in kultivierten Neuronen nachgewiesen werden (Fassbender et al., 2001). Diskutiert wird aber auch ein konzentrationsabhängiger Mechanismus, bei dem eine milde Reduktion (<25%) von Cholesterin zu erhöhten Abeta-Spiegeln führt, während eine starke Reduktion (>35%) den Effekt umkehrt und die Abeta-Produktion verhindert (Abad-Rodriguez et al., 2004).

Die Datenlage in Bezug auf hohe Plasma-Cholesterinspiegel als potentieller Risikofaktor von AD zeigt sich ebenfalls widersprüchlich. 2002 bestätigte eine prospektive Studie hohe Plasma-Cholesterinspiegel als einen (unabhängigen) Risikofaktor von AD, wohingegen Daten der Framingham-Studie ein Jahr später keinen Zusammenhang aufzeigen (Kivipelto et al., 2002; Tan et al., 2003). Eine meta-Analyse über 10 Studien aus den Jahren 1986-1999 zeigt, dass die durchschnittlichen Cholesterinspiegel in AD-Patienten sogar unter denen von altersgleichen Kontrollen lagen, wobei die Unterschiede jedoch sehr gering waren (Knittweis et al., 2000). Insgesamt ergibt die Vielzahl an Studien keinen Konsens bezüglich einem Zusammenhang von Serum-Cholesterin und APP-Metabolismus im Gehirn.

Da die Alzheimer Demenz eine neurodegenerative Krankheit darstellt, ist jedoch vor allem der isolierte Cholesterinstoffwechsel im ZNS Objekt intensiver Forschungsarbeit. Experimentelle Daten bezüglich des 24-OHC Metabolismus im Zuge der Alzheimer Demenz scheinen kontrovers. Eine Reihe von Studien zeigt eine Zunahme der 24-OHC Spiegel im Plasma und in der Cerebrospinalflüssigkeit von Alzheimer Patienten (Lutjohann et al., 2000; Papassotiropoulos et al., 2002; Schonknecht et al., 2002), was darauf hindeutet, dass der Cholesterin *turnover* durch die Erkrankung erhöht wird.

Andere Studien hingegen belegen, dass der Plasmaspiegel an 24-OHC im fortgeschrittenen Stadium der Demenz signifikant gesenkt ist (Bretillon et al., 2000; Heverin et al., 2004). Eine mögliche Erklärung für die augenscheinlich widersprüchlichen Daten könnte sein, dass der Anstieg an 24-OHC die fortschreitende Neurodegeneration mit der einhergehenden Demyelinisierung widerspiegelt, während die beobachtete Reduktion in späteren Stadien der Erkrankung auf die verringerte Neuronenpopulation und damit der limitierten Expression von CYP46 zurückzuführen ist.

Der Zusammenbruch neuronaler Membranen zusammen mit der reduzierten Aktivität von CYP46 könnte eine Akkumulation von Cholesterin im Gehirn induzieren (Papassotiropoulos et al., 2000).

Zusätzlich zu der zentralen Rolle, die 24-OHC in der Cholesterin Balance zwischen ZNS und Peripherie zukommt, stellt das Oxysterol einen der potentesten endogenen Liganden des *Liver X Receptors* (LXR) dar, dessen Aktivierung als anti-amyloidogen und anti-inflammatorisch beschrieben wurde (Janowski et al., 1999; Cao et al., 2007). Unter anderem zählen ApoE und ABCA-1 zu der Gruppe der LXR-kontrollierten Gene (Liang et al., 2004). *In vitro* Experimente zeigen außerdem, dass 24-OHC zu einer verstärkten nicht-amyloidogenen APP-Prozessierung führt, was mit einer reduzierten β -Sekretase Aktivität assoziiert ist (Famer et al., 2007).

Die Spiegel an 27-OHC steigen im Zuge der Erkrankung an, was vermutlich auf einen reduzierten Metabolismus zurückzuführen ist (Heverin et al., 2004). Auch wenn *in vitro* Experimente keinen Effekt von 27-OHC auf die APP-Prozessierung zeigen, könnte der Befund einen Zusammenhang zwischen Hypercholesterinämie und AD darstellen (Famer et al., 2007; Björkhem et al., 2006).

Zusammengenommen deuten die experimentellen Daten daraufhin, dass Cholesterin eine kritische Rolle in der Generierung von A β zukommt. Der Mechanismus über den Cholesterin in den Prozess eingreift konnte bislang nicht eindeutig geklärt werden.

1.3.3.1. Statine

Aufgrund der eingangs beschriebenen Studien kommt Statinen eine besondere Rolle im Zusammenhang von Cholesterinmetabolismus und Alzheimer Demenz zu. Statine sind kompetitive und reversible Inhibitoren der HMG-CoA Reduktase, dem Schlüsselenzym der zellulären Cholesterin-Biosynthese (Hamelin und Turgeon, 1998). Das Enzym katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Umsetzung von zytosolischem HMG-CoA zu Mevalonat (Hamelin und Turgeon, 1998). Statine binden mit hoher Affinität an Teile des aktiven Zentrums der HMG-CoA Reduktase und wirken so als Übergangszustand-Analoga (Stryer, 2000).

Die primäre Indikation dient der Behandlung von Hypercholesterinämie. Statine senken dabei im Organismus nachhaltig den LDL-Spiegel und wirken so präventiv der Entstehung arteriosklerotischer Erkrankungen entgegen (Lousberg et al., 2001).

Strukturell zeichnet sich die Substanzklasse durch einen β -Hydroxy- δ -Lactamring aus, der über eine Ethylbrücke mit einem lipophilen Hydro-Naphthalin-Derivat verbunden ist (Hamelin und Turgeon, 1998). Die aktivierte Form bedarf einer hydrolysierten und somit geöffneten Lactamring-Struktur. Die hohe Affinität ist auf stereochemische Ähnlichkeiten der Statine mit 3S-HMG-CoA, dem natürlichen Substrat der Reduktase, zurückzuführen (Stryer, 2000).

Die Umsetzung von HMG-CoA zu Mevalonat stellt einen sehr frühen Schritt in der Cholesterin-Biosynthese dar, so dass die Inhibition durch Statine die Entstehung einer Reihe von Intermediaten verhindert (Übersicht: Bellosta et al., 2000). Die geringe Produkt-Selektivität der Statine führt zu einem breiten pharmakologischen Wirkungsspektrum, das unabhängig von der Cholesterinsenkung ist. Man unterscheidet daher zwischen cholesterinabhängigen und lipidunabhängigen, pleiotropen Statin-Effekten (Bellosta et al., 2000). Im Mittelpunkt der pleiotropen Effekte steht die Statin-induzierte Inhibition von Protein-Isoprenylierungen.

Statine bewirken demnach nicht nur eine Reduktion der Neusynthese von Cholesterin, sondern hemmen zusätzlich auch die Bildung von Farnesylpyrophosphat und Geranylgeranylpyrophosphat (Eckert et al., 2007). Protein-Isoprenylierungen stellen eine essentielle post-translationale Modifikation dar, die besonders im Rahmen von Zellproliferations- und Signaltransduktionsmechanismen eine wichtige Rolle spielt (McTaggart, 2005). Durch den Transfer von Isoprenoideinheiten bekommt die Proteinstruktur einen amphiphilen Charakter, der die Verankerung in der Membran ermöglicht (Zang und Casey, 1996). Eine Reihe von Transmembranproteinen erlangt so ihre physiologische Funktionalität (McTaggart, 2005).

Zu den wichtigsten Vertretern isoprenylierter Proteine zählt die Familie der monomeren „kleinen“ *G-Proteine (guaninnucleotidbindende Proteine)*. Sie wechseln zwischen einer inaktiven GDP-gebundenen Form und einem aktiven GTP-gebundenen Zustand. In Bezug auf die pleiotropen Statineffekte treten vor allem die Mitglieder Ras und Rho in den Vordergrund. Die Verankerung von Ras in der Plasmamembran bedarf der kovalenten FPP-Derivatisierung, während die Translokation von Rho GGPP-abhängig ist (Glomset und Farnsworth, 1994). Beide Proteine beeinflussen den zellulären Transport, die Motilität und die Proliferation. Außerdem tragen sie zur funktionellen Oberflächenbeschaffenheit der Zelle bei und regulieren die Transkription (Hall, 1998; Manser, 2002). Aufgrund dieser essentiellen und vielschichtigen Aufgaben geht man davon aus, dass eine Vielzahl der cholesterinunabhängigen Statineffekte auf die Beeinflussung der Funktionalität der G-Proteine zurückzuführen ist.

Unabhängig vom LDL-Spiegel wirken Statine anti-inflammatorisch und stimulieren die endotheliale NO-Synthase (Laufs et al., 1998, 2000). Gleichzeitig reduzieren sie die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), was zu vermindertem oxidativen Stress im Gefäßendothel führt (Werner et al., 2002). Eine Reihe von Studien deutet darauf hin, dass die pleiotropen Effekte maßgeblich zu der beobachteten Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen beitragen. Sowohl die CARE-Studie („*Cholesterol And Recurrent Events*“, Sacka und Ridker, 1999) als auch die LIPID-Studie („*Long-term Intervention with Pravastatin in Ischemic Disease*“, Simes et al., 2002) zeigen eine signifikante Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse nach der entsprechenden Statinbehandlung unabhängig vom

Ausgangs-LDL-Wert.

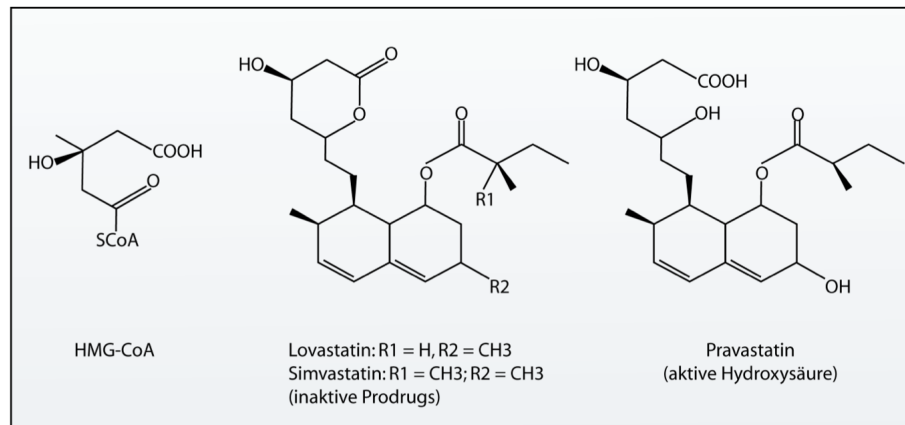


Abbildung 11 Grundstruktur ausgewählter Statine; Lovastatin und Simvastatin liegen als lipophile *prodrugs* vor, Pravastatin als hydrophile Hydroxysäure

Zurzeit befindet sich ein weites Spektrum von partial- oder vollsynthetischen Statinen auf dem Markt. Lovastatin wurde als erster Vertreter der Substanzklasse im Jahr 1979 aus der Fermentationslösung der Pilzpopulation *Monascus ruber* isoliert (Hamelin und Turgeon, 1998). Simvastatin und Pravastatin konnten als partialsynthetische Derivate aus Lovastatin gewonnen werden. Lovastatin und Simvastatin liegen als inaktive Vorstufen mit geschlossener Lactamstruktur vor, während Pravastatin bereits in der Grundstruktur die aktive Form der 3,5-Dihydroxysäure aufweist. Die Grundstruktur bestimmt maßgeblich die physikalisch-chemischen Eigenschaften der verschiedenen Statine (Corsini et al., 1999). Ein geöffneter Lactamring führt zu einer hydrophilen Struktur, die die Passage durch lipophile Kompartimente erschwert (Hamelin und Turgeon, 1998). Aus diesem Grund ist Pravastatin kaum ZNS-gängig, während Lovastatin und Simvastatin die Blut-Hirn-Schranke zu einem gewissen Grad passieren können (Botti et al., 1991; Saheki et al., 1994). Auch Cerivastatin, Fluvastatin, Pitavastatin und Atorvastatin zählen zu den lipophilen Vertretern der Substanzklasse (Eckert et al., 2007). Rosuvastatin ist ein relativ neues Derivat, das eine polare Methan-Sulfonamidgruppe trägt und daher in der Lipo-Hydrophilie zwischen Cerivastatin und Pravastatin eingeordnet werden kann (Schachter et al., 2005). Abbildung 11 zeigt die Grundstruktur einiger der beschriebenen Statine.

1.3.3.2. Selektive Inhibitoren der Cholesterin- und Isoprenoidsynthese

Viele Fragen, die sich in Bezug auf Statin-Therapien stellen, beruhen auf der Tatsache, dass die Inhibition der HMG-CoA Reduktase zu einem sehr frühen Zeitpunkt in einen vielschichtigen Synthesepfad eingreift und somit eine Vielzahl zellulärer Prozesse beeinflusst (Menge et al., 2005). Besonders die Reduktion der Isoprenoide Farnesylpyrophosphat (FPP) und des daraus generierten Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) stellt einen schwerwiegenden Eingriff in die Physiologie der Zelle dar (Cordle et al., 2005). Um selektiv die cholesterinabhängigen und cholesterinunabhängigen Effekte untersuchen zu können, müssen daher Inhibitoren eingesetzt werden, die ein definiertes Endprodukt hemmen, ohne in die Synthese anderer Intermediate einzugreifen. Der Proteintransfer von Isoprenoideinheiten wird von den beiden unabhängigen Transferasen Farnesyltransferase (FTase) und Geranylgeranyltransferase (GGTase) katalysiert (reviewed in Zhang und Casey, 1996). Die selektive Inhibition der beiden Enzyme führt zu einer Verminderung von Prenylierungen und imitiert somit die Statin-induzierte Reduktion von FPP, ohne jedoch in die Cholesterin Biosynthese einzugreifen. Im Zellmodell kann die Hemmung der FTase durch den zellgängigen Inhibitor FTi 277 und die Hemmung der GGTase durch den zellgängigen Inhibitor GGTi 286 induziert werden.

Um die Cholesterinsynthese zu reduzieren, ohne in den Isoprenoidstoffwechsel einzugreifen, müssen Inhibitoren verwendet werden, die keinen Einfluss auf die Synthese von FPP haben. RPR 107393A inhibiert die Squalen Synthase, welche die Dimerisierung von zwei Farnesylpyrophosphat Molekülen und somit die erste Reaktion unterhalb des „Verzweigungspunktes“ beider Synthesepfade katalysiert (Amin et al., 1997). Entsprechend führt der Inhibitor zu einer verminderten Produktion aller folgenden Intermediate einschließlich des Endproduktes Cholesterin, ohne aber die Menge an Mevalonat und FPP zu reduzieren. In Studien an Rattenleberzellen zeigte RPR 107393A eine effizientere Inhibition der Cholesterinbiosynthese als Lovastatin und Pravastatin (Amin et al., 1997). BM 15.766 inhibiert die 7-Dehydrocholesterol Δ^7 Reduktase und damit den letzten Schritt der Cholesterinsynthese (Refolo et al., 2001).

Folglich kommt es zu einer definierten Reduktion des Endproduktes Cholesterin, ohne das die Synthese anderer Intermediate gestört wird. Der Inhibitor wurde ebenfalls bereits im Tiermodell eingesetzt und führte in transgenen Mäusen zu einer signifikanten Reduktion der Plasmaspiegel von Cholesterin (Refolo et al., 2001).

Eine weitere Substanz, die selektiv mit der Cholesterinsynthese interagiert ist U 18666A. Der Inhibitor greift an mehreren Stellen in den Cholesterinmetabolismus ein. Zum einen wird die Substanz als Inhibitor der Desmosterol Reduktase und der Oxidosqualen Zyklase beschrieben, zum anderen blockiert U 18666A den intrazellulären Cholesterintransport (Runz et al., 2002; Yamazaki et al., 2001). Alle beobachteten Effekte sind Isoprenoid-unabhängig. Abbildung 12 zeigt die Angriffspunkte der beschriebenen Inhibitoren im Cholesterinbiosynthesepfad.

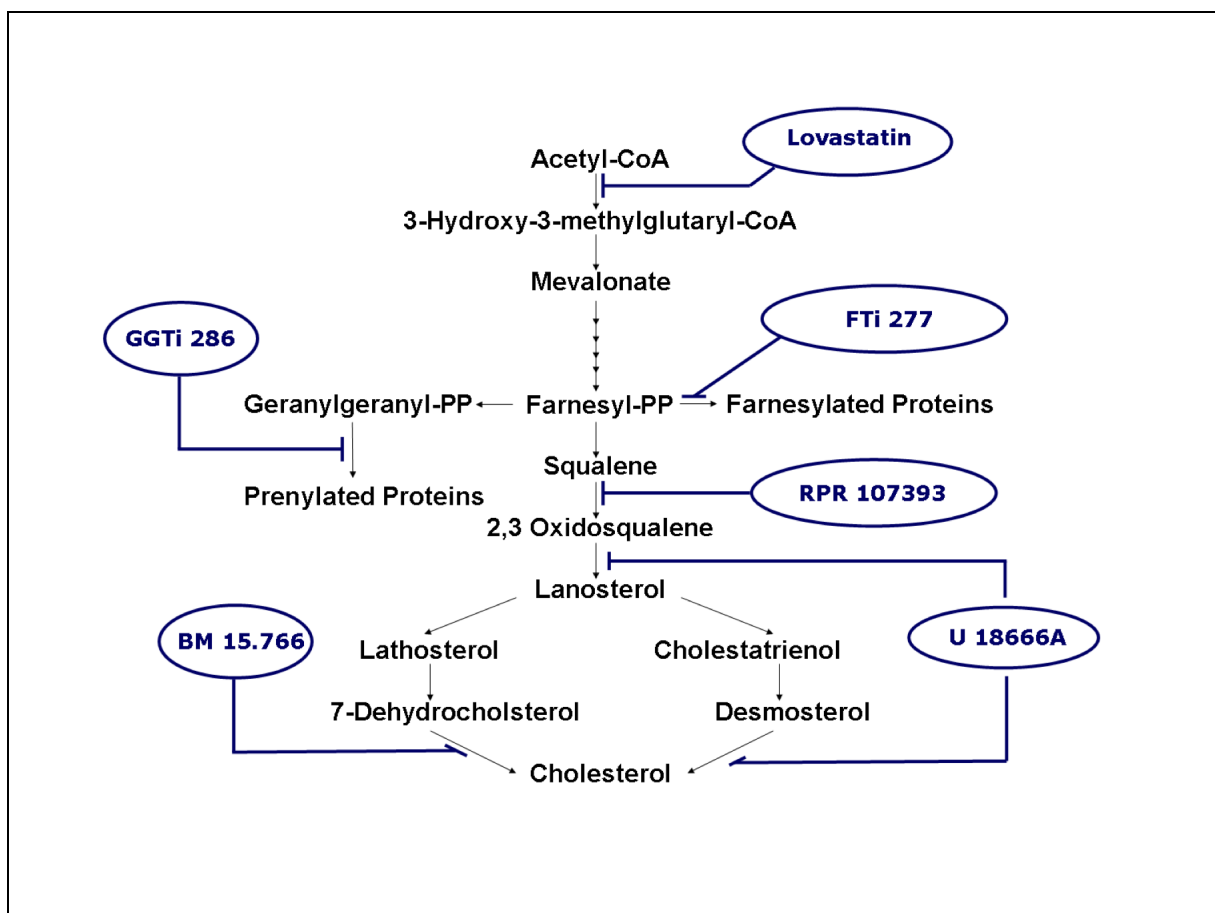


Abbildung 12 Angriffspunkte der beschriebenen Inhibitoren in der Cholesterinbiosynthese

1.4. Membranen – zentraler Schauplatz der Alzheimer-Pathogenese

1.4.1. Aufbau

Membranen sind blattartige Strukturen mit einer Dicke von 6-10nm (Stryer, 2000). Sie bestehen hauptsächlich aus Lipiden und Proteinen, wobei das anteilige Verhältnis beider Komponenten je nach zellulärem Kompartiment stark variiert (Graham und Higgins, 1998). Alle Membranlipide sind amphiphile Moleküle, d.h. sie besitzen einen hydrophilen und einen hydrophoben Anteil (Graham und Higgins, 1998). Im wässrigen Milieu bilden sie daher spontan geschlossene bimolekulare Strukturen aus, so dass nur die hydrophilen Molekülanteile mit der wässrigen Phase in Kontakt kommen. Die Lipiddoppelschicht ist die energetisch günstigste Anordnung einer Membran, bei der die Lipide und Proteine durch nichtkovalente Kräfte von kooperativem Charakter zusammengehalten werden (Stryer, 2000). Es ergeben sich zwei „Membran-Blätter“ (cytofacial und exofacial), die in allen biologischen Membranen asymmetrisch aufgebaut sind, das heißt, dass sich Innen- und Außenseite einer Membran in der Protein- und Lipidzusammensetzung unterscheiden. Die Strukturen sind jedoch keineswegs statisch, sondern lassen sich vielmehr als flüssig, bzw. ineinander gelöst beschreiben. Die Lipidmoleküle und Proteine diffundieren dabei rasch durch die laterale Membranebene, sofern sie nicht durch spezifische Wechselwirkungen festgehalten werden. Die Definition dieses Flüssig-Mosaik Modells geht auf Singer und Nicholson zurück, die 1972 Membranen als „zweidimensionale Lösungen gerichteter Proteine und Lipide“ beschrieben. Das Modell wurde kürzlich aktualisiert (Singer und Nicholson et al., 1972; Jacobson et al., 1995).

Die Lipiddoppelschicht bildet eine Permeabilitätsschranke, die das intrazelluläre Milieu vom Extrazellularraum trennt und nur die gerichtete und kontrollierte Passage von bestimmten Ionen und gelösten Molekülen zulässt (Maxfield und Tabas, 2005). Man unterscheidet drei Hauptklassen von Membranlipiden: Phospholipide, Glycolipide und Cholesterin (Stryer, 2000). Die unterschiedliche Zusammensetzung der Membranlipide gliedert die Membran in verschiedene Kompartimente und schafft so das geeignete Milieu für die Aktivität spezifischer Membranproteine (Yeagle, 1991; Gimpl et al., 1997). Der durchschnittliche Proteingehalt einer Plasmamembran liegt bei ~50% (Stryer, 2000).

Die Proteine bilden eine Vielzahl an spezifischen Pumpen und Kanälen, sowie Rezeptoren und Enzymen, die Zell-Zell-Kontakte und Signaltransduktionsprozesse koordinieren und vermitteln (Graham und Higgins, 1998). Membranproteine lassen sich als peripher oder integral klassifizieren. Integrale Proteine stehen in intensiver Wechselwirkung mit den Kohlenwasserstoffketten der Membranlipide und durchspannen in den meisten Fällen die Lipiddoppelschicht (Transmembranproteine). Dagegen sind periphere Proteine nur über elektrostatische Kräfte und Wasserstoffbrücken mit der Membran assoziiert bzw. an integrale Proteine gekoppelt. Da sie die Lipiddoppelschicht nicht durchspannen sind sie entweder im cytofacialen oder im exofacialen Membranblatt lokalisiert (Graham und Higgins, 1998).

1.4.2. Membranfluidität

Ein entscheidender Parameter für die Aktivität und Funktionalität von Membranproteinen ist die Membranfluidität (Maxfield und Tabas, 2005). Sie wird durch die Fettsäurezusammensetzung, die Temperatur und den Cholesteringehalt bestimmt (Stryer, 2000). Die Fettsäureketten der Membranlipide können in zwei unterschiedlichen Zuständen vorliegen. Entweder sie weisen eine geordnete starre Orientierung auf (Gel-Phase), in der sie gestreckt und eng aneinander gepackt vorliegen (Brown und London, 2000; Brown 2002), oder sie befinden sich in einem flüssig-kristallinen Zustand (*liquid-disordered* = l_d), in dem sie relativ ungeordnet und flexibel aneinander gelagert sind (Brown, 2002). Im geordneten Zustand weisen alle C-C Bindungen *trans*-Konformation auf, während sich im flüssigen Zustand einige in der *gauche*-Konformation befinden. Membranen in der Gel-Phase stellen zwar eine sehr gute Permeabilitätsbarriere dar, verhindern aber aufgrund der kompakten Anordnung der Fettsäureketten Lateral- und Rotationsbewegungen (Maxfield und Tabas, 2005).

Der Übergang von der starren in die flexible Phase kann induziert werden, in dem die Temperatur über die Schmelztemperatur der Membran gebracht wird (Stryer, 2000). Diese hängt zum einen von der Länge der Fettsäuren und zum anderen von deren Sättigungsgrad ab. Ungesättigte und kurze Fettsäureketten weisen dabei die niedrigste Übergangstemperatur auf (Brown, 2002).

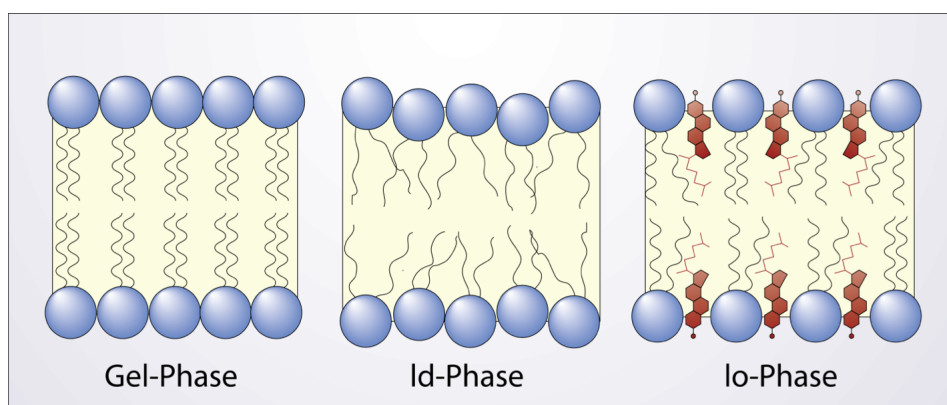


Abbildung 13 Phasenzustände biologischer Membranen

In Prokaryonten wird die Membranfluidität ausschließlich durch die Anzahl der Doppelbindungen und durch Variation der Kettenlänge reguliert. In Eukaryonten hingegen stellt das Cholesterin den Hauptregulator der Membranfluidität dar (Yeagle, 1985; Ohvo-Rekila et al., 2002). Das Steroidgerüst des Moleküls lagert sich so in die Lipiddoppelschicht ein, dass seine lange Achse senkrecht zur Membranebene liegt (Ohvo-Rekila et al., 2002; Maxfield und Tabas, 2005). Diese Interkalierung hemmt zum einen die Kristallisation der Fettsäuren, so dass Cholesterin in hoher Konzentration den Phasenübergang verhindert, zum anderen werden größere Bewegungen der Fettsäureketten sterisch behindert, was eine Rigidisierung der Membran bewirkt (Brown, 2002). Mit zunehmendem Cholesteringehalt werden die Fettsäureketten ähnlich kompakt angeordnet wie in der Gel-Phase, ohne jedoch die Freiheitsgrade der Lateral- und Rotationsbewegung einzuschränken. Diese Intermediärphase wird als *liquid-ordered* = l_o bezeichnet (Brown und London, 1998; Maxfield und Tabas, 2005).

Tatsächlich beschreibt die Gel-Phase mehr einen theoretischen Zustand, da biologische Membranlipide mit Ausnahme von Sphingomyelin und Glycosphingolipiden eine Schmelztemperatur von $\leq 25^\circ\text{C}$ haben. Biologische Membranen weisen daher meistens eine Mischung aus l_d - und l_o -Phasen auf (Maxfield und Tabas, 2005).

Cholesterin ist nicht gleichmäßig in der Membran verteilt. Gemäß der Asymmetrie der Membranblätter sind nahezu drei Viertel des Cholesterins in der cytofacialen und nur ungefähr ein Viertel in der exofacialen Seite der Membran lokalisiert (Avdulov et al., 1997; Kirsch et al., 2003). Der Hauptanteil an Cholesterin ist zudem in kondensierten Mikrodomänen in Form von Caveolen und Lipid Rafts angereichert, die entsprechend in der l_o -Phase vorliegen (Simons et al., 1997).

1.4.3. Modulatoren der Membranfluidität

Mehrfach ungesättigte ω -3 und ω -6 Fettsäuren stellen eine Art physiologischen Gegenspieler des Cholesterins dar. Aufgrund ihrer geknickten räumlichen Struktur bewirken sie eine lockere Zusammenlagerung der Membranbestandteile, die zu mehr Flexibilität der Fettsäureketten führt. ω -3 Fettsäuren, besonders die Docosahexaensäure (DHA), scheinen zudem den Gehalt an membranständigem Cholesterin in Neuronen zu verringern (Horrocks, 2004; Yehuda et al., 2002; Salem und Niebylski 1995).

Nicht nur Lipide können die Membranfluidität beeinflussen. Auch einige polymere Substanzen lagern sich ähnlich dem Cholesterin in der Membran ein und bewirken eine Rigidisierung, bzw. einen erhöhten Ordnungszustand der Fettsäureketten. Zu den bekanntesten *rigidizern* zählt die Gruppe der Pluronic, eine Substanzklasse aus amphiphilen Block-Kopolymeren von Ethylenoxid und Propylenoxid (Ramirez und Mutharasan, 1990; Clarke et al., 1995). Aufgrund der geringen Toxizität findet vor allem Pluronic F68 eine weite Anwendung in verschiedenen Bereichen der Medizin und Pharmakologie, beispielsweise als Cryoprotektor oder Emulgator von Medikamenten (Moghimi et al., 2000; Newman et al., 1998; Kabanov et al., 2002 und 2003).

Ethanol und verwandte Alkanole wie Benzyl Alkohol hingegen haben fluidisierende Eigenschaften. Sie bewirken eine Erniedrigung der Phasenübergangstemperatur (Chin und Goldstein, 1977) und eine Ausdehnung der Membran (Chin und Goldstein, 1978). Außerdem verändern sie die Oberflächenspannung und -ladung der Membranlipide (Chin und Goldstein, 1984).

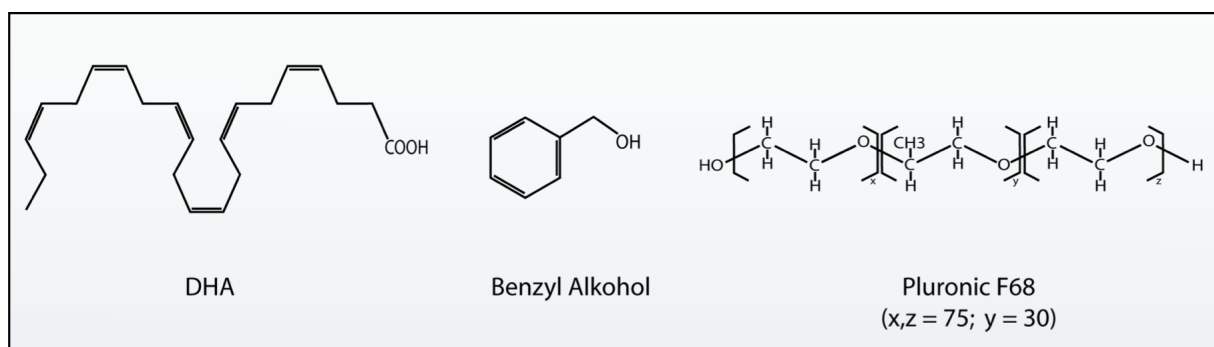


Abbildung 14 Struktur von DHA, Benzyl Alkohol und Pluronic F68

1.4.4. Lipid Rafts

Lipid Rafts sind dynamische Assemblierungen mit spezifischer Lipid- und Proteinzusammensetzung, die lateral durch die Lipiddoppelschicht einer biologischen Membran diffundieren (Brown und London, 1998; Simons et al., 1997). Die Mikrodomänen sind reich an Cholesterin, Sphingolipiden und Phospholipiden mit gesättigten Fettsäureketten, wodurch es zu einer engen und geordneten Aneinanderlagerung der Lipide kommt, so dass kompakte Strukturen entstehen, die sich inselartig von den umgebenden Bilayern aus ungesättigten Phospholipiden abgrenzen (Brown und London, 1998; Hooper, 1999; Laude und Prior, 2004; Simons und Ikonen, 1997; Simons und Toomre, 2000; Eckert et al., 2003). Das Cholesterin wirkt dabei wie ein Anker, der die Plattformen zusammenhält (Simons und Ehehalt, 2002). Wird es aus den Rafts entfernt, zerfallen die Strukturen weitestgehend (Simons et al., 1998). Einzelne Lipid Rafts können sich relativ frei durch die Membranebene bewegen oder sich zu größeren Domänen zusammenschließen (Brown und London, 1998; Simons et al., 1998). Etliche biochemische und biophysikalische Methoden wurden entworfen und durchgeführt, um die Größe, Form und Assemblierung von Lipid Rafts zu untersuchen (reviewed Mattson, 2005). Die Ergebnisse zeigen ein uneinheitliches Bild, welches vor allem unterstreicht, dass die Strukturen einer ausgeprägten Dynamik unterliegen (Matko und Szöllösi, 2002). Die Halbwertszeit einzelner Rafts, bzw. Raftassemblierungen liegt demzufolge im Nano- bis Millisekunden Bereich (Mattson et al., 2005)

Innerhalb der Raft Domänen lagern sich verstärkt Proteine mit bestimmten Lipidmodifikationen an. Konstitutiv assoziierte Proteine tragen in der Regel einen Glykosyl-Phosphatidylinositol (GPI)-Anker oder weisen Acetylierungen auf (Simons und Ehehalt, 2002). Auch Palmitoylierung führen zu einer verstärkten Raft-Assoziation (Brown und London, 1998). Andere Proteine lagern sich nur locker an die Strukturen an, wobei die reversible Assoziation und Dissoziation streng reguliert ist (Harder et al., 1998; Zacharias et al., 2002). Protein-Oligomerisierungen, beispielsweise nach der Bindung eines Liganden, erhöhen ebenfalls die Affinität gegenüber Lipid Rafts (Simons und Ehehalt, 2002).

Ein Großteil der assoziierten Proteine ist an Signaltransduktions- und Zelladhensionsprozessen beteiligt, was darauf hindeutet, dass die Mikrodomänen als funktionelle Plattformen innerhalb der Membran dienen (Brown und London, 1998). Zu den bekannten Raftproteinen zählen beispielsweise die Tyrosin-Kinasen der Src-Kinase-Familie, $G\alpha$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine und Transmembran-Proteine wie der EGF-Rezeptor, sowie Flotilin, das vielfach als „Raft-Marker“ verwendet wird (Simons und Toomre, 2000). Die funktionelle Aktivität der Mikrodomänen ist wahrscheinlich auf die Zusammenlagerung mehrere Domänen zu einem großen Verband zurückzuführen (Simons und Ehehalt, 2002). Die Fusion und Dissoziation der Domänen stellt dabei einen potentiellen Mechanismus zur Regulation von Proteininteraktionen dar. Einzelne Lipid Rafts haben einen Durchmesser von ungefähr 50nm und enthalten nicht mehr als 10-20 Proteine (Mattson et al., 2005). Die geringe Größe und die daraus resultierende, limitierte Anzahl an Proteinen macht es statistisch unwahrscheinlich, dass Interaktionspartner innerhalb einer Raft-Struktur aufeinander treffen (Simons und Ehehalt, 2002). Raft-Assemblierungen führen dazu, dass Signalproteine oder Enzym-Substrat Komplexe zusammengebracht werden und so in ihrer Funktion reguliert werden. Stimuli, die die Fusion unter physiologischen Bedingungen induzieren können, umfassen die Anheftung spezifischer cytoskelettaler Elemente oder auch die exofaciale Bindung von Liganden (Simons und Ehehalt, 2002).

Experimentell konnte dieser Zustand durch Antikörper induzierte Querverbindung von unterschiedlichen Proteinen simuliert werden (Ehehalt et al., 2003; Harder et al., 1998; Janes et al., 2000). Gemäß diesem Modell können Zellen die Aktivität membranständiger Signalmoleküle durch Translokation und Fusion von Lipid Rafts gezielt steuern (Mattson et al., 2005).

Die Depletion von Cholesterin zerstört die Integrität der einzelnen Lipid Rafts und verhindert deren Zusammenschluss, so dass ihre physiologische Funktionalität verloren geht (Simons und Toomre, 2000).

Der Zusammenschluss von Cholesterin und Sphingolipiden ist bei 4°C resistent gegenüber Detergenzien (Brown und Rose, 1992), ein Befund, der die Isolation und damit *in vitro* Untersuchungen an Lipid Raft Domänen ermöglichte. Die Heterogenität der erhaltenen Strukturen führte zu einer Reihe unterschiedlicher Bezeichnungen wie DRMs (*Detergenz Resistent Membranes*), DIMs (*Detergenz Insoluble Membranes*), CRDs (*Cholesterol Rich Domains*), etc.. Der Befund, dass keine zwei Raftisolierungen die gleiche Zusammensetzung, Größe und Struktur aufweisen zeigt, dass es sich um keine definierten Strukturen handelt, sondern um dynamische Assemblierungen (Pike et al., 2004). Hinzu kommt, dass möglicherweise auch der Aufreinigungsprozess die Zusammensetzung der Rafts verändert (Zajchowski und Robbins, 2002). Bei der Vielzahl an unterschiedlichen Methoden führen vor allem Detergenz- und nicht-Detergenz Isolierungen zu unterschiedlichen Ergebnissen (Eckert et al., 2004). Letztlich sollte sich daher die Definition von Lipid Rafts mehr auf die Funktionalität der Domänen und nicht auf die Methode der Isolierung beziehen (Pike et al., 2004).

Obwohl Cholesterin bereits im ER synthetisiert wird, findet die Assemblierung von Lipid Rafts in Säugetierzellen erst im Golgi Komplex statt, wo die Sphingolipide gebildet werden (Brown und London, 1998). Die Membranzusammensetzung der einzelnen Zellkompartimente weist eine zunehmende Anreicherung beider Lipide vom ER bis zur Plasmamembran auf. Die Beobachtung deutet darauf hin, dass Lipid Rafts vom retrograden Transport zwischen Golgi und ER ausgeschlossen sind (Brugger et al., 2000). Durch die relative Anreicherung in der Plasmamembran gelangen die Rafts auch in den endozytotischen Kreislauf (Mukherjee und Maxfield, 2000).

1.4.5. Membranalterung

Der Cholesteringehalt neuronaler Membranen nimmt im Zuge des physiologischen Alterungsprozesses deutlich zu, so dass die Membranfluidität mit fortschreitendem Lebensalter immer mehr abnimmt (Wood et al., 1984; Igbavboa et al., 1996; Eckert et al., 2001). Auch die prozentuale Verteilung innerhalb der Membranblätter ändert sich, da das zusätzliche Cholesterin hauptsächlich im exofacialen Membranblatt eingebaut wird, während der Gehalt der cytofacialen Seite konstant bleibt (Igbavboa et al., 1996). Das anteilige Verhältnis einzelner Membranlipide zueinander, sowie die Phospholipid/Protein Ratio unterliegen ebenfalls alterungsbedingten Veränderungen, was zu einem veränderten Phasenverhalten der Membran führt (Wood et al., 1984; Zhang et al., 1996). Ob dadurch die Integrität bzw. das Fusionsverhalten von Lipid Rafts betroffen ist, ist nicht bekannt.

1.4.6. Lipid Rafts und APP-Prozessierung

APP, BACE-1 und der aktive Komplex der γ -Sekretase konnten fraktionär in Assoziation mit Raft-Strukturen detektiert werden (Bouillot et al., 1996; Simons et al., 1998; Riddell et al., 2001). Hieraus ergibt sich auch auf der molekularen Ebene ein Verbindungspunkt zwischen dem Membrancholesteringehalt und der AD-relevanten APP-Prozessierung, zumal die Assemblierung der Raftstrukturen cholesterinabhängig ist und durch dessen Reduktion aufgehoben werden konnte (Simons et al., 1998; Riddell et al., 2001). Bereits 1998 wurde postuliert, dass die Assoziation von APP mit Lipid Rafts die Abeta-Bildung determiniert (Simons et al., 1998). Unterstützt wurde die Hypothese durch den Befund, dass die Depletion von membranständigem Cholesterin zu einer verminderten β -Sekretase Aktivität führt (Cordy et al., 2003; Fassbender et al., 2001).

Die nicht-amyloidogene Prozessierungsrate hingegen wird durch die Reduktion des Cholesterins gesteigert (Kojro et al., 2001), was darauf hindeutet, dass erstens beide Prozessierungswege in direkter Konkurrenz zueinander stehen und dass zweitens die Aktivität der α -Sekretase unabhängig von der Integrität der Lipid Rafts ist.

In Übereinstimmung dazu konnte ADAM 10 mit Hilfe von Detergenzien extrahiert werden (Kojro et al., 2001), was bedeutet, dass das Enzym größtenteils nicht in Assoziation mit Lipid Rafts vorliegt. Die beiden Prozessierungswege scheinen demzufolge in unterschiedlichen Membrankompartimenten stattzufinden (Eehalt et al., 2003). APP konnte in zwei Fraktionen in der Membran nachgewiesen werden, von denen eine mit Lipid Raft-Strukturen assoziiert ist, in denen die A β -Bildung stattfindet, während die andere außerhalb der cholesterinreichen Domänen lokalisiert ist und durch die α -Sekretase prozessiert wird (Eehalt et al., 2003).

Experimentell konnte die Raft-Abhängigkeit der amyloidogenen Prozessierung durch Antikörper induziertes *crosslinking* von APP und BACE-1 belegt werden (Eehalt et al., 2003). Beide Proteine kolokalisieren an der Membranoberfläche miteinander und mit PLAP, einem GPI-verankerten Raftprotein. Das Modell der Lipid Raft-abhängigen Fraktionierung erklärt, wie ein Protein zwei gegensätzlichen und konkurrierenden Prozessierungswegen unterliegen kann. Gleichzeitig wirft es die Frage auf, wodurch die Verteilung von APP bzw. die Zugänglichkeit der beiden Sekretasen zum Substrat reguliert wird (Eehalt et al., 2003).

Wie APP konnten Fraktionen von BACE-1 sowohl innerhalb als auch außerhalb von Lipid Rafts nachgewiesen werden (Simons et al., 1998; Eehalt et al., 2003). Beide Proteine bilden Homodimere, was zu einer erhöhten A β -Produktion führt und möglicherweise auf eine erhöhte Raft-Affinität infolge der Oligomerisierung zurückzuführen ist (Scheuermann et al., 2001; Eehalt et al., 2003).

Die Raftassoziation von Enzym und Substrat alleine ist jedoch kein Auslöser einer erhöhten Prozessierung. Auch endozytotische Prozesse scheinen eine essentielle Rolle bei der Generierung von A β zu spielen (Koo und Squazzo, 1994; Perez et al., 1999; Huse et al., 2000; Eehalt et al., 2003). Die transiente Expression von RN-tre oder der Dynamin II Mutation K44A inhibiert die Clathrin-abhängige Endozytose und führt in N2A Zellen zu einer drastischen Reduktion an A β , wohingegen die Spaltung der α -Sekretase nicht betroffen ist (Eehalt et al., 2003). Anders als bei der Depletion von Cholesterin kann keine verstärkte nicht-amyloidogene Prozessierung beobachtet werden, was darauf zurückgeführt werden kann, dass die Integrität der Rafts nicht gestört wird und somit die assoziierte APP-Fraktion weiterhin unerreichbar für die α -Sekretase bleibt (Eehalt et al., 2003).

Der inhibitorische Effekt kann durch die Vernetzung von APP und BACE an der Zelloberfläche aufgehoben werden, was darauf hindeutet, dass die Prozessierung auch an der Zellmembran stattfindet, sofern die Enzym-Substrat Zugänglichkeit gegeben ist (Eehalt et al., 2003). Diese wird durch den Prozess der Endozytose, ähnlich wie bei der Fusion von Lipid Rafts verstärkt, da die Einstülpung der Membran zu einer engen Nachbarschaft von verschiedenen Regionen führt (Abbildung 15). Nach der Reduktion von Cholesterin konnte zudem ein vermindertes Maß an Endozytose beobachtet werden (Rodal et al., 1999).

Zusammengenommen wird die APP-Prozessierung als membrangebundener Prozess in starkem Maße von Veränderungen in dem dynamischen System der Lipiddoppelschicht beeinflusst. Unklar ist bislang, welche Faktoren das physiologische Gleichgewicht der Prozessierung stören und so die Entwicklung der Alzheimer Demenz initiieren.

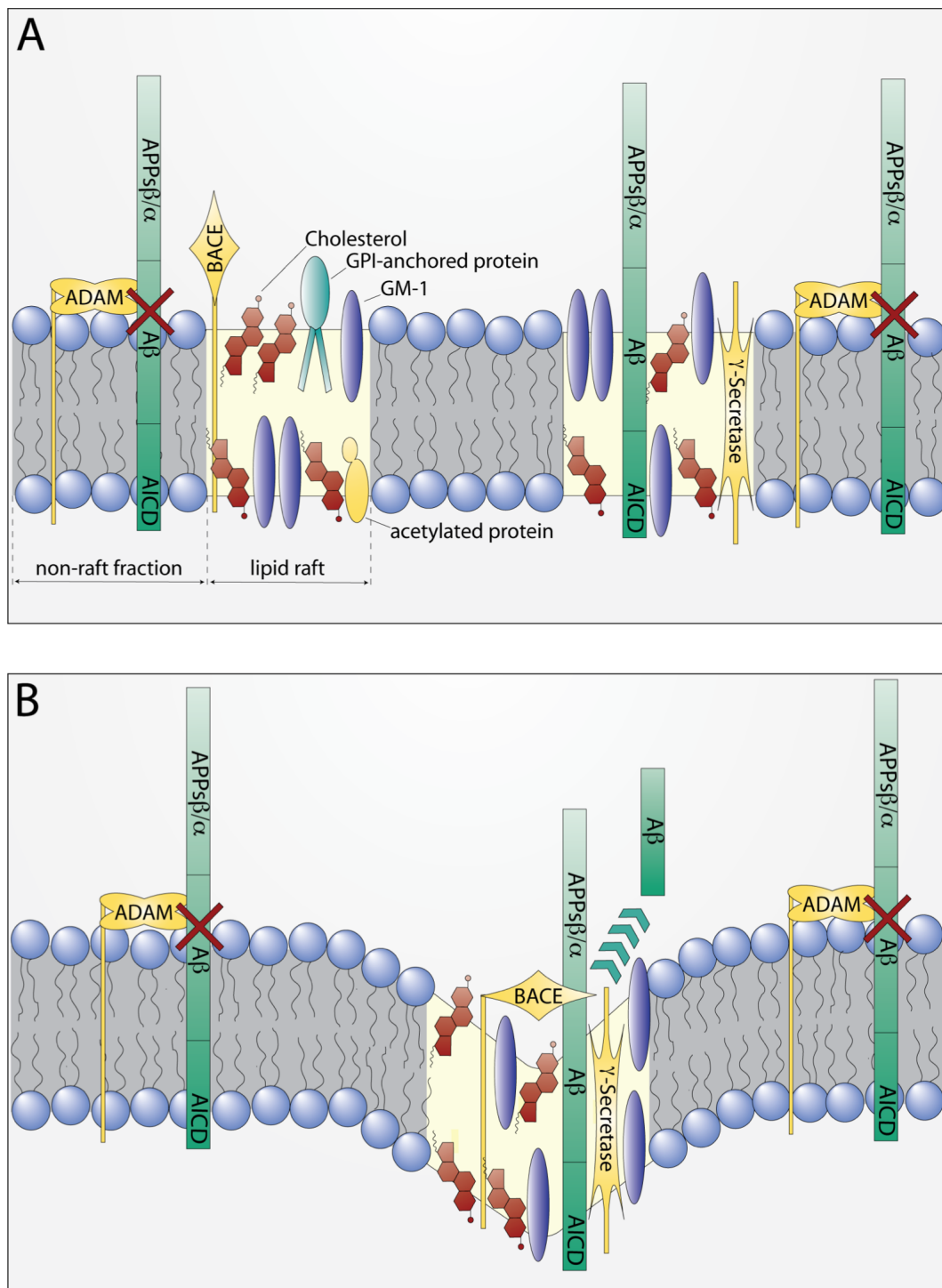


Abbildung 15 Modell der Lipid Raft abhängigen APP-Prozessierung. A) basale Verteilung; B) Verteilung im Zuge der Endozytose

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Im Zuge dieser Arbeit sollten zwei Fragestellungen experimentell bearbeitet werden. Zum einen sollte der Einfluss von cholesterinabhängigen und pleiotropen Statin-Effekten auf die A β -Produktion untersucht werden, um Aufschluss über einen möglichen Zusammenhang von Cholesteringehalt und APP-Prozessierung zu erhalten. Hierfür sollte zunächst die Behandlung mit Lovastatin charakterisiert werden. Zusätzlich sollten Inhibitoren eingesetzt werden, die selektiv die Cholesterinbiosynthese oder die Synthese der linearen Isoprenoide Farnesylpyrophosphat und Geranylgeranylpyrophosphat unterbinden und so cholesterinabhängige und -unabhängige Effekte von Lovastatin imitieren. Als Modellsystem sollten humane neuronale SH-SY5Y Zellen verwendet werden, die stabil mit humanem APP695 transfiziert vorliegen.

Die zweite Fragestellung befasst sich mit der Charakterisierung von physikalisch-chemischen Eigenschaften der Plasmamembran in Bezug auf die APP-Prozessierung. Im Mittelpunkt sollte hierbei die Rolle der Membranfluidität als möglicher Regulator der Sekretasenaktivität stehen. Auch hier sollte der potentielle Einfluss von Cholesterin untersucht werden. Für die Modulation der Zusammensetzung und den daraus resultierenden Fluiditätsänderungen sollte daher zunächst wiederum Lovastatin eingesetzt werden. Zusätzlich sollte die Membranfluidität unabhängig von Cholesterin durch den *fluidizer* Benzyl Alkohol und den *rigidizer* Pluronic F68 moduliert werden. Die Fluiditätsmessung sollte an intakten SY5Y-APPwt und HEK293-APPwt Zellen mit Hilfe der Fluoreszenzsonde TMA-DPH erfolgen. Allen Behandlungen sollte die Bestimmung der A β Spiegel mittels ELISA folgen. Für die genaue Charakterisierung der APP-Prozessierung sollten außerdem die membranständigen C-terminalen APP Fragmente C99 und C83, sowie das sezernierte Fragment APPs α mittels Westernblot detektiert werden. A β selbst bindet an die Plasmamembran und stört deren Integrität. Basierend auf diesem Befund sollte der Einfluss von oligomerem A β auf die Membranfluidität und die APP-Prozessierung in humanen HEK293-APPwt Zellen untersucht werden.

Um eine mögliche Reversibilität des Effektes zu detektieren, sollte invers die Freisetzung von Abeta in den transfizierten Zellen mittels γ -Sekretase Inhibitor DAPT längerfristig unterbunden werden. Für eine mechanistische Analyse sollte das Modell der Lipid Raft Assemblierung als Regulationsinstanz der Enzym-Substrat (APP-Sekretase) Zugänglichkeit überprüft werden. Hierfür sollte die Assemblierung durch Antikörper-Quervernetzung herbeigeführt und der Effekt auf die Membranfluidität und APP-Prozessierung bestimmt werden.

Insgesamt sollten im Zuge der Arbeit Zusammenhänge zwischen APP-Prozessierung, Cholesterinstoffwechsel und den physikalisch-chemischen Eigenschaften neuronaler Membranen experimentell erarbeitet werden.

2. Materialien

2.1. Allgemeine Chemikalien

Name	Hersteller / Bezugsquelle
Ammoniak	Merck, Darmstadt
A β (1-40)	Bachem, Weil am Rhein
Benzyl Alkohol	Fluka, Buchs
BM 15.766	Calbiochem, Schwalbach
Bovine Serum Albumin	Sigma Aldrich, München
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt
Cholera Toxin Untereinheit B + Alexa 555	Invitrogen, Karlsruhe
Cholera Toxin Untereinheit B Antikörper	Calbiochem, Schwalbach
Cholesterin Standards Preciset	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Complete® Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DAPT	Calbiochem, Schwalbach
Dimethylformamid (DMF)	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Diphenylhexatrien (DPH)	Sigma Aldrich, München
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Gibco / Invitrogen, Karlsruhe
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Gibco / Invitrogen, Karlsruhe
ECL Chemilumineszenz Reagenz	GE Healthcare, München
Ethanol	Merck, Darmstadt
Fluo-Abeta (1-40)	Advanced Bioconcepts
Fetal Calf Serum (FCS)	Gibco / Invitrogen, Karlsruhe
Filipin	Sigma Aldrich, München
FTi 277	Calbiochem, Schwalbach
Gel Mount™	Sigma Aldrich, München
Gentamycin Sulfat (G418)	Gibco / Invitrogen, Karlsruhe
GGTi 286	Calbiochem, Schwalbach
Hank's Balanced Salts	Sigma Aldrich, München
Hybond P PVDF Membran	GE Healthcare, München
Hydroxyethylpiperazinethansulfonat	Merck, Darmstadt
Hygromycin B	Gibco / Invitrogen, Karlsruhe
Immersol® 518	Zeiss, Jena
Lovastatin	MSD Sharp & Dohme GmbH, Haar
Magic Mark™	Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Methyl- β -cyclodextrin	Sigma Aldrich, München
Natriumazid (NaN ₃)	VWR International, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
NuPAGE 4-12% Gradienten Gele	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE Sample Buffer (4x)	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE MES SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe

Name	Hersteller / Bezugsquelle
NuPAGE Reducing Agent (10x)	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE Transfer Buffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe
OptiMEM	Gibco / Invitrogen, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich, München
Penicillin / Streptomycin (PenStrep)	Gibco / Invitrogen, Karlsruhe
Peroxidase (Horseradish)	Sigma Aldrich, München
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma Aldrich, München
Pluronic F68	Sigma Aldrich, München
Poly-L-Lysin	Sigma Aldrich, München
Pyren	Sigma Aldrich, München
RPMI Medium	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
RPR 107393A	Calbiochem, Schwalbach
Salzsäure (HCL)	Merck, Darmstadt
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Sucrose, ultrarein	Sigma Aldrich, München
Trimethylammoniumdiphenylhexatrien TMA-DPH)	Sigma Aldrich, München
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Sigma Aldrich, München
Trypanblau-Lösung (0,4%)	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin	Gibco / Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Sigma Aldrich, München
U 18666A	Calbiochem, Schwalbach
Ultraglutamin	Gibco / Invitrogen, Karlsruhe
Western Breeze Blocker Diluent A	Invitrogen, Karlsruhe
Western Breeze Blocker Diluent B	Invitrogen, Karlsruhe

2.2. Geräte und Materialien

Name	Hersteller / Bezugsquelle
Autoflow, Hera Safe, Heraeus HS18	Heraeus-Instruments, Hanau
Brutschrank Modell BB6220	Heraeus-Instruments, Hanau
Branson Sonifier, Cell Disrupter	Branson Ultrasonics, Danbury
Combitips®	Eppendorf, Hamburg
Counter Modell Wallac 1409	Wallac Distribution GmbH, Freiburg
Deckgläschen	Superior, Merck Eurolab GmbH, Frankfurt
Elektrophoresekammer	Invitrogen, Karlsruhe
Eppendorf-Rack, 80 <i>well</i>	Roth, Karlsruhe
Falcon-Röhrchen (15 & 50ml)	Greiner, Frickenhausen
Fluoreszenzspektrometer SLM Aminco Bowman Series 2	SLM Instruments, Urbana
Fluoreszenzmikroskop Nikon Eclipse E800	Nikon, München
Gefrierschränke (-20°C)	Liebherr-Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen
Gefrierschrank (-80°C)	Heraeus, -Instruments, Hanau
Kryoröhrchen Modell Cyro-S (2ml)	Greiner, Frickenhausen
Kühlzentrifuge Modell GS-6R	Beckmann, München
Kühlzentrifuge Modell J2-21	Beckmann, München
Kulturschalen (10mm)	Dunn Labortechnik, Asbach
Magnetrührer Modell Variomag	Mono, München
Mikrotiterplatten 96 <i>well</i>	Greiner, Frickenhausen
Multipipette	Eppendorf, Hamburg
Neubauer-Zählkammer	Merck, Darmstadt
Orbitalschüttler Modell Promax1020	Heidolph, Kelkheim
Parafilm	Roth, Karlsruhe
Pasteurpipetten	Merck, Darmstadt
pH-Meter Modell CG825	Schott, Hofheim
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipetus®-Classic	Hirschmann, Frankfurt
Potter mit Teflonpistell	Braun, Melsungen
Pottergläschen (5ml)	Braun, Melsungen
PVDF-Membran	GE Healthcare, München
Quarzküvette Modell 101-QS 10mm	Helma, Mühlheim
Reaktionsgefäße (1,5 & 2ml)	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge Modell 18-70M	Beckmann, München
Rotoren	Beckmann, München
Vortexer Modell Vortex-Genie	Roth, Karlsruhe
Zentrifugenröhrchen	Beckmann, München

2.3. Kits

Name	Hersteller / Bezugsquelle
A β (1-40) ELISA	Biosource / Invitrogen, Karlsruhe
A β (1-42) ELISA	Biosource / Invitrogen, Karlsruhe
BACE-Aktivität	MobiTech, Kiel
CHOL Nr.2016630	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

2.4. Antikörper

2.4.1. Primärantikörper

Klon	Detektion	Hersteller / Bezugsquelle
C1/6.1 – anti-Maus	APP; C83; C99	Paul M. Mathews
6E10 – anti-Maus	APP, APP α	Signet Labs, Freiburg
GAPDH – anti-Maus	GAPDH	Chemicon, Schwalbach

2.4.2. Sekundärantikörper

Spezies	Hersteller / Bezugsquelle
anti-Maus	Chemicon, Schwalbach
anti-Kaninchen	Chemicon, Schwalbach

2.5. Lösungen und Puffer

2.5.1. Puffer

PBS-Puffer

Das 10fach Konzentrat wurde mit Millipore-Wasser 1:10 verdünnt und auf einen pH-Wert von 7,4 bei 37°C eingestellt. Gegebenenfalls wurden 50ml des Puffers mit einer Tablette des Protease Inhibitor-Cocktails *Complete* (Firma Roche) versetzt. Der Puffer wurde bei 4°C gelagert.

HBSS-Puffer

Das HBSS-Pulver wurde in 990ml Millipore-Wasser gelöst. Anschließend wurden 5ml CaCl₂- und MgSO₄-Lösung (je 200mM), sowie 2.358g HEPES hinzugefügt. Der pH-Wert wurde bei 37°C auf 7,4 eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

Tris-HCL Puffer

Puffer III	Tris-HCL 5mM, pH8,5
Puffer IV	Tris-HCL 5mM, pH7,4
Puffer V	Tris-HCL 50mM, pH7,4

2.5.2. Allgemeine Lösungen

Brij® 35- Lösung	5% in Puffer IV
DPH-Stammlösung	0,1mg/ml in DMSO
Gradient III	1,5M Sucrose; 10mM HEPES; 0,25mM EDTA; pH7,4
Protein Reagenz A (BioRad)	alkalische Kupfer-Tatratlösung
Protein Reagenz B (BioRad)	Folin-Ciocalteu-Reagenzlösung
Pyren-Stammlösung	1mM in DMF
(TMA-)DPH-Stammlösung	5mM in DMF

2.5.3. Lösungen für die Cholesterin-Bestimmung

<u>Lösung 1</u>	Phenol	188.22mg/100ml
	Methanol	5.93g/100ml
	M β CDX	1g/100ml
	Puffer V	ad 100ml
	pH	7.7
<u>Lösung 2</u>	4-Aminophenanzon	40.64mg/100ml
	Methanol	5.93g/100ml
	Brij 35	0.4g/100ml
	Puffer V	ad 100ml
	pH	7.7
<u>Enzymlösung</u>	Cholesterin-Oxidase (<i>cellulomonas sp.</i>)	12U/ml
	Peroxidase	8U/ml
	Puffer IV	ad 1ml
<u>Emulgatorlösung</u>	15% Brij35 in Puffer IV	

2.5.4. Lösungen für die Western Blot-Analyse

<u>TBST-Lösung (1x)</u>	Tris-Base	3g
	NaCL	8g
	TBS	500ml
	Tween 20	1ml
	H ₂ O _{bidest}	ad 1Liter
<u>Azid-Lösung (100x)</u>	Natriumazid	2%
<u>Sekundär-Antikörper</u>	1x TBST	10ml
	Sek. AK	15µl
<u>Blocker-Lösung</u>	Blocker Diluent A	2ml
	Blocker Diuent B	3ml
	Millipore-Wasser	5ml
<u>Laufpuffer</u>	NuPage MES	
	SDS Puffer (20x)	50ml
	H ₂ O _{bidest}	950ml
	NuPage Antioxidant	1ml
<u>Transferpuffer</u>	NuPage Transfer	50ml
	Methanol	100ml
	H ₂ O _{bidest}	850ml
	NuPage Antioxidant	1ml

2.5.5. Lösungen für den MTT-Assay

<u>MTT-Reagenz</u>	MTT	5mg/ml PBS
<u>Solubilisierungslösung</u>	SDS	10% in 0,01M HCL

2.5.6. Lösungen für die Fluoreszenz-Aktivitätsmessungen

Octyl- β -D-Glucopyranosid 100mg/1ml Reaktionspuffer

Reaktionspuffer

Dansyl-GCVLS

Dithiotreitol	5mM
Magnesiumchlorid	5mM
Zinksulfat	10 μ M
Protease Inhibitor Cocktail	1 Tablette
in Puffer V	50ml

Reaktionspuffer

Dansyl-GCVLL

Dithiotreitol	1mM
Magnesiumchlorid	5mM
Zinksulfat	50 μ M
Kaliumchlorid	20mM
Protease Inhibitor Cocktail	1 Tablette
in Puffer V	50ml

2.6. Zellkultur-Medien

SH-SY5Y Zellen

Untransfiziert (SY5Y-ut)

RPMI 1640	500ml
FCS	50ml
MEM Vitamine	5ml
ne. Aminosäuren	5ml
Glutamin	5ml
Pyruvat	5ml
P/S	3ml

APP-transfiziert (SY5Y-APPwt)

DMEM	500ml
FCS	50ml
MEM Vitamine	5ml
ne. Aminosäuren	5ml
Glutamin	5ml
Pyruvat	5ml
P/S	3ml
Hygromycin	3ml

Medium für Lovastatin-Experimente: OptiMem plus Antibiotikum (P/S, Hygromycin)

HEK293 Zellen

Untransfiziert (HEK-ut)

DMEM	500ml
FCS	50ml
P/S	3ml

APP (*wildtyp & swedish*)-transfiziert (HEK-wt & HEK-sw)

DMEM	500ml
FCS	50ml
P/S	3ml
G418	3ml

Medium für Lovastatin-Experimente

DMEM	500ml
UltrosorG	10ml
P/S	3ml
(G418	3ml)

3. Methoden

3.1. Zellkultur

3.1.1. Passagieren

Das Passagieren erfolgte bei allen verwendeten Zell-Linien gleichermaßen. Bei einer konfluenten Zelldichte von 80-90% wurde das Medium entfernt, um die Zellen zu trypsinieren (1 Minute, 1ml Trypsin). Die Wirkung des Trypsins wurde durch die Zugabe von frischem Medium abgestoppt. Die Zellen konnten im Anschluss einfach von der Kulturschale abgelöst und in 1:10facher Verdünnung auf neue Kulturschalen verteilt werden. Die transfizierten Zell-Linien wurden höchstens 10mal passagiert, um den Erhalt der Transgene zu gewährleisten.

3.1.2. Einfrieren

Das Einfrieren neuer Stammkulturen erfolgte nach dem ersten Passagieren einer frisch aufgetauten Kultur. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 60-80% von der Kulturschale abgelöst und in einem sterilen Falcon bei 1000rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 500µl Einfriermedium A (DMEM, 30% FCS) resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Nach der Zugabe von 500µl Einfriermedium B (DMEM, 30% FCS, 20% DMSO) wurden die Zellen in einer Einfrierbox für 2 Tage bei -80°C gelagert. Die langfristige Aufbewahrung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

3.1.3. Auftauen

Das Auftauen von frischen Stammkulturen musste sehr schnell geschehen, da das im Einfriermedium enthaltene DMSO die Zellen im getauten Zustand schädigt. Die Kryoröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff wurden im Wasserbad bei 37°C erwärmt. Direkt nach dem Antauen wurden die noch halb gefrorenen Zellen in ein steriles Falcon mit frischem Medium überführt und zentrifugiert. Das erhaltene Zell-Pellet wurde in 1ml Medium resuspendiert und auf einer Kulturschale mit 12ml Medium ausgesät.

3.1.4. Bestimmung der Zellzahl

Um die Zellzahl zu bestimmen wurden die Zellen mit frischem Medium von der Kulturschale abgelöst und in ein steriles 15ml-Falcon überführt. Nach einer 5minütigen Zentrifugation bei 1000rpm wurde der Überstand verworfen und das erhaltene Zell-Pellet mit 1ml frischem Medium aufgenommen. 10µl dieser Zellsuspension wurden mit 90µl Trypanblau-Lösung (0,4%) versetzt und mittels Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop ausgezählt.

3.2. Inkubationsprotokolle

3.2.1. Lovastatin

In dem standardmäßig verwendeten FCS-haltigen Medium ist es den Zellen möglich, ihren Bedarf an Cholesterin durch die Aufnahme der Serumbestandteile zu decken. Die Inhibition der Neusynthese durch Lovastatin führte daher zu keiner Senkung des zellulären Cholesteringehalts. Aus diesem Grund war es notwendig, die Zellen für die Zeit der Inkubation in einem cholesterinfreien Medium zu kultivieren. SY5Y-Zellen wurden für die Behandlungsdauer in serumfreiem OptiMEM-Medium kultiviert. HEK-Zellen zeigten eine hohe Empfindlichkeit gegenüber einem Serumentzug. Bereits nach 12 Stunden in OptiMem Medium lösten sich die Zellen vom Boden der Kulturschale ab. Aus diesem Grund wurden sie für die Statinbehandlung über mehrere Passagen hinweg an UltrosorG als cholesterinfreier FCS-Ersatz gewöhnt (Tabelle 3). Die Inkubation mit Lovastatin erfolgte jeweils für 48 Stunden. Die verwendeten Konzentrationen betragen 0,1; 0,5; 1 und 5µM).

	FCS	UltrosorG
1.Passage	75%	25%
2.Passage	50%	50%
3.Passage	25%	75%
4.Passage	0%	100%

Tabelle 3 Schrittweise Gewöhnung der HEK-Zellen an UltrosorG als serumfreier FCS-Ersatz

3.2.2. Selektive Inhibitoren der Cholesterin- und Isoprenoidbiosynthese

Um den Einfluss der pleiotropen, cholesterinunabhängigen Statineffekte auf die APP-Prozessierung zu untersuchen, wurden im Zuge der vorliegenden Arbeit verschiedene Stufen der Cholesterinbiosynthese selektiv inhibiert. Die verwendeten Substanzen verhindern entweder gezielt die Neusynthese von Cholesterin, ohne dabei die Entstehung der Isoprenoide zu beeinflussen, oder aber inhibieren die Isoprenylierungen, ohne den Cholesteringehalt der Zelle zu verändern.

Tabelle 4 zeigt die verwendeten Inhibitoren, sowie deren Wirkungsweise und die verwendeten Konzentrationen. Abbildung 16 zeigt den Cholesterinbiosynthese-Pfad und die Angriffspunkte der einzelnen Inhibitoren. Die Substanzen wurden gemäß den Herstellerangaben gelöst und gegebenenfalls in sterilem Kulturmedium verdünnt. Vor der Inkubation wurde das alte Medium mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt und durch angewärmtes, frisches Medium ersetzt. Die Kontrollzellen wurden mit der jeweils gleichen Menge an Lösungsmittel inkubiert. Alle Behandlungen wurden für 24 Stunden in Standard-Kulturmedium durchgeführt.

	Ziel-Enzym	Verwendete Konzentrationen
FTi 277	Farnesyltransferase	1µM
GGTi 286	Geranylgeranyltransferase	0,1; 1; 5µM
RPR 107393A	Squalen-Oxidase	0,1; 1; 5µM
BM 15.766	7-Dehydrocholesterol Δ^7 Reduktase	20µM
U 18666A	Desmosterol Reduktase, Oxidosqualen Zyklase	0,1; 1; 5; 10µM

Tabelle 4 Ziel-Enzyme und eingesetzte Konzentrationen der verwendeten Inhibitoren

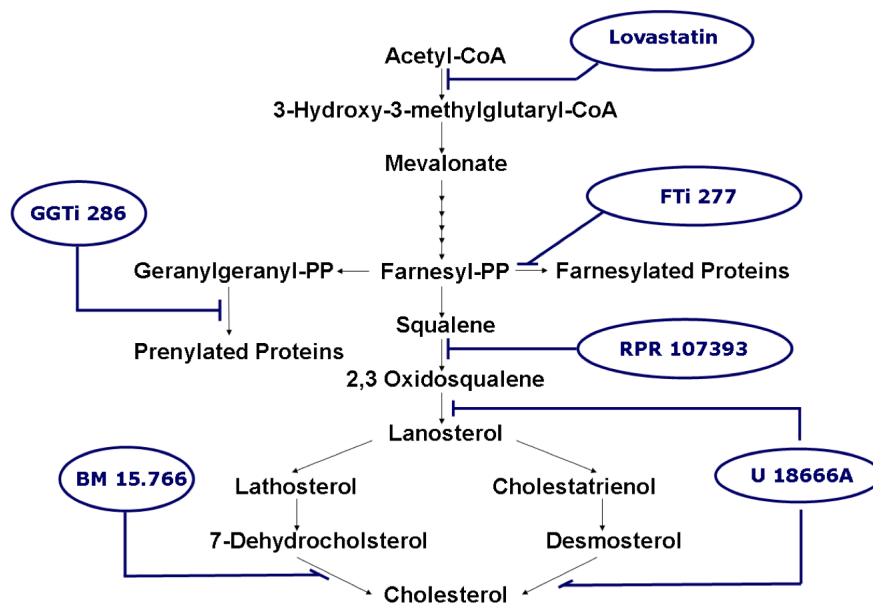


Abbildung 16 Angriffspunkte der verwendeten Inhibitoren in der Cholesterinbiosynthese

3.2.3. Benzyl Alkohol

Die Inkubation mit Benzyl Alkohol wurde in frischem Standard-Kulturmedium über 24 Stunden hinweg durchgeführt. Für die Behandlung wurden konfluente Zellkulturplatten verwendet. Die eingesetzten Konzentrationen betragen 1; 5 und 10mM.

3.2.4. Pluronic F68

Steriles Pluronic F68 wurde als 10%ige Lösung eingesetzt. Die Zellen wurden jeweils für 24 Stunden in frischem Standard-Kulturmedium inkubiert. Um die entsprechenden Konzentrationen von 4.5 und 7.5µM zu erhalten, wurde das Medium anteilig durch die Pluronic-Lösung ersetzt. In den Kontrollzellen wurde mit Wasser statt Pluronic substituiert. Die 4.5µM entsprechen dabei einer Pluronic Konzentration von 3%, die 7.5µM entsprechen 5%.

3.2.5. γ -Sekretase Inhibitor DAPT

DAPT wurde gemäß der Herstellerinformation in DMSO gelöst. Die Inkubation erfolgte über insgesamt 10 Passagen. Dabei wurde dem Kulturmedium der behandelten Zellen jeweils direkt beim Passagieren 1 μ M DAPT zugefügt. Das Medium der Kontrollzellen wurde mit der entsprechenden Menge an DMSO (2 μ l) versetzt. Die Zellen wurden jeweils im Verhältnis 1:10 passagiert, um eine Population zu generieren, die nahezu kein Abeta mehr sezerniert und somit über mehrere Passagen hinweg eine geringere membranäre Interaktion mit dem Peptid aufweisen sollte.

3.2.6. Amyloid-Beta Peptide

Die Inkubation mit Amyloid-Peptiden erfolgte in frischem Kulturmedium über einen Zeitraum von 24 Stunden. Sowohl fibrilläres als auch oligomeres Abeta wurden in Konzentrationen von 1 und 2 μ M eingesetzt. Höhere Konzentrationen zeigten im MTT-Assay einen deutlichen Abfall der Zellviabilität.

3.2.6.1. Fibrillen-Aggregation

Alle Amyloid-Peptide wurden als lyophilisiertes Pulver bezogen und bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert. Die Resuspension der Peptide erfolgte auf Eis und unter Verwendung von gekühlten Materialien, um eine vorzeitige Aggregation zu verhindern. Für die Ausbildung von fibrillären Strukturen wurde das Peptidlyophilisat in einer Konzentration von 500 μ M in ammoniakhaltigem (20% v/v) Puffer IV gelöst und als Aliquote von 60 μ l wieder bei -20°C eingefroren. 48 Stunden vor Versuchsbeginn wurde die entsprechende Anzahl an Aliquoten aufgetaut und mit Puffer IV auf 100 μ M eingestellt. Um eine vollständige Aggregation der Peptide zu erreichen wurden die Proben bis zur Inkubation bei 37°C inkubiert.

3.2.6.2. Oligomerisierung

Um die Oligomerisierung der Peptide zu erreichen wurde 1mg des lyophilisierten Pulvers in 200 μ l HFIIP gelöst. HFIIP stabilisiert alpha-helikale Strukturen und favorisiert die Ausbildung von Oligomeren. Die erhaltene Stammlösung von 500 μ M wurde in Aliquoten à 10 μ l in Eppendorfgefäße aufgeteilt und bei -20°C gelagert. 24 Stunden vor Beginn der geplanten Inkubation wurde der Peptidfilm in 2 μ l DMSO resuspendiert und mit DMEM auf eine Konzentration von 100 μ M eingestellt. Der Ansatz wurde dann für 24 Stunden bei 4°C inkubiert.

3.2.7. Cholera Toxin Subunit B

Um eine Quervernetzung von GM-1-Molekülen zu erreichen, wurden die Zellen zunächst in frischem Medium mit 1 μ M der ungiftigen Untereinheit B des Cholera Toxins inkubiert. Nach 20 Minuten wurde das Medium abgenommen und die Zellen dreimal vorsichtig mit warmem 1x PBS gewaschen, um nicht gebundenes Cholera Toxin zu entfernen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit einem anti-Cholera Toxin Subunit B Antikörper (1: 10 000, verdünnt in PBS). Nach 24 Stunden wurden das Medium der Zellen, sowie die Zellen selbst geerntet.

3.3. Biochemische Charakterisierung der Zell-Proben

3.3.1. Präparation des Zellhomogenats

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen jeweils 2x mit sterilem 1xPBS gewaschen und anschließend in 1xPBS + Protease Inhibitor Cocktail aufgenommen. Die Suspension wurde bei -80°C gelagert und vor der weiteren Verwendung mittels Sonifier und Potter vollständig lysiert und homogenisiert.

3.3.2. Präparation des Kulturmediums

Für die Analyse des Kulturmediums wurde jeweils 1ml des Mediums entnommen und mit 1µM PMSF versetzt. Die Proben wurden bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

3.3.3. Proteinbestimmung nach Lowry

MATERIALIEN:

- 96-*well* Platte
 - PBS-Puffer
 - BSA in PBS gelöst (100; 200; 300; 500 und 1000 μ M)
 - Kit-Reagenz A (Firma Biorad)
 - Kit-Reagenz B (Firma Biorad)
 - Orbitalschüttler
 - ELISA-Reader
-

Der Proteingehalt im Zellhomogenat wurde gemäß der Vorschrift von Lowry et al. (Lowry et al., 1951) ermittelt. Bei der Reaktion bildet sich zunächst im alkalischen Milieu ein Kupfer-Protein-Komplex, der im Folgenden die stöchiometrische Reduktion eines Phosphomolybdat-Phosphowolfram-Reagenzes (Folin Ciocalteu Phenol-Reagenz) initiiert, woraus eine diskrete Blaufärbung resultiert. (Graham und Higgins, 1998). Die Proteinbestimmung wurde in 96-*well* Platten mit einem Probenvolumen von 5 μ l (PBS (Leerwert); Standard oder Probe) durchgeführt. Als Standards diente *Bovines Serum Albumin* (Stammlösung 1mg BSA /ml) in einer Konzentrationsreihe von 0,1 bis 1mg/ml. Der Ansatz wurde im Folgenden mit 25 μ l Kit-Reagenz A (alkalische Kupfertartratlösung, Firma Biorad) und direkt anschließend mit 200 μ l Kit-Reagenz B (Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz, Firma Biorad) versetzt. Nach 15-minütiger Inkubation unter leichtem Schütteln (Orbitalschüttler Promax 1020, Firma Heidolph) wurde die Absorption der Lösung bei 620nm mittels ELISA-Reader (Modell Digiscan, Firma HighTech) gemessen.

3.3.4. Fluoreszenzspektroskopischer Aktivitätsnachweis von GGTi 286 und FTi 277

Die Inhibition von Farnsyltransferase und Geranylgeranyltransferase wurde mittels Fluoreszenzspektroskopie überprüft. Als Fluoreszenzfarbstoff diente ein Dansyl-Molekül mit einem jeweils Transferase-spezifischen CaaX-Rest (Abbildung 17). Die Fluoreszenzspektroskopie basiert auf der Wechselwirkung zwischen Licht und Materie. Die vom Chromophor aufgenommene Energie führt zu transienten Elektronenübergängen. Fallen die Elektronen nach einer gewissen Zeit wieder in den Grundzustand zurück, geben sie diese Energie zum Teil in Form von Licht ab. Der Vorgang wird allgemein als Lumineszenz bezeichnet. Erfolgt die Energieabgabe spontan nach der Anregung, spricht man von Fluoreszenz. Wird die Energie hingegen gespeichert und über einen längeren Zeitraum abgegeben, bezeichnet man den Vorgang als Phosphoreszenz. Man unterscheidet ein Anregungs- und ein Emissionsspektrum der Chromophore. Das Anregungsspektrum zeigt die Wellenlänge an, bei der die Substanz maximal emittiert. Das Emissionsspektrum ergibt sich nach Anregung des Chromophors und gibt Aufschluss über die Wellenlänge der maximalen Emission. In der Regel liegt die Anregungswellenlänge im kurzwelligen Bereich, da die aufgenommene Energie partiell strahlungslos abgegeben wird. Zusätzlich kann ein Teil der Fluoreszenz durch *Quencher* oder durch Energietransfer auf andere Moleküle innerhalb der Probe übertragen werden.

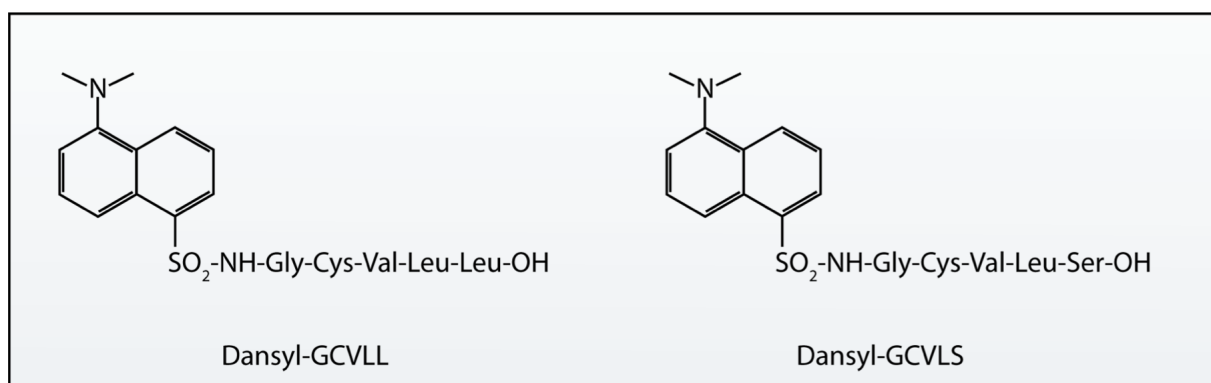


Abbildung 17 Struktur der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe

Die Aktivität des GGTase-I-Inhibitors GGTi 286 wurde mit Hilfe des Dansyl-Farbstoffes Dansyl-GCVLL überprüft. Um die Inhibition der FTase zu belegen, wurden Fluoreszenzmessungen mit dem Farbstoff Dansyl-GCVLS durchgeführt. Die beiden angehängten CaaX-Motive (GCVLL und GCVLS) werden spezifisch von den Transferasen erkannt. Ist das Enzym aktiv, katalysiert es die Prenylierung des Cystein-Restes in der Sequenz. Dadurch ändert sich die chemische Umgebung des Farbstoffes, was eine erhöhte Fluoreszenz zur Folge hat. Die Prenylierung von Dansyl-GCVLS durch die Farnesyltransferase führt zusätzlich zu einer Verschiebung des Fluoreszenzmaximums (Pompliano et al., 1992).

Die Inhibition der Enzyme kann daher anhand einer abgeschwächten Fluoreszenzintensität nachgewiesen werden.

MATERIALIEN:

- Reaktionspuffer (siehe 2.5.6.)
 - Octyl- β -D-Glucopyranosid
 - Quarzküvette
 - Fluoreszenzspektrometer
 - (Ultra-)Zentrifuge
 - Wasserbad
 - Dansyl-GCVLL bzw. Dansyl-GCVLS
 - Farnesylpyrophosphat bzw. Geranylgeranylpyrophosphat
-

Die behandelten Zellen wurden nach Ablauf der Inkubationszeit geerntet und mit 1xPBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen von 4 (FTi 277) bzw. 6 (GGTi 286) Platten zu einer Probe vereinigt und in 750µl des jeweiligen Reaktionspuffers resuspendiert. Die Proben wurden zunächst 20 Minuten bei 12 000g und anschließend 60 Minuten bei 60 000g (4°C, FTase) bzw. 30 000g (4°C, GGTase) zur Aufreinigung der Enzyme zentrifugiert. Die erhaltenen Überstände wurden für die Fluoreszenzmessung verwendet. Zur Normierung wurde der Proteingehalt der Proben bestimmt und auf den Maximalwert eingestellt. Je 500µl der normierten Suspension wurden mit 10µl Octyl-β-D-Glucopyranosid versetzt und im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Nach der Zugabe von 5µl Farbstoff und 2µl Substrat erfolgte die zeitabhängige Messung der Fluoreszenzintensität.

3.3.5. Zell-Viabilität Assays

Zur Quantifizierung des Zelltods nach der Behandlung mit den verwendeten Inhibitoren wurden MTT- und ToxiLight-Assays durchgeführt.

3.3.5.1. MTT-Assay

Der MTT-Assay beruht auf der reduktiven Spaltung des Tetrazoliumsalzes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) zu einem farbigen Formazansalz (Abbildung 18). Der genaue Mechanismus der Reduktion ist bis heute nicht in allen Details aufgeklärt. Ursprünglich ging man davon aus, dass ausschließlich Enzyme, die am Elektronentransfer in der mitochondrialen Atmungskette beteiligt sind, die Formazanbildung verursachen. Mittlerweile konnte jedoch eine Reihe von NADH- bzw. NADPH-abhängigen Redoxenzymen identifiziert werden, die an der MTT-Reduktion beteiligt sind. Die Formazanbildung lässt daher Rückschlüsse auf die Integrität des zellulären Energiehaushaltes zu. Im Zuge des Assays werden die Salzkristalle solubilisiert und die Absorption der Lösung quantifiziert. Hohe Absorptionswerte weisen demzufolge auf intakte Zellen hin.

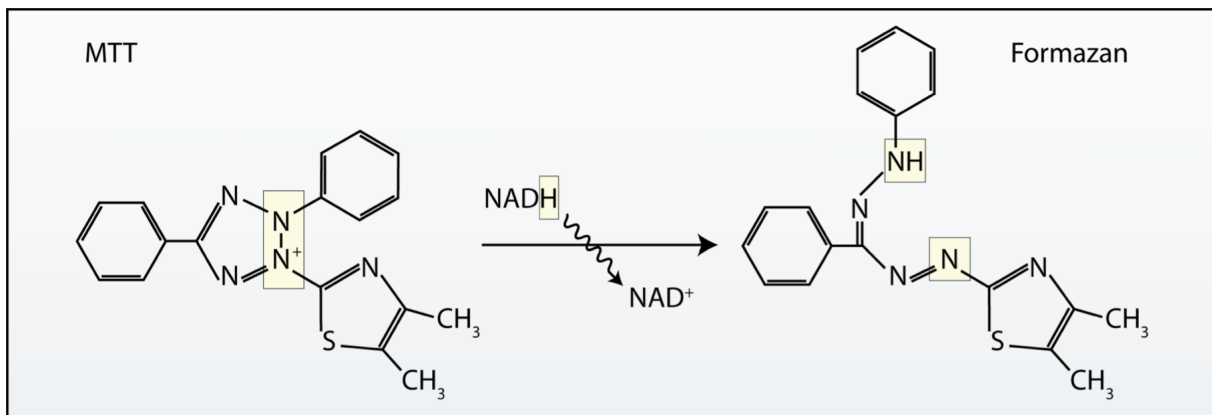


Abbildung 18 Prinzip des MTT-Assays

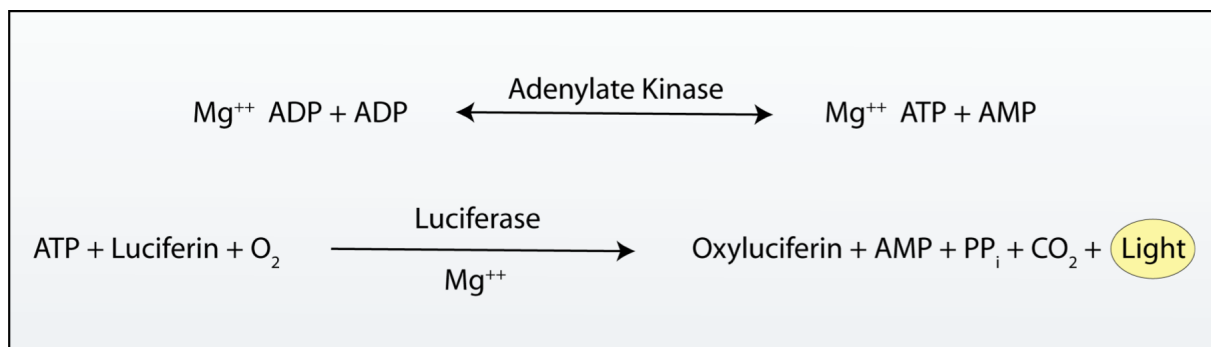
MATERIALIEN:

- 96-well Platte
- MTT-Reagenz (siehe 2.5.5.)
- Solubilisierungslösung (siehe 2.5.5.)
- ELISA-Reader

Der MTT-Assay wurde in einer 96-well Platte mit je 50 000 Zellen pro well durchgeführt. Für die Aussaat der Zellen wurde eine konfluent bewachsene Platte geerntet und ausgezählt. Die Zellzahl wurde mit frischem Medium auf 10^6 Zellen pro Milliliter eingestellt. Entsprechend wurden die Kavitäten der Mikroplatte mit je 50 μ l Zellsuspension befüllt. Zum Anwachsen der Zellen wurde die Platte über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Zugabe von 50 μ l frischem Medium mit den darin gelösten Inhibitoren. Die Kontrollzellen erhielten ebenfalls 50 μ l Medium mit der entsprechenden Menge an reinem Lösungsmittel. Drei Stunden vor Ablauf der Inkubationszeit wurde jedem well 20 μ l MTT-Reagenz zugesetzt, um die Bildung der Formazankristalle zu initiieren. Um die Salze zu lösen erfolgte nach Ablauf der Inkubationszeit die Zugabe von 100 μ l Solubilisierungslösung. Am nächsten Tag konnte die Absorption der Lösung photometrisch bei 620nm quantifiziert werden.

3.3.5.2. ToxiLight-Assay

Der ToxiLight-Assay beruht auf der Biolumineszenz der Adenylat Kinase (AK), die in allen eukaryontischen Zellen exprimiert wird. Bei einer Störung der Zell-Integrität, beispielsweise durch Schädigungen der Plasmamembran, kann die intrazellulär lokalisierte AK aus den Zellen austreten und in das umgebende Medium gelangen. Im Zuge des Assays wird die Menge an freigesetzter AK durch den folgenden Reaktionsmechanismus gemessen:



MATERIALIEN:

- weiße 96-well Platte
- ToxiLight-Reagenz (Cambrex)
- Positiv / Negativ-Probe (Cambrex)
- Lumineszenz-Reader (Victor)

Für den ToxiLight-Assay wurden die Zellen in Standard-Kulturschalen mit den entsprechenden Inhibitoren inkubiert. Nach Ablauf der Behandlungszeit wurden je 100µl des konditionierten Mediums in die Kavitäten der Mikroplatte überführt und mit 20µl ToxiLight-Reagenz versetzt. Nach einer Standzeit von 15 Minuten erfolgte die Quantifizierung der Lumineszenz. Zur Normierung wurden die ermittelten Werte auf den Proteingehalt des Zellhomogenats der Probe bezogen. Zusätzlich wurden gemäß den Angaben des Herstellers eine Positiv- und eine Negativ-Kontrolle durchgeführt.

3.3.6. Cholesterinbestimmung

3.3.6.1. Freies Cholesterin

MATERIALIEN:

- 96-well Platte
 - PBS-Puffer
 - Cholesterinstandards (50; 100; 200; 300 und 400 μ M)
 - Emulgatorlösung (15% Brij35 in Tris-HCL 5mM, pH7,4)
 - Lösung 1 (siehe 2.5.3.)
 - Lösung 2 (siehe 2.5.3.)
 - Enzymlösung (siehe 2.5.3.)
 - Brutschrank (unsteril, 37°C)
 - ELISA-Reader
-

Die quantitative enzymatische Bestimmung von freiem Cholesterin im Zellhomogenat oder in isolierten Plasmamembranen wurde basierend auf der CHOD-PAP-Methode (Cholesteroloxidase Peroxidase Aminophenazon Phenol-Methode) nach einem modifizierten Protokoll von Auerbach et al. (1990) durchgeführt. Das unveresterte Cholesterin wird dabei zunächst in Anwesenheit von Sauerstoff durch das Enzym Cholesteroxidase (aus *cellulomonas species*) zu 4-Cholesten-3-on und Wasserstoffperoxid umgesetzt. Das entstandene Wasserstoffperoxid bildet dann unter der katalytischen Wirkung der (Meerrettich-) Peroxidase mit 4-Aminophenazon und Phenol den roten Farbstoff 4-(p-Benzochinonmonoimino)-phenazon, dessen Farbintensität der Konzentration an freiem Cholesterin direkt proportional ist und bei 490nm photometrisch gegen einen Leerwert gemessen werden kann. Die verwendeten Lösungen wurden in unserem Labor entwickelt (Kirsch et al., 2004). Die Durchführung erfolgte wiederum in 96-well Platten, wobei jeweils 10 μ l Leerwert, Standard (50-400 μ g Cholesterin, Preciset, Firma Roche) oder Probe eingesetzt wurden.

Zur Erhöhung der Sensitivität wurde das Testmaterial zunächst für 15 Minuten mit 5µl einer 15%igen Brij35-Lösung (nicht-ionische Emulgatorlösung) inkubiert, was eine nahezu vollständige Extraktion des Cholesterins aus dem umgebenden Material bewirkt. Nach der Extraktion wurden die Proben mit jeweils 200µl Reagenz- bzw. Blanklösung für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Als Reagenzlösung wurde eine 1:1 Mischung aus Lösung 1 und mit einem 1/100 Anteil an Enzymlösung eingesetzt. Die Mischung bedarf einer Standzeit von 15 Minuten. Um die Eigentrübung der Probe zu ermitteln, wurde zusätzlich eine Blank-Lösung ohne Enzym eingesetzt. Die Auftragung der Proben erfolgte in Tripletts. Insgesamt wurden jeweils 6 Kavitäten befüllt, so dass drei Mess- und drei Blankwerte ermittelt werden konnten. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Platte bei 490nm (Digiscan, Firma HighTech) vermessen und die Differenz aus Reagenz- und Blankwert gebildet. Zur Normierung wurde die detektierte Menge an Cholesterin auf den Proteingehalt der Probe bezogen.

3.3.6.2. Gesamtcholesterin

MATERIALIEN:

- 96-*well* Platte
 - PBS-Puffer
 - Cholesterinstandards (50; 100; 200; 300 und 400 μ M)
 - Emulgatorlösung (15% Brij35 in Tris-HCL 5mM, pH7,4)
 - CHOL-Reagenz (Roche Diagnostics)
 - Brutschrank (unsteril, 37°C)
 - ELISA-Reader
-

Die enzymatische Bestimmung des Gesamtcholesterins verläuft prinzipiell analog zur Bestimmung des freien Cholesterins nach der CHOD-PAP-Methode. Der Reaktionskaskade ist lediglich die Hydrolyse von vorhandenen Cholesterin-Estern durch Cholesterolesterase vorgeschaltet. Das zusätzlich freigesetzte Cholesterin geht dann mit in die eigentliche Reaktion ein. Für die Bestimmung des Gesamtcholesterins wurde die Reagenzlösung CHOL der Firma Roche Diagnostics verwendet. Es wurden wiederum 10 μ l Leerwert, Standard oder Probe in einer 96-*well* Platte aufgetragen und 15 Minuten mit Emulgatorlösung inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben mit 200 μ l Kit-Reagenzlösung versetzt. Der Ansatz wurde für 1 Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend bei 490nm mittels ELISA-Reader vermessen. Die erhaltenen Cholesterinwerte wurden auf den zellulären Proteingehalt der Probe normiert.

3.3.7. Western Blot-Analyse

3.3.7.1. Probenvorbereitung

MATERIALIEN:

- *Reducing Agent* (Invitrogen)
 - *Sample Buffer* (Invitrogen)
 - Heizblock (90°C)
-

Um Proteine im Homogenat mittels Western Blot zu analysieren, wurden die Zellen wie unter 3.1. beschrieben gesammelt und der Gesamtproteingehalt mittels Lowry ermittelt. Die Proben wurden mit *Sample Buffer* (10x) und *Reducing Agent* (4x) versetzt und 10 Minuten lang bei 90°C inkubiert. Anschließend wurden freigesetzte DNA-Fragmente mit 5 Stößen Ultraschall zerstört und die Proben bei 5000rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Es wurden je nach Antikörper 20-50µg Protein pro Geltasche aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

3.3.7.2. Gelelektrophorese und Transfer

MATERIALIEN:

- Gelelektrophoresekammer (Invitrogen)
 - Gradientengele (NuPage 4-12%, Invitrogen)
 - Proteinmarker (*Magic Mark*, Invitrogen)
 - Laufpuffer (siehe 3.5.4.)
 - Blotkammer
 - Filterpapier
 - Pads
 - PVDF-Membran (GE-Healthcare)
 - Methanol
 - Transferpuffer (siehe 3.5.4.)
-

Die elektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgte in einem XCell II™ Blot Modul von Invitrogen (Einlauf: 60V, 8 Minuten; Auftrennung: 200V, 40 Minuten). Der Apparaturaufbau erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Entsprechend der Proteinbestimmung wurden jeweils 20-50µg Protein aufgetragen. Als Größenmarker wurden zusätzlich eine Tasche 5µl *Magic Mark* befüllt.

Für den Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran wurde diese zunächst 5 Minuten lang in Methanol und anschließend weitere 5 Minuten in Transferpuffer eingelegt. Als Blotkammer diente ebenfalls ein XCell II™ Blot Modul. Die Kammer wurde gemäß den Angaben des Herstellers zusammengesetzt und beladen. Der Transfer wurde bei 30V über 2 Stunden durchgeführt.

3.3.7.3. Blot-Entwicklung

MATERIALIEN:

- Blockerlösung (siehe 3.5.4)
 - TBST (siehe 3.5.4.)
 - ECL-Reagenzien (GE Healthcare)
 - Hyperfilm (GE Healthcare)
 - Entwickler, Stopp-Lösung und Fixierer (Kodak)
-

Um unspezifische Bindungen und damit Hintergrundsignale zu minimieren, wurde die Membran über Nacht mit Blockerlösung gesättigt.

Die Inkubationszeit der Primärantikörper 6E10 und C1/6.1 betrug 2 Stunden, die für GAPDH nur 1 Stunde. Anschließend wurde die Membran 4x für 10 Minuten mit 1xTBST gewaschen und anschließend für jeweils 1 Stunde mit dem Sekundärantikörper (15µl / 10ml) inkubiert.

Nach wiederholtem Waschen wurden die Proteine mittels ECL auf einem Hyperfilm sichtbar gemacht. Die peroxidase markierten Sekundärantikörper katalysieren dabei die Oxidation von Luminol, wodurch die zu detektierende Chemilumineszenz ausgelöst wird.

Für die Detektion von sezernierten Proteinen wurde das gesammelte Medium mit *Sample Buffer* und *Reducing Agent* versetzt und jeweils 25µl pro Tasche aufgetragen. Die Normierung der detektierten Bandenintensität erfolgte auf den Proteingehalt des Zellhomogenats.

3.3.8. Detektion von sezerniertem A β (1-42) und A β (1-40)

MATERIALIEN:

- PMSF
 - ELISA-Kit
 - ELISA-Reader
-

Um die Menge an sezernierten Abeta zu detektieren, wurde das Medium wie unter 3.2. beschrieben gesammelt. Die Präparation der Standards und die Durchführung des ELISA-Kits wurden gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei die Inkubation mit dem Abeta₍₁₋₄₂₎-Detektionsantikörper über Nacht erfolgte. Die Mikrotiterplatten wurden mittels ELISA-Reader vermessen.

3.3.9. Detektion von endogenem A β (1-42)

MATERIALIEN:

- Guanidin-Hydrochlorid
 - BSA
 - Tween
 - Ultrazentrifuge
 - ELISA-Kit
 - ELISA-Reader
-

Endogenes A β ₍₁₋₄₂₎ konnte nur in HEK-APPwt Zellen nachgewiesen werden, da die basale Produktion in SY5Y-APPwt Zellen unterhalb der Detektionsgrenze lag. Um genügend Material für die Bestimmung in HEK-APPwt Zellen zu bekommen, wurden 5 Platten zu einer Probe vereinigt. Die Zellen wurden mit dem Medium abgespült und 2 Stunden lang bei 20 000g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und die Zellen mit 1xPBS gewaschen. Das erhaltene Pellet wurde in 175 μ l Guanidin-Hydrochlorid (5M) resuspendiert. Um die Zellen vollständig zu lysieren, wurde die Suspension mehrfach mittels Sonifier beschallt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Da der ELISA stöempfindlich auf Guanidin-HCL Konzentrationen über 0,1 μ M reagiert, mussten die Proben 1:50 verdünnt werden. Hierfür wurde 1x PBS verwendet, welchem 1% BSA (m/v) und 5% Tween zugesetzt wurden (BSAT-PBS). Die Proben wurden nochmals bei 20 000g zentrifugiert, um Schwebeteilchen zu entfernen. Der erhaltenen Überstand wurde für den ELISA eingesetzt. Die Durchführung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers, mit über-Nacht Inkubation des Detektionsantikörpers.

3.3.10. Isolation der Plasmamembran

MATERIALIEN:

- PBS
 - Puffer III
 - Potter
 - Gradient 3
 - (Ultra-) Zentrifuge
 - Puffer IV
-

Um genügend Material für die Membranisolation zu bekommen, wurden die Zellen von 3 dicht bewachsenen Platten zusammengenommen. Die Zellen wurden zunächst 2x mit 1xPBS gewaschen. Das erhaltene Pellet wurde mit 5ml Puffer III resuspendiert und mittels Potter homogenisiert (15x; 1100rpm). Der Ansatz wurde 1 Stunde und 15 Minuten lang auf Eis inkubiert und alle 15 Minuten mittels Vortexer gemischt. Anschließend wurde die Suspension bei 20 000rpm für 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert, um die löslichen Bestandteile abzutrennen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 4ml Millipore Wasser aufgenommen. Nach erneutem homogenisieren (Potter, 15x; 1100rpm) wurde die wässrige Phase mit 4ml Gradient 3 unterschichtet. Mittels Ultrazentrifugation (68 000g, 45 Minuten, 4°C) wurde die Membranfraktion im Gradienten von den übrigen Zellbestandteilen abgetrennt. Nach der Gradientenzentrifugation wurde die obere wässrige Phase sowie die Grenzschicht, in der sich die Membranbestandteile befinden, abgenommen und erneut zentrifugiert (20 000rpm, 45 Minuten, 4°C). Das erhaltene Membran-Pellet wurde in 300µM Puffer IV aufgenommen und bis zur Verwendung bei -80°C eingefroren.

3.4. Membranfluiditätsmessungen

3.4.1. Grundlagen der Fluoreszenz-Polarisationsspektroskopie

Gemäß dem *Fluid-Mosaic*-Modell von Singer und Nicholson (1972) lassen sich biologische Membranen als eine dynamische Lipiddoppelschicht beschreiben, in der sich assoziierte Membranbestandteile (Proteine, Kohlenhydrate, etc.) relativ frei bewegen können. Insbesondere membranständige Proteine weisen eine hohe Lateralbeweglichkeit auf und können Rotationen um eine zur Membranebene senkrechte Achse durchführen. Die physiologische Fluidität der Plasmamembran ist sowohl für die Signaltransduktion als auch für die Aktivität der Membranproteine von entscheidender Bedeutung.

Für die Charakterisierung der Fluiditätseigenschaften einer Plasmamembran kann die relative Beweglichkeit von intramembranären Molekülen als Maß der Freiheitsgrade bestimmt werden. Bei der Fluoreszenz-Polarisationsspektroskopie wird eine membrangebundene Fluoreszenzsonde durch Bestrahlung mit linear polarisiertem Licht in einen energetisch ungünstigen Übergangszustand gebracht. Bei der Rückkehr in den stabileren Grundzustand kommt es zu einer diskreten Fluoreszenz-Emission. Die Polarisationsrichtung der emittierten Fluoreszenzstrahlung ist dabei von der Orientierung des Emissions-Übergangsdipolmoments und somit von der Beweglichkeit der angeregten Sonde innerhalb der Membran abhängig. Die Richtungsabhängigkeit mit der sich die fluoreszierenden Moleküle durch die Membran bewegen wird im Folgenden durch den Begriff der Anisotropie beschrieben. Diese lässt sich aus der gemessenen Polarisation berechnen (Lentz, 1988).

Je nach Bewegungsfreiheit der angeregten Fluoreszenzsonden kommt es über den Zeitraum der Fluoreszenz-Lebensdauer zu mehr oder weniger stark ausgeprägten Rotationen, welche die Polarisationsrichtung der Emissionsstrahlung verändern. Das Ausmaß dieser Emissionsdepolarisation ist somit proportional zum Verlust der anfänglich selektiven Orientierung der Fluorophore. Je stärker also ein Molekül im angeregten Zustand rotieren kann, umso geringer ist die Polarisation der emittierten Strahlung. Daraus folgt, dass sich Polarisation und Anisotropie umgekehrt proportional zur Fluidität einer Membran verhalten.

Niedrige Anisotropiewerte repräsentieren somit ein hohes Maß an Rotationsfreiheit, was einer erhöhten Membranfluidität entspricht.

Aufgrund der geordneten Struktur einer Plasmamembran werden die Fluoreszenz-Emissions-Dipole immer einer gewissen Bewegungsrestriktion unterliegen, so dass keine isotrope Verteilung erreicht wird. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die *steady-state fluorescence anisotropy* (r_s) in einer statischen Plateauphase bestimmt. Gemäß der Gleichung von Perrin setzt sich r_s aus der statischen Komponente r_∞ (*infinite time anisotropy*) und der dynamischen Komponente r_f (*rotational relaxation*) zusammen:

$$\mathbf{r}_s = \mathbf{r}_f - \mathbf{r}_\infty$$

Die rotationale Relaxationszeit ist dabei proportional zu der Mikroviskosität der Membran, während r_∞ eine Funktion des Lipidordnungsparameters ist. Dieser wird hauptsächlich durch die Temperatur und dem Gehalt an Cholesterin, Sphingolipiden und Proteinen in der Membran bestimmt (van Blitterswijk et al., 1981).

3.4.2. Messapparatur

Die Fluiditätsmessung wurden an einem SLM Aminco Bowman Series 2 Lumineszenzspektrometer durchgeführt. Die Messanordnung innerhalb des Gerätes entspricht dem sogenannten L-Format. Als Lichtquelle dient dabei eine Xenon-Bogenlampe (Firma Osram, München) mit einem Spektrum von 270-700nm. Ein nachgeschalteter Monochromator generiert daraus einen Lichtstrahl der Anregungswellenlänge der verwendeten Fluoreszenzsonde. Das monochromatische Licht wird mittels eines Excitationspolarisators je nach Einstellung (0° - horizontal, bzw. 90° - vertikal) polarisiert.

Trifft der Lichtstrahl auf das, in die Membran inkorporierte, Fluorophor, wird die Drehrichtung der emittierten Strahlung in Abhängigkeit der Rotationsfreiheit erneut um einen bestimmten Betrag variiert/polarisiert. Dieser Änderungsbetrag wird durch Messung der Lichtemission bei horizontaler bzw. vertikaler Stellung des Emissionspolarisators erfasst.

Als Detektionssystem dienen Photomultiplier-Röhrchen mit einem vorgeschalteten Emissions-Monochromator, die das ankommende Lichtsignal in ein elektrisches Potential umwandeln und dieses in verstärkter Form an die zentrale Steuereinheit weiterleiten.

Die Depolarisation des Fluoreszenzlichtes errechnet sich aus dem Verhältnis der vertikal ($I_{||}$) und horizontal (I_{\perp}) polarisierten Lichtintensitäten. Die *steady-state* Polarisation (P_s) bzw. Anisotropie r_s lassen sich daraus wie folgt errechnen:

$$r_s = (I_{||} - I_{\perp}) / (I_{||} + 2I_{\perp})$$

$$P_s = (I_{||} - I_{\perp}) / (I_{||} + I_{\perp})$$

$$r_s = 2P_s / (3 - P_s)$$

3.4.3. Verwendete Fluoreszenzsonden

Als Fluoreszenzsonden im Rahmen der Anisotropie-Messungen dienten die Fluoreszenzfarbstoffe Diphenylhexatrien (DPH) und sein kationisches Derivat Trimethylammonium-Diphenylhexatrien (TMA-DPH). DPH weist eine kompakte lineare Struktur auf und zeichnet sich durch eine starke Lipophilie aus. Der Farbstoff interkaliert daher im lipophilen Bereich einer Lipiddoppelschicht (Kaiser und London, 1998, McDonald et al., 1988). TMA-DPH hingegen weist eine amphiphile Molekülstruktur auf und assoziiert daher eher mit der hydrophilen und proteinreichen Membranoberfläche, so dass nur der Kohlenwasserstoffanteil in die tieferen Membranregionen hineinragt (Kaiser und London, 1998).

Aufgrund der kationischen Ladung des TMA-DPHs orientiert sich die Sonde vornehmlich im cytofascialen Membranblatt, das mit anionischen Phospholipiden und Cholesterin angereichert ist. DPH hingegen verteilt sich über beide Membranblätter (Schroeder et al., 1988). Messungen mit TMA-DPH liefern daher am gleichen Meßsystem grundsätzlich höhere Anisotropie-Werte als DPH-Messungen.

Beide Farbstoffe orientieren sich vornehmlich parallel zu den Fettsäureketten der Membranphospholipide, was vermutlich auf die Länge des DPH-Moleküls zurückzuführen ist (Kaiser und London, 1998). Die Beweglichkeit der Fluorophore hängt daher im Wesentlichen von der Flexibilität der Fettsäurereste der Membranphospholipide in der Region C-10 bis C-12 ab (Heyn, 1979).

3.4.4. Messdurchführung

In der vorliegenden Arbeit wurden Fluiditätsmessungen sowohl an isolierten Plasmamembranen, als auch an lebenden Zellen durchgeführt. Da DPH aufgrund seiner lipophilen Struktur schnell internalisiert wird, konnte im Zellsystem nur mit TMA-DPH gearbeitet werden.

MATERIALIEN:

- Puffer IV, HBSS
- (TMA-)DPH
- Fluoreszenzspektrometer
- Wasserbad (37°C)
- Quarzküvette

Für die Anisotropie Messung an isolierten Membranen wurden die Zellen zunächst mit den entsprechenden Substanzen inkubiert und anschließend die Plasmamembranen isoliert (siehe 3.3.10). Der Proteingehalt wurde mit Puffer IV auf 30µg/ml eingestellt. Beide Fluoreszenzfarbstoffe wurden als Stammlösung von 5mM in Dimethylformamid gelagert und vor der Verwendung mit Puffer IV verdünnt (DPH 1:150; TMA-DPH 1:300). Pro Messansatz wurden 35µg der Membransuspension mit 315µl Puffer IV und 350µl der jeweiligen verdünnten Fluoreszenzlösung in Reagenzgläsern gemischt und bei 37°C für 20 Minuten inkubiert. Die Probe wurde in Quarzküvetten (QS-101, Firma Helma) und bei konstanten 37°C in der Probenkammer (externes Thermostat) vermessen.

Die Messung erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 360nm (DPH) bzw. 364nm (TMA-DPH) und einer Emissionswellenlänge von 450nm. Der *Auto-Range* für die Intensität des Emissionslichtes wurde auf 80% der maximalen Detektorspannung gesetzt. Polarisations- bzw. Anisotropiewerte wurden durch Mittelwertbildung aus 20 aufeinander folgenden Messungen automatisch erfasst. Jede Probe wurde in einer 8fachen Bestimmung vermessen.

Als Negativ-Kontrolle wurde die Anisotropie der einzelnen Substanzen ohne Membranmaterial bestimmt.

Für Anisotropiemessungen an lebenden Zellen wurde nach Ablauf der jeweiligen Inkubation das Medium verworfen und die Zellen 2x mit warmem HBSS gewaschen. Anschließend wurde die Zellzahl ermittelt und mit HBSS auf 1,4 Mio/ml eingestellt. Pro Messansatz wurden 700 000 Zellen mit 2 μ M TMA-DPH eingesetzt. Hierfür wurden 500 μ l der Zellsuspension mit 500 μ l einer 4 μ M TMA-DPH Lösung gemischt und 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Messung erfolgte unter kontinuierlichem Rühren, um ein Absetzen der Zellen zu verhindern.

3.4.5. Fluoreszenzmessungen mit Pyren

Um die laterale Diffusionsfreiheit zwischen den beiden Membranblättern der Lipiddoppelschicht zu bestimmen, wurde die Fluoreszenzsonde Pyren eingesetzt. Strukturell stellt die Sonde einen polyzyklischen Kohlenwasserstoff, bestehend aus vier Benzolringen dar, die sich aufgrund der lipophilen Struktur in den hydrophoben Regionen der Membran inkorporieren. In diesen Bereichen kann sich die Sonde in allen Membranebenen bewegen, weshalb man bei der ermittelten Membranfluidität von der lateralen Gesamt-Mobilität bzw. von der Bulk-Fluidität spricht (Binkova et al., 1990).

Die Bestimmung der Fluiditätseigenschaften basiert auf der Komplexbildung von Pyrenmolekülen und erfolgte wiederum fluoreszenzspektroskopisch. Durch die laterale Bewegung der Pyrenmoleküle kommt es diffusionskontrolliert zur Bildung eines binären Komplexes, bestehend aus einem angeregten und einem nicht-angeregten Molekül. Die resultierende eximere Form des Pyrens existiert demzufolge nur im energetisch ungünstigen Anregungszustand. Durch die Energieänderung im Zuge des Übergangs kommt es zu einer diskreten Emission von Fluoreszenzlicht, das ein Maß für die Häufigkeit der Eximerbildung und damit der lateralen Bewegungsfreiheit der Pyrenmoleküle in der Membran darstellt.

Die Fluoreszenzmessungen mit Pyren wurden mit zwei Anregungswellenlängen durchgeführt. Die Exizitation bei 340nm führt zur Bildung reiner Pyren-Eximere und gibt Informationen über die erwähnte Bulk-Fluidität der Membran. Bei einer Anregungswellenlänge von 286nm können auch Excimere aus Pyren und Tryptophanresten der Membranproteine detektiert werden. Das Signal bei 286nm wird als Annular-Fluoreszenz bezeichnet. Zusammengenommen repräsentiert das Verhältnis beider Fluoreszenzemissionen die Molekülbeweglichkeit in der Nachbarschaft der Membranproteine.

Messdurchführung

Die Messung der Bulk- und Annular-Fluoreszenz erfolgte ausschließlich an isolierten Plasmamembranen.

MATERIALIEN:

- Puffer IV
- Pyren (10mmol/l in Dimethylformamid)
- Fluoreszenzspektrometer
- Wasserbad (37°C)
- Quarzküvette

Der Proteingehalt der Membransuspension wurde mit Puffer IV auf 500µg/ml eingestellt. Pro Messansatz wurden 100µl der normierten Membranen mit 900µl Puffer IV (Kontrolle) bzw. 800µl Puffer IV plus 100µl Testsubstanz versetzt und für 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde den Proben 1µl Pyrenlösung zugegeben und mittels Vortexer vermischt. Um eine maximale Fluoreszenz zu erreichen, wurde der Ansatz eine weitere Minute bei 37°C inkubiert. Die Probe wurde in Quarzküvetten (QS-101, Firma Helma) und bei konstanten 37°C in der Probenkammer (externes Thermostat) vermessen. Die Emissionsspektren wurden bei einem Auto-Range von 60% maximaler Detektorspannung aufgenommen.

Jede Probe wurde sowohl bei einer Anregungswellenlänge von 334nm als auch von 286nm vermessen. Den aufgezeichneten Spektren wurde die Fluoreszenzintensität der Pyren-Excimere (I_E) bei 482nm bzw. der Pyren-Monomere (I_M) bei 373nm entnommen. Als vergleichende Messgröße wurde der Quotient I_E / I_M gebildet.

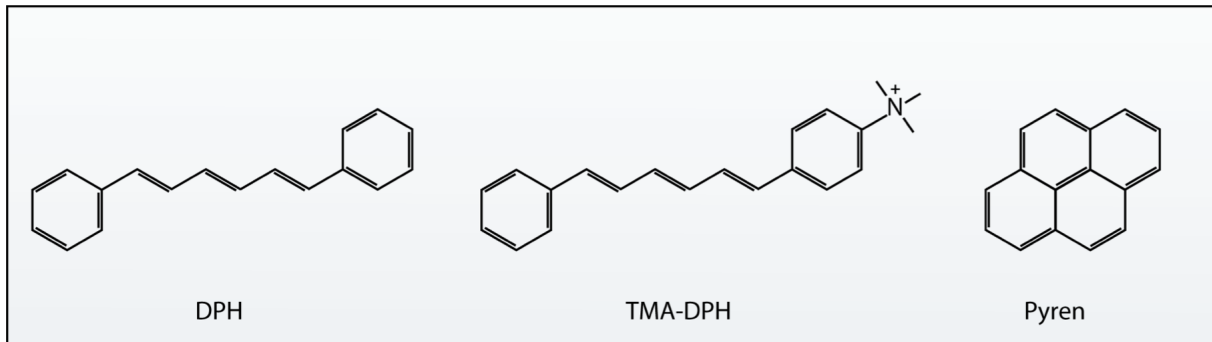


Abbildung 19 Struktur der verwendeten Fluoreszenzsonden

3.5. Fluoreszenzfärbungen

Im Zuge dieser Arbeit wurde die Lokalisation von Cholesterin, GM-1 Gangliosid und Abeta fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. Cholesterin und GM-1 wurden mit Hilfe der Fluoreszenzfarbstoffe Filipin und Alexa-555 visualisiert, Abeta wurde als Fluorescein-gekoppeltes Molekül extern zugegeben.

MATERIALIEN:

- Polylysin / FCS
- 6-well Platte
- Deckgläschen (autoklaviert)
- PBS
- Paraformaldehyd
- Objektträger
- Gelmount
- Filipin, CTB-Alexa 555, Fluo-A $\beta_{(1-40)}$
- Cholera-toxin-Antikörper

Für alle Färbungen wurden 200 000 Zellen auf beschichteten Deckgläschen in 6-well Platten mit 2ml Medium ausgesät. Um möglichst repräsentative und stabile Zellen zu färben, mussten die beiden verwendeten Zell-Linien unterschiedlich auf den Versuch vorbereitet werden. HEK293-APPwt Zellen wurden 48 Stunden vor der Färbung auf Polylysin-beschichteten Deckgläschen ausgesät. Die Deckgläschen wurden hierfür 20 Minuten lang in Polylysin eingelegt und anschließend 3x in sterilem Millipore Wasser gewaschen. SY5Y-APPwt Zellen zeigten kein stabiles Anwachsen auf Polylysin, weshalb die Beschichtung mit FCS durchgeführt wurde.

Die Deckgläschen wurden dafür 20 Minuten lang in jeweils 1ml FCS eingelegt. Anschließend wurde ein Großteil des FCS abgesaugt, so dass der verbliebene Flüssigkeitsfilm auf den Deckgläschen antrocknen konnte. SY5Y-APPwt Zellen benötigten 4 Tage, um adherent anzuwachsen und die typische Morphologie neuronaler Zellen auszubilden. Da sich die Spektren der drei verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe nicht überschneiden, konnten problemlos Dreifach-Färbungen durchgeführt werden.

3.5.1. Filipin

Der Fluoreszenzfarbstoff Filipin bindet selektiv an das Cholesterin der Plasmamembran. Die Färbung wurde mit dem DAPI-Kanal des Mikroskops detektiert. Filipin ist als Pulver erhältlich, das zunächst in Methanol in einer Konzentration von 10mg/ml gelöst und anschließend mit PBS auf eine Endkonzentration von 50µg/ml eingestellt wurde. Wie alle Fluoreszenzfarbstoffe weist Filipin eine gewisse Lichtempfindlichkeit auf, weshalb darauf zu achten ist, dass die Lagerung der Lösung in einem lichtgeschützten Gefäß erfolgt.

Für die Färbung wurden die Zellen zunächst vorsichtig 3x mit kaltem 1xPBS gewaschen und für 45 Minuten mit Paraformaldehyd bei 4°C fixiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Filipin für 30 Minuten bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss. Um unspezifische Anlagerungen des Farbstoffes zu minimieren, wurden die Zellen im Anschluss erneut 3x mit PBS gewaschen. Die getrockneten Deckgläschen wurden in Gelmount auf Objektträgern eingebettet.

3.5.2. GM-1

Das Gangliosid GM-1 findet sich ausschließlich in den Lipid Rafts der Plasmamembran, weshalb die Färbung einer Visualisierung der Raft Regionen entspricht. Die Färbung erfolgte mit Hilfe von Cholera toxin, welches selektiv an GM-1 bindet. Die verwendete Cholera toxin Untereinheit B (CTB) ist mit dem Fluorophor Alexa 555 konjugiert, dessen Fluoreszenz mit Hilfe des G2A-Kanals detektiert werden kann. Das Medium der Zellen wurde zunächst mit 2µl CTB versetzt und für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde das ungebundene CTB durch 3maliges Waschen mit PBS entfernt. Um eine Quervernetzung der Moleküle zu erreichen, wurden die Zellen zusätzlich mit einem CTB-Antikörper behandelt. Hierfür wurden 2ml neues Medium mit 10µl einer 1:10 000 verdünnten Antikörperlösung versetzt und die Zellen damit für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Die Antikörperverdünnung wurde jeweils frisch mit 1xPBS hergestellt. Nach erneutem 3maligem Waschen wurden die Zellen für 45 Minuten bei 4°C mit Paraformaldehyd inkubiert. Im direkten Anschluss an die GM1-Färbung konnte optional eine Filipinfärbung durchgeführt werden.

3.5.3. Fluo-A β (1-40)

Das verwendete Fluo-A β (1-40) ist mit dem Fluorophor Fluorescein konjugiert. Die Emission wurde im FITC-Kanal des Mikroskops detektiert. Aufgrund der Konjugation lagert sich Fluo-A β (1-40) nur an der Plasmamembran an, ohne ins Zellinnere aufgenommen zu werden. Die Oligomerisierung und die Inkubation erfolgten nach den gleichen Protokollen wie unter 3.2.6. beschrieben. Die behandelten Zellen konnten entweder direkt mit Paraformaldehyd fixiert und mikroskopiert oder zusätzlich nach Ende der Inkubationszeit mit GM-1 und/oder Filipin gefärbt werden.

4. Ergebnisse

4.1. Lovastatin-Effekte in SY5Y-APPwt und HEK293-APPwt Zellen

Epidemiologische Studien weisen darauf hin, dass die langfristige Einnahme von Statinen das Risiko, an der Alzheimer Demenz zu erkranken, senken (Jick et al., 2000; Wolozin et al., 2000). *In vivo* und *in vitro* Experimente zeigen, dass die Behandlung mit Statinen zu einer deutlichen Reduktion an Abeta führt (Simons et al., 1998; Buxbaum et al., 2000; Fassbender et al., 2001) Im Zuge dieser Arbeit wurde der Einfluss von Lovastatin auf den Cholesteringehalt und die APP-Prozessierung im Zellmodell untersucht. Als Modellsysteme wurden neuronale SY5Y-Zellen (SY5Y-APPwt) und nicht-neuronale HEK293-Zellen (HEK293-APPwt) verwendet. Beide Zell-Linien sind humanen Ursprungs und lagen jeweils stabil mit humanem APP695 transfiziert vor. Die Zellen wurden für die Zeit der Inkubation in FCS-freiem Medium kultiviert, um den Einfluss von Cholesterin aus dem Medium auszuschließen. Die Inkubationsdauer betrug 48 Stunden.

4.1.1. Zell-Viabilität

Zunächst wurde der Einfluss von Lovastatin auf die Zell-Viabilität untersucht, um geeignete Konzentrationen für die folgenden Versuche zu ermitteln. Sowohl der MTT- als auch der ToxiLight-Assay zeigten bei niedrigen Konzentrationen von 0.1 bis 5µM in SY5Y-APPwt Zellen einen leicht protektiven Effekt nach der Behandlung mit Lovastatin (Abbildung 20A und B). Bei einer Konzentration von 10µM Lovastatin kam es in SY5Y-APPwt Zellen zu einer Abnahme der Zell-Viabilität, weshalb 5µM in den weiteren Versuchen als maximale Konzentration eingesetzt wurde. Zusätzlich wurden Kontrollzellen mit der gleichen Konzentration an reinem Ethanol, dem Lösungsmittel von Lovastatin behandelt.

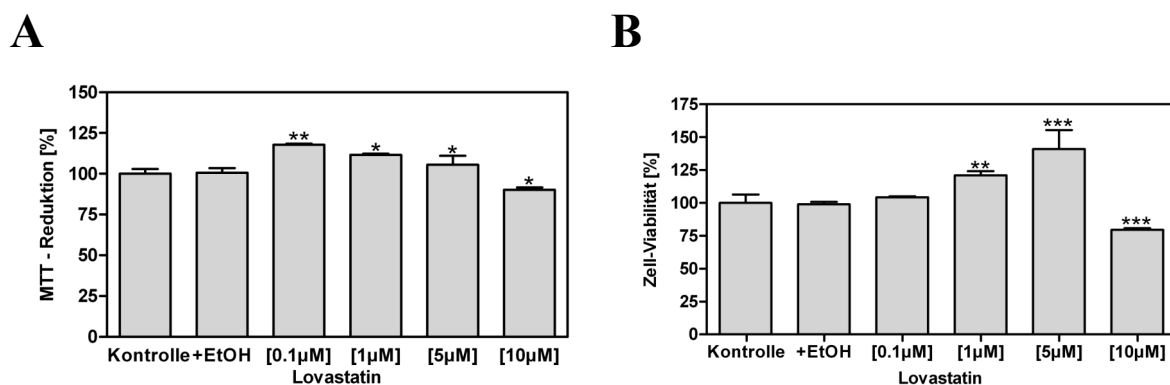


Abbildung 20 Einfluss von Lovastatin auf die Zell-Viabilität in SY5Y-APPwt Zellen. Die Zellen wurden für 48h in OptiMem Medium mit den angegebenen Konzentrationen inkubiert. A) MTT-Assay; B) ToxiLight-Assay. Die gemessenen Absorptionen wurden auf die eingesetzte Zellzahl normiert. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 12 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)

In HEK293-APPwt Zellen konnte kein MTT-Assay mit Lovastatin durchgeführt werden, da die Zellen für die Behandlung in UltroserG-haltigem Medium kultiviert wurden und unter diesen Bedingungen ein festes Anwachsen der Zellen mehrere Tage dauerte. Im ToxiLight-Assay zeigten die eingesetzten Lovastatin-Konzentrationen keinen signifikanten Effekt auf die Zell-Viabilität (Abbildung 21).

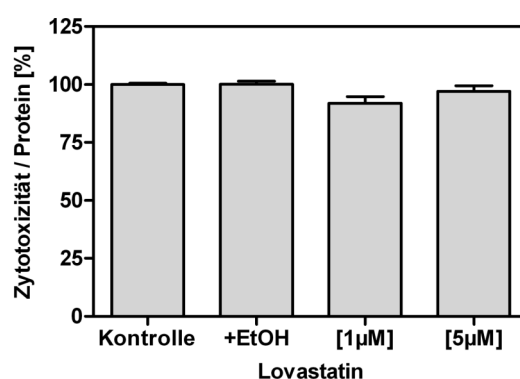


Abbildung 21 Einfluss von Lovastatin auf die Zell-Viabilität in HEK293-APPwt Zellen im ToxiLight-Assay. Die Zellen wurden für die Behandlung in UltroserG-haltigem Medium ohne FCS kultiviert und für 48h mit den angegebenen Konzentrationen an Lovastatin inkubiert. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)

4.1.2. Cholesterinbestimmung

Sowohl in SY5Y-APPwt Zellen, als auch in HEK293-APPwt Zellen führte die Behandlung mit Lovastatin zu einer konzentrationsabhängigen Senkung des freien, unveresterten Cholesterins im Zellhomogenat (Abbildung 22A und B). Die Menge an Gesamtcholesterin zeigte ebenfalls eine konzentrationsabhängige Abnahme, die jedoch nicht so stark ausgeprägt war, wie die des freien Cholesterins (Abbildung 22C und D). Die Statin-induzierte Cholesterinreduktion war in HEK293-APPwt Zellen deutlich schwächer als im neuronalen Zellmodell. Die Menge an Gesamtcholesterin zeigte daher in HEK293-APPwt Zellen auch bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 5µM nur eine tendenzielle, nicht aber signifikante Abnahme.

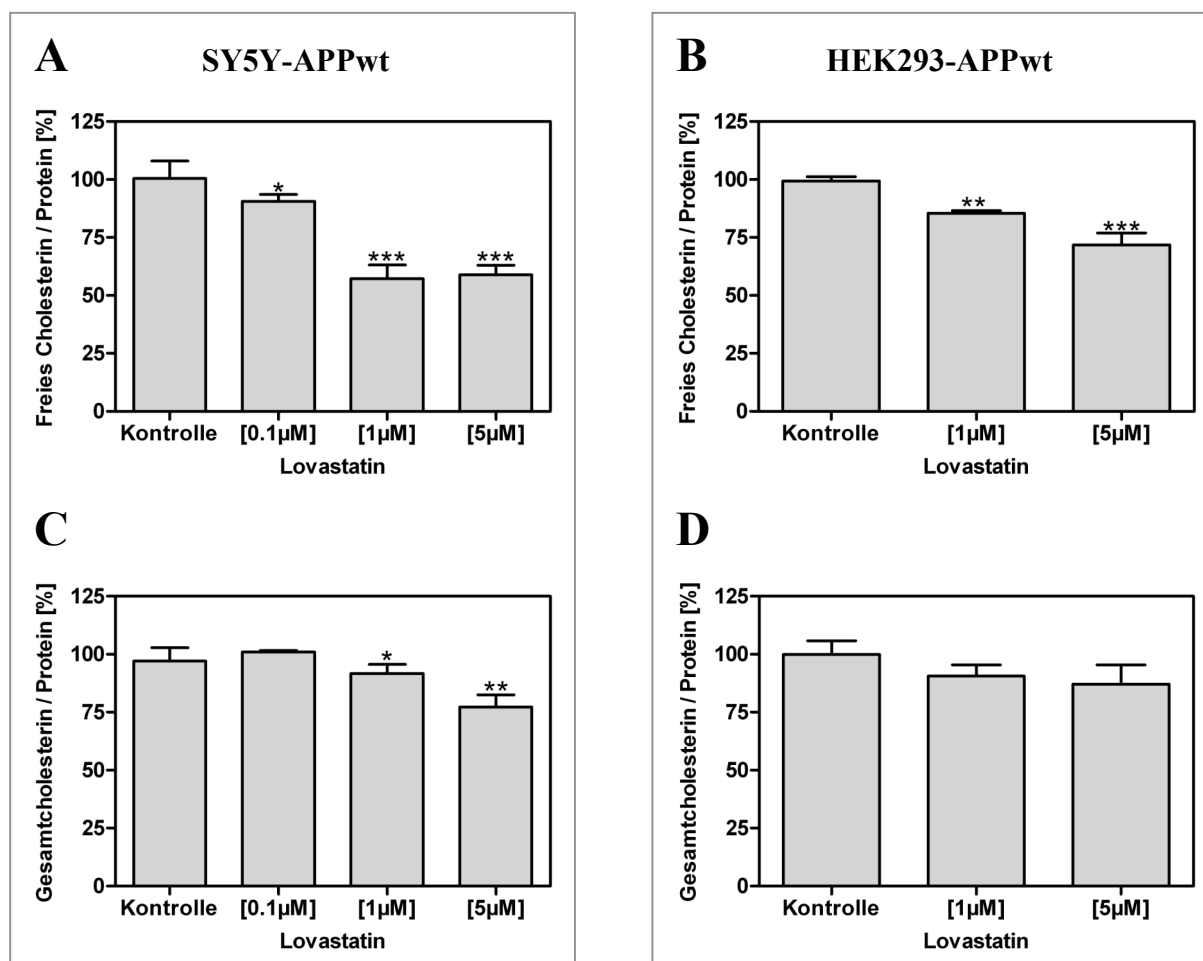


Abbildung 22 Einfluss von Lovastatin auf den Cholesteringehalt in SY5Y-APPwt (linke Seite) und HEK293-APPwt (rechte Seite) Zellen. Die Zellen wurden für 48h in FCS-freiem Medium mit den angegebenen Konzentrationen inkubiert; untersucht wurde sowohl das freie, unveresterte Cholesterin (A), als auch das Gesamtcholesterin (B) im Zellhomogenat. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6-18 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)

Zusätzlich wurden die Plasmamembranen von behandelten SY5Y-APPwt Zellen isoliert und der Gehalt an freiem, membranärem Cholesterin bestimmt (Abbildung 23). Auch hier konnte eine signifikante und konzentrationsabhängige Reduktion beobachtet werden, die allerdings prozentual nicht so stark ausgeprägt war, wie die im Zellhomogenat.

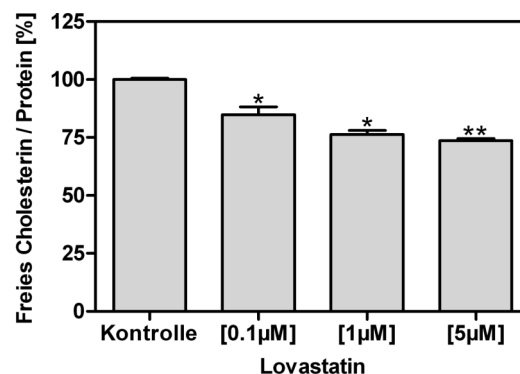


Abbildung 23 Einfluss von Lovastatin auf den Gehalt an Cholesterin in isolierten SY5Y-APPwt Zellmembranen. Die Zellen wurden für 48h in OptiMem Medium mit den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurden die Plasmamembranen isoliert und der Gehalt an freiem Cholesterin untersucht. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)

4.1.3. Sekretion von Abeta

Nach der Behandlung mit Lovastatin wurde das Kulturmedium auf den Gehalt an sezerniertem Abeta₍₁₋₄₀₎ und Abeta₍₁₋₄₂₎ analysiert, wobei die basale Freisetzung von Abeta₍₁₋₄₂₎ in SY5Y-APPwt Zellen unterhalb der Detektionsgrenze lag. In beiden Zellmodellen bewirkte Lovastatin eine signifikante und konzentrationsabhängige Abnahme an sezerniertem Abeta₍₁₋₄₀₎ (Abbildung 24A und B) Wie beim Cholesterin war auch hier der Effekt in SY5Y-APPwt Zellen stärker ausgeprägt als in HEK293-APPwt Zellen. In HEK293-APPwt Zellen konnte zusätzlich eine Reduktion des Abeta 1-42er Fragments detektiert werden (Abbildung 24C). Der prozentuale Vergleich von Abeta₍₁₋₄₀₎ und Abeta₍₁₋₄₂₎ zeigt, dass Lovastatin die Sekretion beider Peptide in nahezu gleichem Maße senkt.

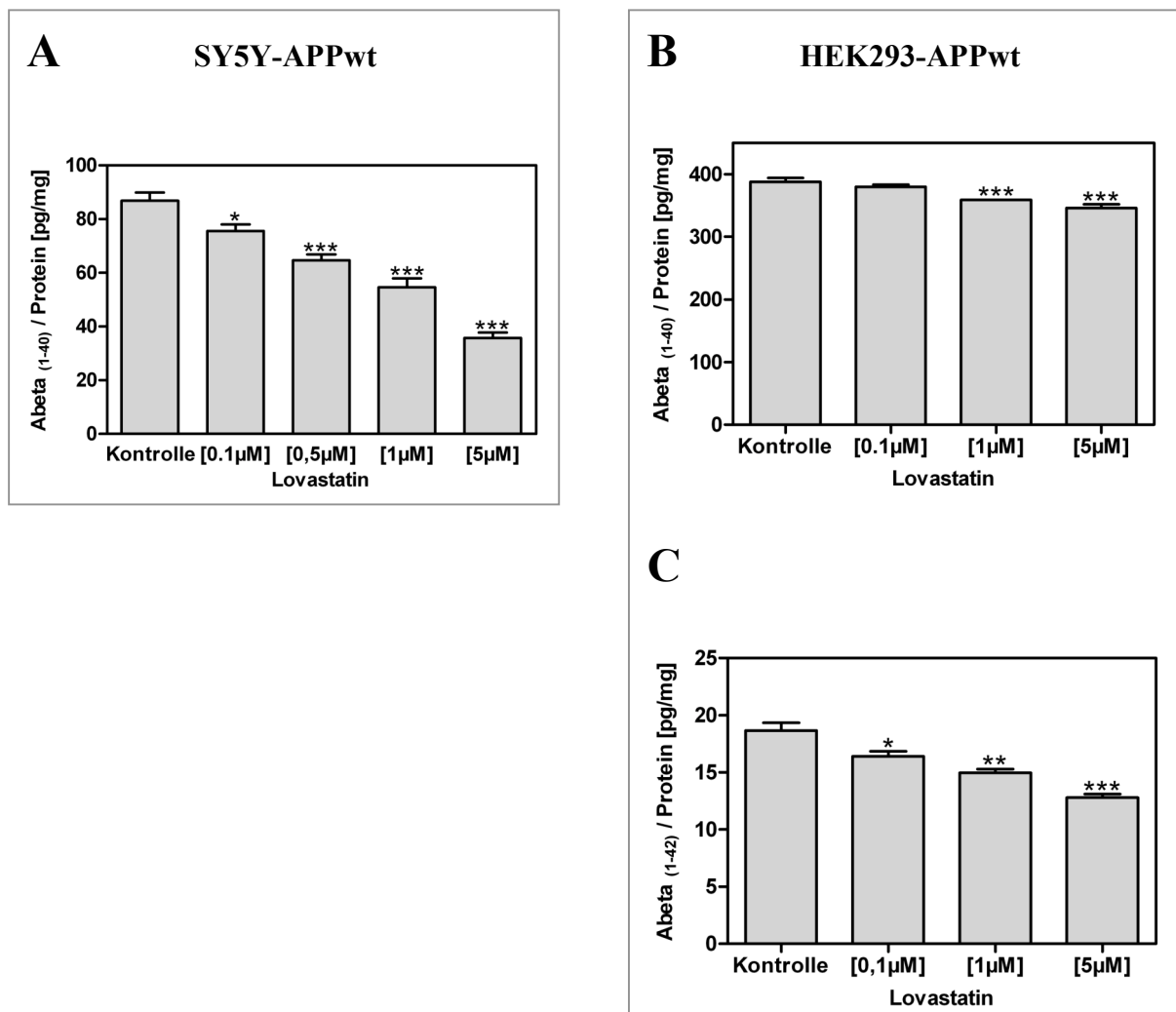


Abbildung 24 Einfluss von Lovastatin auf den Gehalt an sezerniertem Abeta₍₁₋₄₀₎ (A, B) und Abeta₍₁₋₄₂₎ (C) in SY5Y-APPwt (linke Seite) und HEK293-APPwt (rechte Seite) Zellen. Die Zellen wurden für 48h in FCS-freiem Medium mit den angegebenen Konzentrationen an Lovastatin inkubiert. Anschließend wurde das Medium gesammelt und mit PMSF versetzt; die Analyse erfolgte mittels ELISA. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 12 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)

4.1.4. BACE-Aktivität

Um zu überprüfen, ob die beobachtete Abnahme an sezerniertem Abeta auf eine Reduktion der β -Sekretase (BACE)-Aktivität zurückzuführen ist, wurde die *in vitro*-Aktivität des Enzyms nach Behandlung der Zellen gemessen. In SY5Y-APP Zellen wurde die verwendete Konzentrationsreihe von 0,1-5 μ M Lovastatin untersucht, während in HEK293-APPwt Zellen nur die höchste verwendete Konzentration von 5 μ M gegenüber unbehandelten Kontrollzellen gemessen wurde. In keinem der beiden Zellmodelle konnte eine Veränderung in der Enzym-Aktivität detektiert werden, was darauf hindeutet, dass Lovastatin keinen hemmenden Einfluss auf die β -Sekretase ausübt (Abbildung 25A und B). Da es sich um einen *in vitro* Assay handelt, sagt der Befund nichts über die Prozessierungsrate des Enzyms im physiologischen Membranmilieu aus. Anhand der unveränderten Aktivität kann jedoch ausgeschlossen werden, dass Lovastatin die β -Sekretase direkt inhibiert.

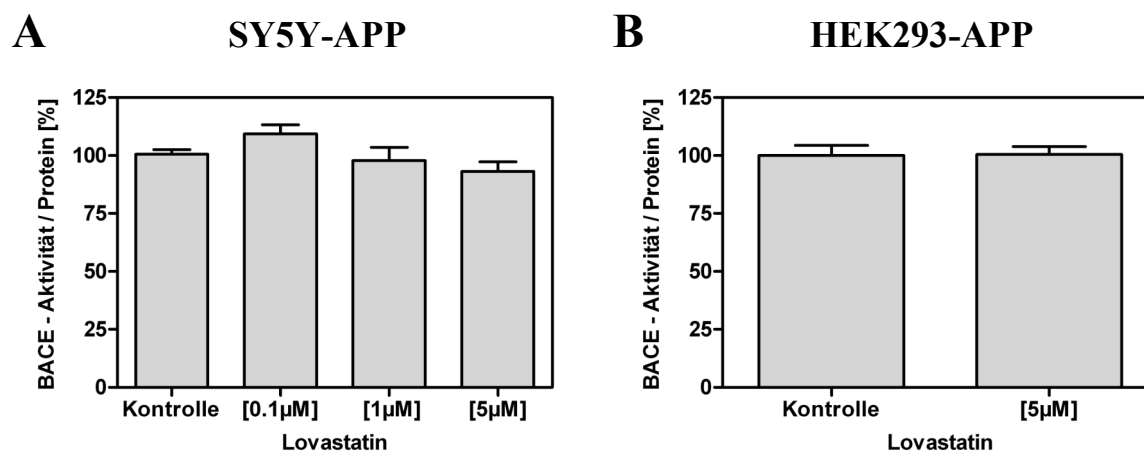


Abbildung 25 Einfluss von Lovastatin auf die *in vitro* Aktivität der β -Sekretase BACE in SY5Y-APPwt und HEK293-APPwt Zellen. Die membranständige β -Sekretase wurde aus den behandelten Zellen extrahiert und die Aktivität gegenüber einem zugegebenen Substrat bestimmt; A) SY5Y-APPwt Zellen; B) HEK293-APPwt Zellen. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)

4.2. Pleiotrope und Cholesterin-abhängige Statin-Effekte

Nachdem die Wirkung von Lovastatin in beiden Zellmodellen belegt werden konnte, folgte eine mechanistische Analyse, bei der separat der Einfluss von pleiotropen (cholesterin-unabhängigen) und cholesterinabhängigen Effekten auf die Aβ-Produktion untersucht wurde. Die Inhibition der HMG-CoA-Reduktase beeinflusst neben der Synthese von Cholesterin auch die der linearen Isoprenoide Farnesylpyrophosphat und Geranylgeranylpyrophosphat. Der Synthesepfad weist mit Farnesylpyrophosphat einen Verzweigungspunkt auf, da es einerseits die Vorstufe von Squalen und andererseits die von Geranylgeranylpyrophosphat darstellt. Statine greifen oberhalb von Farnesylpyrophosphat in den Synthesepfad ein und bewirken daher eine effiziente Inhibition beider Verzweigungswege. Statineffekte können aufgrund dieser geringen Wirkstoffselektivität nicht mit einer spezifischen Cholesterinreduktion gleichgesetzt werden. Etliche Arbeiten führen die positive Wirkung der Statine, auch in Bezug auf die Aβ-Bildung auf cholesterinunabhängige Effekte zurück (Cole et al., 2003; Parson et al., 2006).

Um zu untersuchen, welcher der beiden Synthesepfade für die beobachtete Abnahme an sezerniertem Aβ im verwendeten Zellmodell verantwortlich ist, wurden im Folgenden Inhibitoren eingesetzt, die beide Effekte selektiv „nachahmen“ und somit entweder gezielt die Neusynthese von Cholesterin verhindern, oder aber eine Reduktion an Isoprenoiden induzieren. Alle Versuche wurden am neuronalen Modellsystem der SY5Y-APPwt Zellen durchgeführt.

4.2.1. Inhibition der Isoprenylierungen durch GGTi 286 und FTi 277

Der Einfluss von Isoprenylierungen auf die Sekretion von Abeta₍₁₋₄₀₎ wurde durch die Inhibition der Geranylgeranyltransferase-I (GGTase) und der Farnesyltransferase (FTase) untersucht. Die Zellen wurden dazu für 24 Stunden mit den zellgängigen Inhibitoren GGTi 286 (GGTase) oder FTi 277 (FTase) inkubiert. Weder die Inhibition von Geranylierungen noch von Farnesylierungen nimmt Einfluss auf den Cholesterinmetabolismus der Zellen (Abbildung 26).

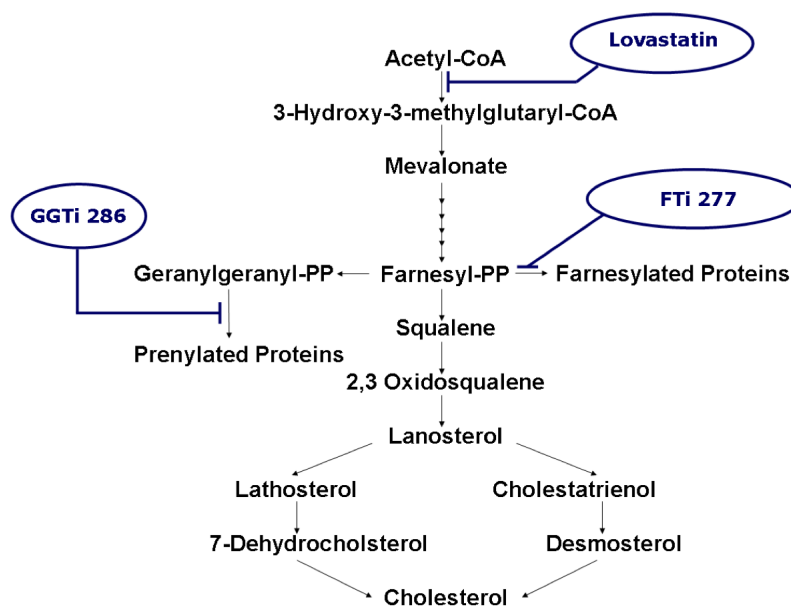


Abbildung 26 Angriffspunkte von GGTi 286 und FTi 277. Beide Inhibitoren haben keinen Einfluss auf die Squalen-Synthese, so dass die Bildung von Cholesterin nicht behindert wird.

4.2.1.1. Zell-Viabilität

Um zu überprüfen, ob GGTi 286 und FTi 277 Einfluss auf die Zell-Viabilität in SY5Y-APPwt Zellen nehmen, wurde die MTT-Reduktionsrate der Zellen nach der Behandlung mit einer Konzentrationsreihe von jeweils 0,1-10 μ M gemessen. Die MTT-Reduktionsrate stellt ein Maß für die metabolische Aktivität der Zellen dar. Die Behandlung mit GGTi 286 führte zu einer tendenziellen Zunahme der Reduktionsrate. Bei einer Konzentration von 10 μ M konnte ein signifikanter Anstieg der metabolischen Aktivität beobachtet werden (Abbildung 27A). FTi 277 hingegen bewirkte eine konzentrationsabhängige Abnahme der MTT-Reduktion, so dass es bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 10 μ M zu einer signifikanten Schädigung der Zellen kam (Abbildung 27B). FTi 277 wurde daher in den folgenden Versuchen in einer maximalen Konzentration von 1 μ M eingesetzt.

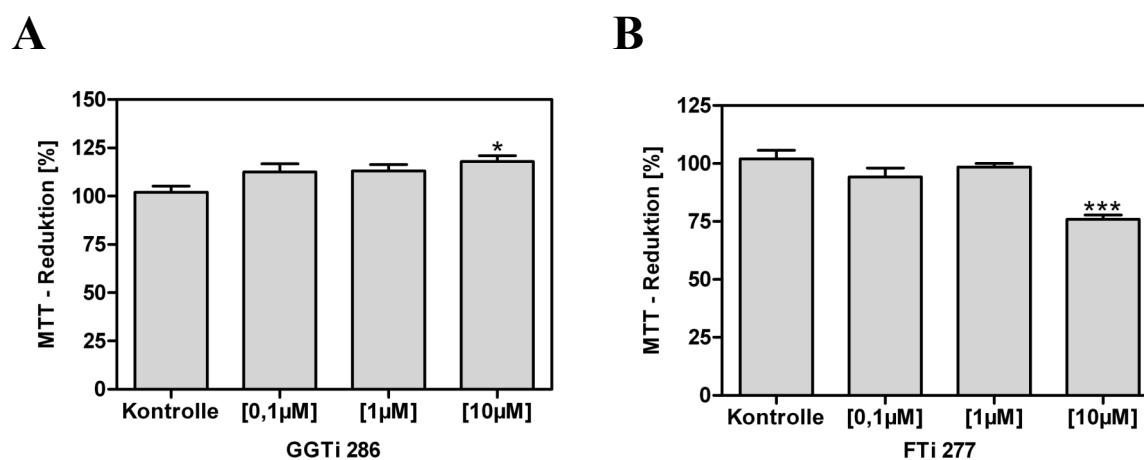


Abbildung 27 Einfluss von GGTi 286 und FTi 277 auf die Zell-Viabilität in SY5Y-APPwt Zellen. Je 100 000 Zellen wurden in einer 96well Platte ausgesät und für 24h mit den angegebenen Konzentrationen inkubiert; A) GGTi 286; B) FTi 277. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 12 Einzelerperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)

4.2.1.2. Enzymkinetik

Die Wirksamkeit der beiden Inhibitoren wurde mittels Fluoreszenzspektroskopie bestätigt. Die Aktivität des GGTase-I-Inhibitors GGTi 286 wurde mit Hilfe des Dansyl-Farbstoffes Dansyl-GCVLL überprüft. Abbildung 28A zeigt den Fluoreszenzverlauf von unbehandelten Kontrollzellen (grauer Verlauf) und GGTi 286 behandelten Zellen (schwarzer Verlauf) 15 Minuten nach Zugabe des Farbstoffes. Der beobachtete zeitabhängige Anstieg der Fluoreszenz in den Kontrollzellen ist auf die Prenylierung des Farbstoffes durch die GGTase zurückzuführen. Die behandelten Zellen weisen einen signifikant geringeren Anstieg der Fluoreszenzemission auf, was darauf hindeutet, dass die Prenylierung durch GGTi 286 weitestgehend inhibiert wurde.

Die Inhibition der FTase wurden Fluoreszenzmessungen mit Hilfe des Farbstoffes Dansyl-GCVLS überprüft. Die aktive FTase katalysiert die Prenylierung des Farbstoffes, was zu einer erhöhten Fluoreszenzintensität und einer Verschiebung des Fluoreszenzmaximums führt (Pompliano et al., 1992). Abbildung 28B zeigt den Verlauf der Fluoreszenzintensität von Kontrollzellen (grauer Verlauf) und FTi 277 behandelten Zellen (schwarzer Verlauf) 10 Minuten nach Zugabe des Farbstoffes. Man erkennt eine deutliche Abschwächung des Fluoreszenzmaximums in den behandelten Zellen. Zusätzlich kommt es zu einer Verschiebung des Maximums von ungefähr 500nm in den Kontrollzellen zu ungefähr 550nm in den inhibierten Zellen.

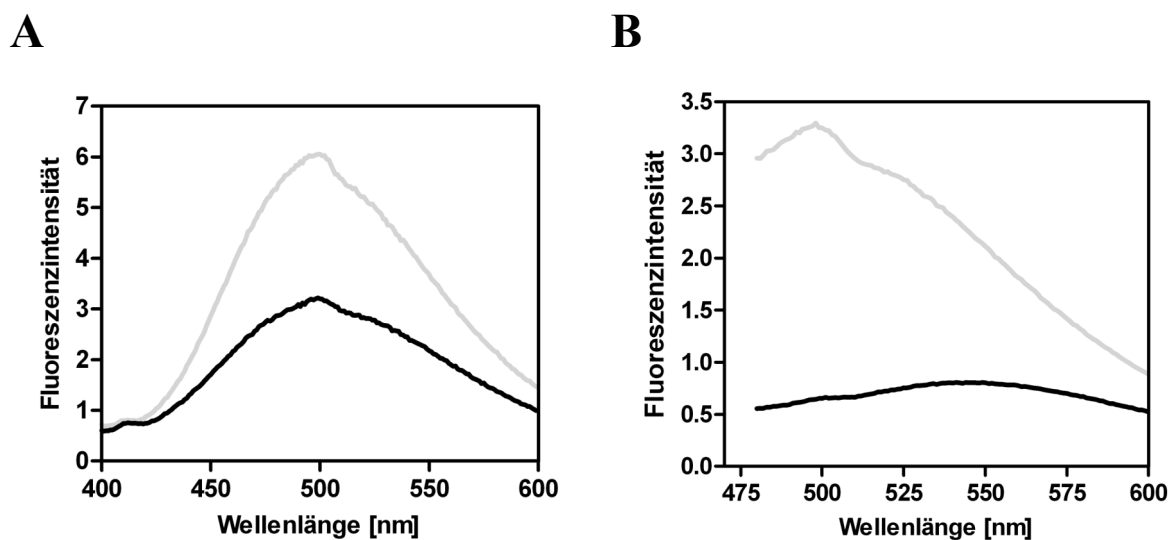


Abbildung 28 Aktivitätsnachweis von GGTi 286 (A) und FTi 277 (B). Die Zellen wurden für 24h mit $1\mu\text{M}$ des jeweiligen Inhibitors inkubiert. Im Anschluss wurden Kontrollen und behandelte Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen versetzt, deren Fluoreszenzsignal durch Prenylierungen verändert wird (Dansyl-GCVLL (A) bzw. Dansyl-GCVLS (B)); der graue Verlauf stellt die Kontrollzellen und der schwarze Verlauf die behandelten Zellen dar.

4.2.1.3. Cholesterinbestimmung

Die Behandlung mit GGTi 286 und FTi 277 sollte zu einer selektiven Inhibition der Isoprenylierungen innerhalb der Zellen führen, ohne die Synthese von Cholesterin zu beeinflussen. Um den ungestörten Cholesterinmetabolismus zu überprüfen, wurde sowohl der Gehalt an freiem Cholesterin, als auch die Menge an Gesamtcholesterin im Homogenat der behandelten Zellen gemessen. Wie erwartet, konnten weder nach der Behandlung mit GGTi 286 noch mit FTi 277 signifikante Unterschiede im Cholesteringehalt von unbehandelten Kontrollen und behandelten Zellen detektiert werden (Abbildung 29A-D).

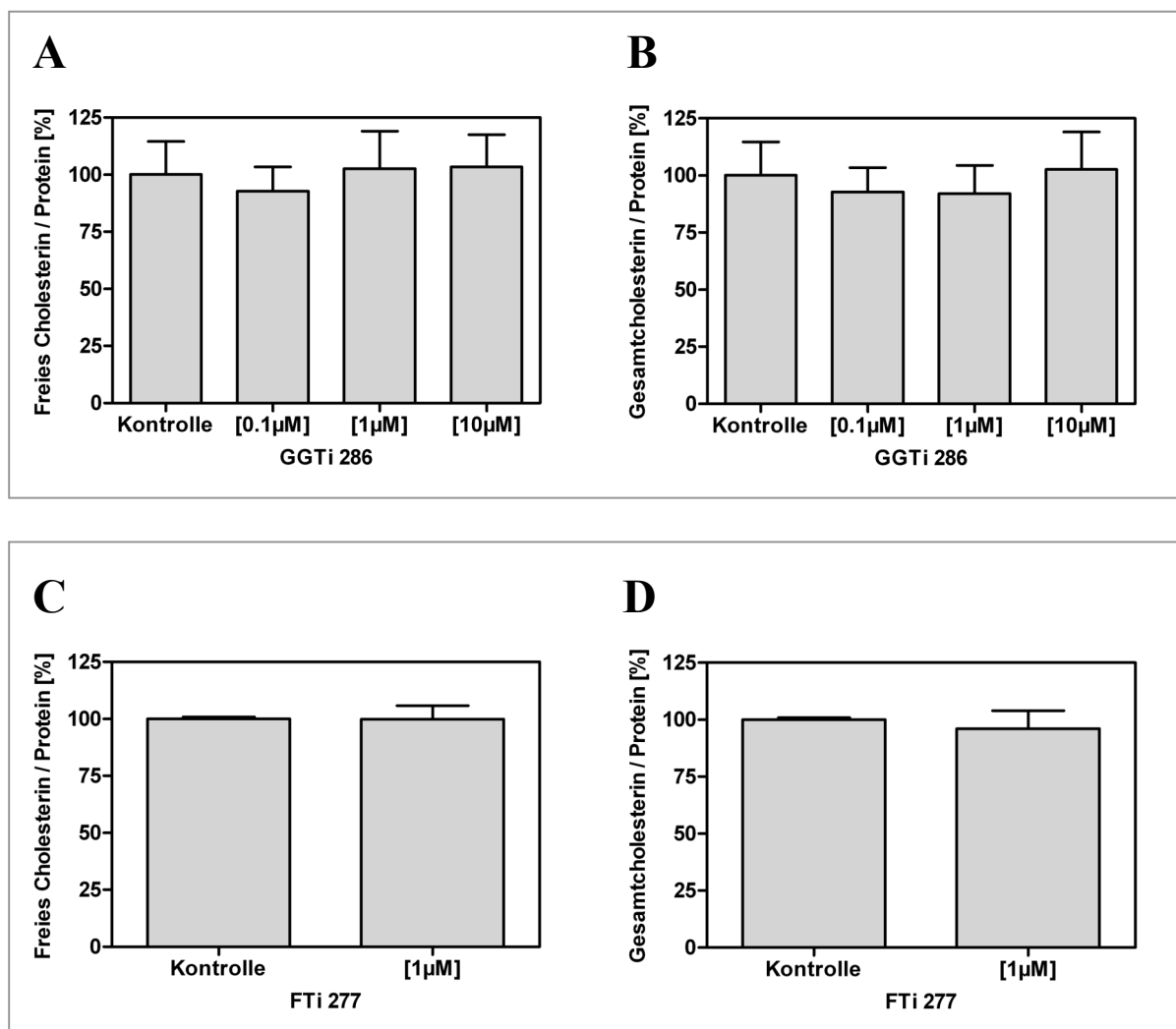


Abbildung 29 Einfluss von GGTi 286 und FTi 277 auf den Cholesteringehalt in SY5Y-APPwt Zellen. Die Zellen wurden für 24h mit den angegebenen Konzentrationen inkubiert; untersucht wurde sowohl das freie, unveresterte Cholesterin (A, C), als auch das Gesamtcholesterin (B, D) im Zellhomogenat. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)

4.2.1.4. Sekretion von Abeta₍₁₋₄₀₎

Isoprenylierungen stellen essentielle post-translationale Modifikationen dar, die die Hydrophobizität von Proteinen erhöhen. Dies dient in den meisten Fällen der Verankerung von Membranproteinen in der Plasmamembran. Da sowohl APP, als auch dieprozessierenden Sekretasen membranständig sind, sollte im Folgenden überprüft werden, ob die Inhibition von Prenylierungen Einfluss auf die amyloidogene Prozessierung nimmt. Hierfür wurde die Menge an sezerniertem Abeta₍₁₋₄₀₎ nach der Behandlung mit GGTi 286 und FTi 277 mittels ELISA analysiert. Abbildung 30 zeigt, dass weder die Inhibition der GGTase noch der FTase zu einer veränderten Sekretion von Abeta₍₁₋₄₀₎ führt.

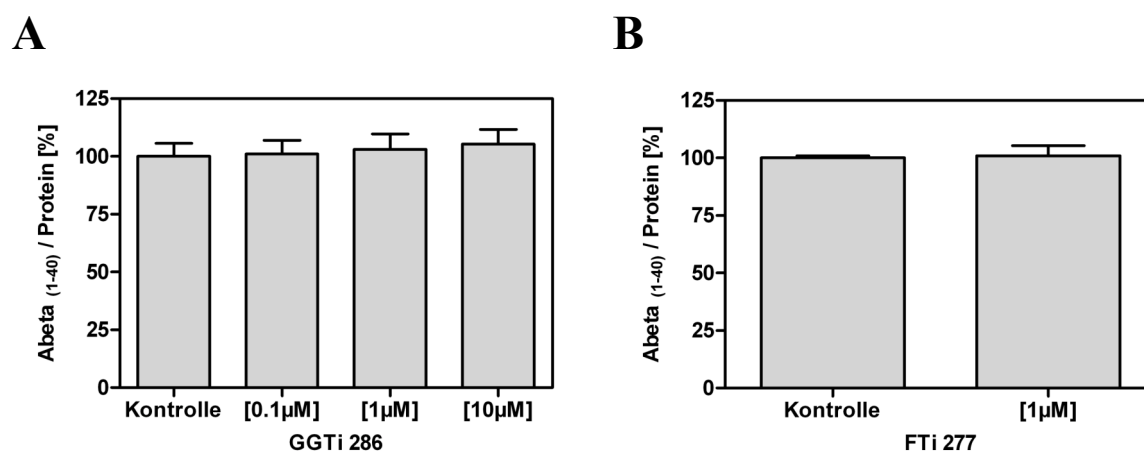


Abbildung 30 Einfluss von GGTi 286 und FTi 277 auf die Menge an sezerniertem Abeta₍₁₋₄₀₎ in SY5Y-APPwt Zellen. Die Zellen wurden für 24h mit den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Nach der Behandlung wurde das Kulturmedium mittels ELISA analysiert. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte ± SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** p < 0,0001)

4.2.1.5. BACE-Aktivität

Obwohl keine veränderten $A\beta_{(1-40)}$ Spiegel im Medium der behandelten Zellen detektiert werden konnten, wurde überprüft, ob GGTi 286 und FTi 277 die Aktivität der β -Sekretase beeinflussen. Hierfür wurde die Sekretase aus den Membranen der behandelten Zellen extrahiert und ihre Aktivität gegenüber einem zugegebenen Substrat gemessen. Übereinstimmend mit dem Befund der unveränderten amyloidogenen APP-Prozessierung, konnten keine Aktivitäts-Unterschiede zwischen Kontrollzellen und behandelten Zellen detektiert werden (Abbildung 31). Weder GGTi 286 noch FTi 277 scheinen die Funktion der β -Sekretase zu inhibieren oder zu aktivieren.

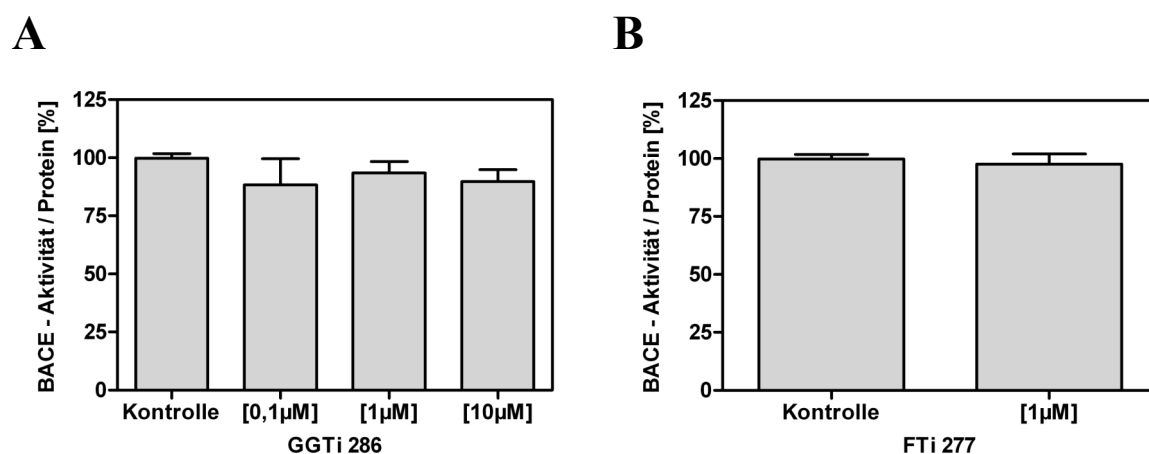


Abbildung 31 Einfluss von GGTi 286 und FTi 277 auf die *in vitro* Aktivität der β -Sekretase BACE in SY5Y-APPwt Zellen. Die membranständige β -Sekretase wurde aus den behandelten Zellen extrahiert und die Aktivität gegenüber einem zugegebenen Substrat bestimmt; A) GGTi 286; B) FTi 277. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelerperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)

4.2.2. Selektive Inhibition der Cholesterinbiosynthese

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass weder die Inhibition von Farnesylierungen noch von Geranylierungen zu einer Abnahme der Abeta Sekretion führt. Dieser Befund deutet darauf hin, dass die detektierte Reduktion an sezerniertem Abeta nach der Behandlung mit Lovastatin nicht auf verminderte Isoprenylierungen zurückzuführen ist. In den folgenden Experimenten sollte weiterführend untersucht werden, ob die Statin-induzierte Abnahme an Cholesterin für die veränderte APP-Prozessierung verantwortlich ist. Hierfür wurden Inhibitoren eingesetzt, die Schlüsselenzyme an unterschiedlichen Positionen im Synthesepfad hemmen und somit selektiv die Neusynthese von Cholesterin unterbinden. Keiner der Inhibitoren beeinflusst dabei die Synthese der Isoprenoide (Abbildung 32). RPR 107393A inhibiert die Squalen Synthase, welche die Dimerisierung von zwei Farnesylpyrophosphat Molekülen katalysiert. Damit greift der Inhibitor direkt unterhalb der Verzweigungsstelle im Biosynthesepfad an. BM 15.766 ist ein Hemmstoff der 7-Dehydrocholesterol Δ^7 Reduktase und inhibiert damit den letzten Schritt der Cholesterinsynthese. U 18666A wirkt an mehreren Stellen auf den Cholesterinmetabolismus ein. Zum einen wird die Substanz als Inhibitor der Desmosterol Reduktase und der Oxidosqualen Zyklase beschrieben, zum anderen blockiert U 18666A den intrazellulären Cholesterintransport.

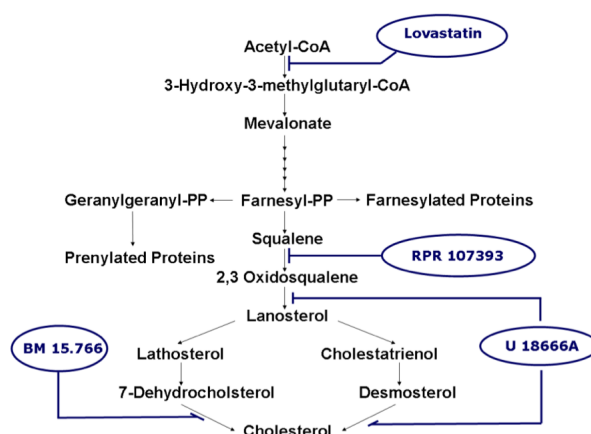


Abbildung 32 Angriffspunkte von RPR 107393A, BM 15.766 und U 18666A in der Cholesterinbiosynthese. Keiner der verwendeten Inhibitoren beeinflusst die Bildung von Isoprenoid-Vorstufen.

4.2.2.1. Zell-Viabilität

Alle drei Inhibitoren wurden zunächst in einer Konzentrationsreihe auf Zelltoxizität hin getestet. Die MTT-Reduktionsrate zeigt, dass im unteren mikromolaren Bereich keiner der Inhibitoren signifikante Effekte auf die metabolische Aktivität der Zellen ausübt (Abbildung 33). Die Konzentration von BM 15.766 wurde aus der Literatur übernommen (Yamashita et al., 2005).

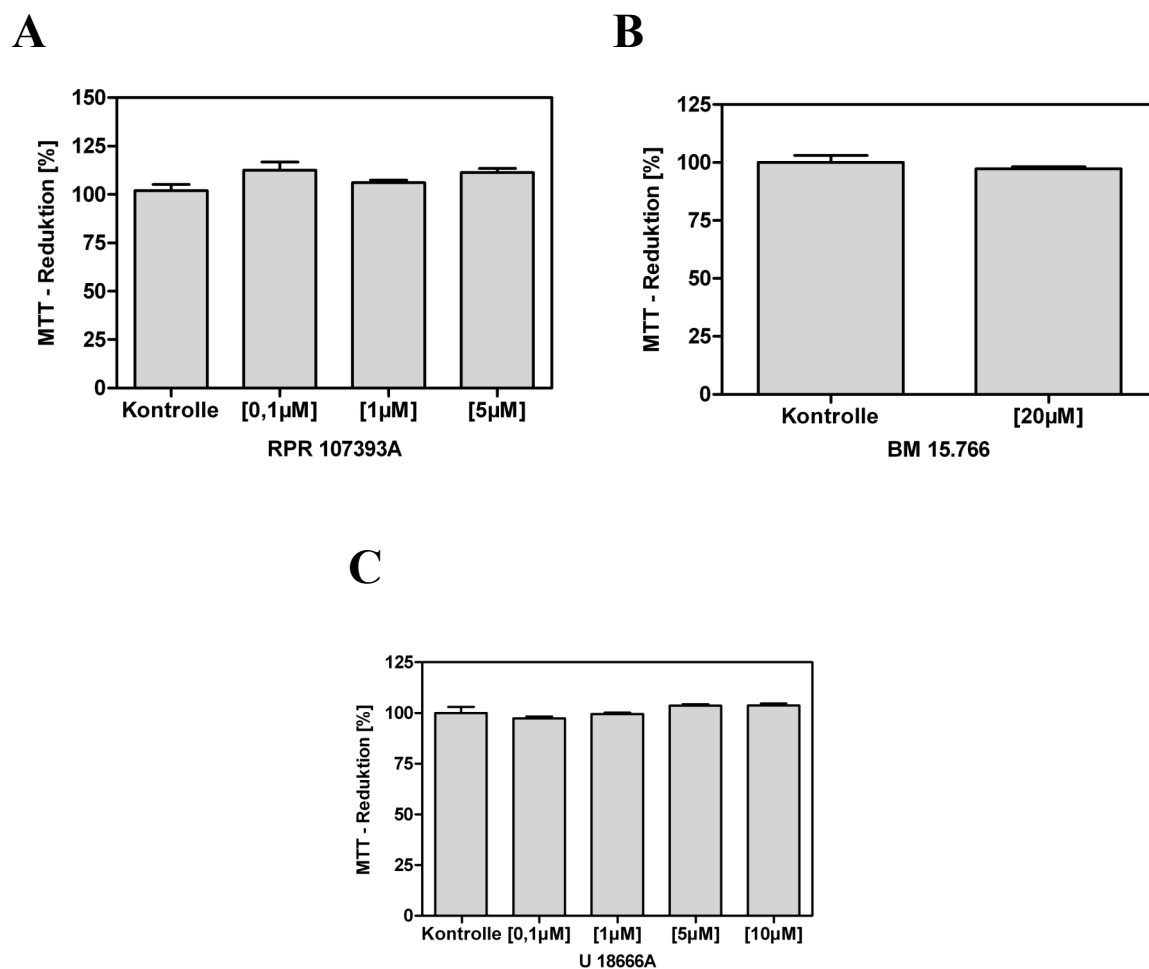


Abbildung 33 Einfluss von RPR 107393A (A), BM 15.766 (B) und U 18666A (C) auf die MTT-Reduktionsrate in SY5Y-APPwt Zellen. Je 100 000 Zellen wurden in einer 96well Platte ausgesät und für 24h mit den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Die detektierten Werte wurden auf den Proteingehalt der Probe normiert. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelerperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)

4.2.2.2. Cholesterinbestimmung

Um die Wirksamkeit der Inhibitoren auf die Cholesterinsynthese zu belegen, wurde in allen behandelten Zellen der Gehalt an Gesamtcholesterin und freiem Cholesterin bestimmt und mit unbehandelten Kontrollzellen verglichen. RPR 107393A bewirkte ab einer Konzentration von $1\mu\text{M}$ eine signifikante Abnahme an Gesamtcholesterin und freiem Cholesterin (Abbildung 34A). Der Effekt setzte sich konzentrationsabhängig fort. BM 15.766 führte in SY5Y-APPwt Zellen nur zu einer tendenziellen Abnahme an Gesamt- und freiem Cholesterin, wobei die Senkung des freien Cholesterins stärker ausgeprägt war (Abbildung 34B). Die Behandlung mit U 18666A zeigte bereits bei einer Konzentration von $0,1\mu\text{M}$ eine signifikante Abnahme des freien Cholesterins, welche bei höheren Konzentrationen verstärkt wurde. Das Gesamtcholesterin wurde durch die Behandlung mit U 18666A nicht gesenkt. Vielmehr kam es bei niedrigen Konzentrationen von $0,1$ bis $5\mu\text{M}$ zu einer tendenziellen, und bei $10\mu\text{M}$ zu einer signifikanten Zunahme (Abbildung 34C). Da sich das Gesamtcholesterin aus dem freien Cholesterin und dem intrazellulär vorliegenden veresterten Cholesterin zusammensetzt, kann aufgrund der detektierten Senkung des freien Cholesterins gefolgert werden, dass die Behandlung zu einer Zunahme an Cholesterinestern führte.

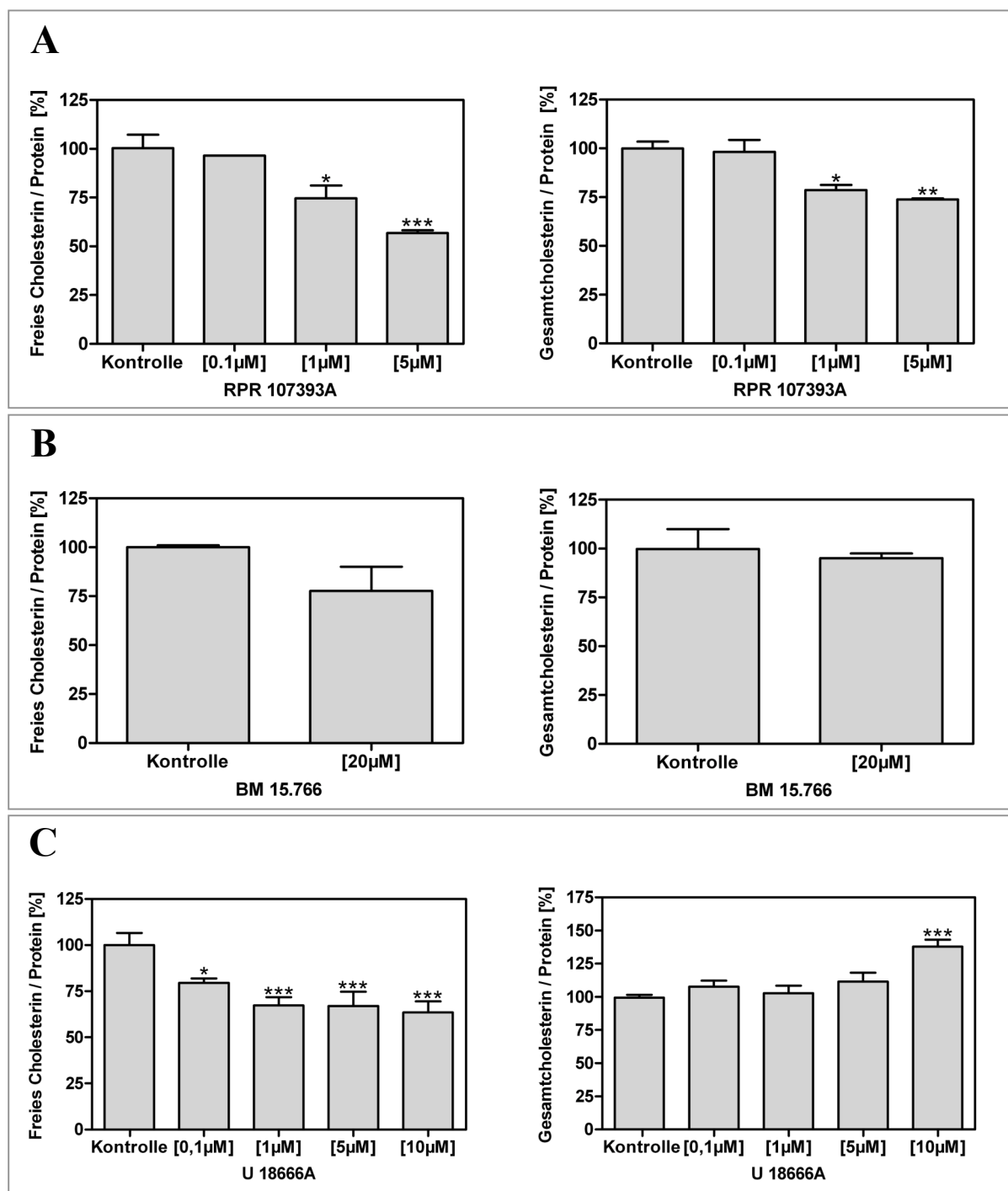


Abbildung 34 Einfluss von RPR 107393A (A), BM 15.766 (B) und U 18666A (C) auf den Cholesteringehalt in SY5Y-APPwt Zellen. Die Zellen wurden für 24h mit den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Untersucht wurde sowohl das freie, unveresterte Cholesterin (linke Seite), als auch das Gesamtcholesterin (rechte Seite) im Zellhomogenat. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)

4.2.2.3. Sekretion von Abeta₍₁₋₄₀₎

Das Medium der behandelten Zellen wurde mittels ELISA auf den Gehalt an sezerniertem Abeta₍₁₋₄₀₎ untersucht. Um die detektierte Abeta-Menge der einzelnen Proben zu normieren, wurden die Werte auf den zellulären Proteingehalt bezogen. Abbildung 35 zeigt die prozentuale Reduktion an Abeta₍₁₋₄₀₎ nach der Behandlung mit den Inhibitoren. RPR 107393A führte zu einer konzentrationsabhängigen Senkung von Abeta₍₁₋₄₀₎. Bereits ab 0,1µM konnte eine tendenzielle Reduktion beobachtet werden, bei höheren Konzentrationen von 1 und 5µM kam es zu einer signifikanten Abnahme von sezerniertem Abeta₍₁₋₄₀₎ (Abbildung 35A).

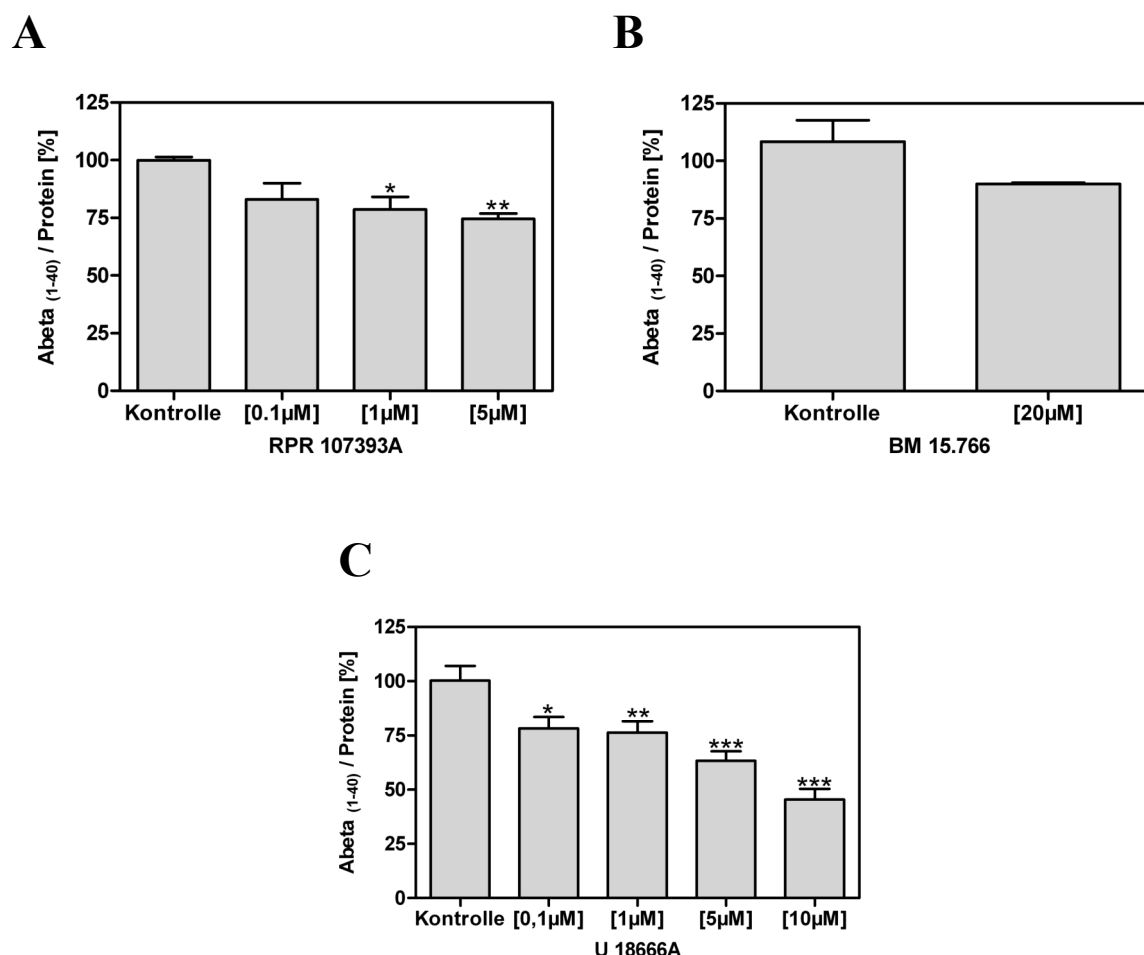


Abbildung 35 Einfluss von RPR 107393A (A), BM 15.766 (B) und U 18666A (C) auf die Menge an sezerniertem Abeta₍₁₋₄₀₎ in SY5Y-APPwt Zellen. Die Zellen wurden für 24h mit den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Nach der Behandlung wurde das Kulturmedium mittels ELISA analysiert. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)

Die Behandlung mit BM 15.766 resultierte in einer tendenziellen Abnahme an sezerniertem Abeta₍₁₋₄₀₎ (Abbildung 35B). Prozentual korreliert die detektierte Reduktion mit der des freien und Gesamtcholesterins (Abbildung 36C).

Die Behandlung mit U 18666A bewirkte von allen drei Inhibitoren die stärkste Reduktion an sezerniertem Abeta₍₁₋₄₀₎. Bei einer Konzentration von 0,1 μM wurde die Sekretion um 25% reduziert. Der Effekt verstärkte sich konzentrationsabhängig, so dass die höchste eingesetzte Konzentration von 10 μM zu einer Reduktion von 50% führte (Abbildung 35C). Der Vergleich von Gesamtcholesterin und Abeta Gehalt zeigt einen gegenläufigen Effekt von U 18666A. Während das Gesamtcholesterin konzentrationsabhängig ansteigt, nimmt der Gehalt an sezerniertem Abeta₍₁₋₄₀₎ konzentrationsabhängig ab (Abbildung 36D).

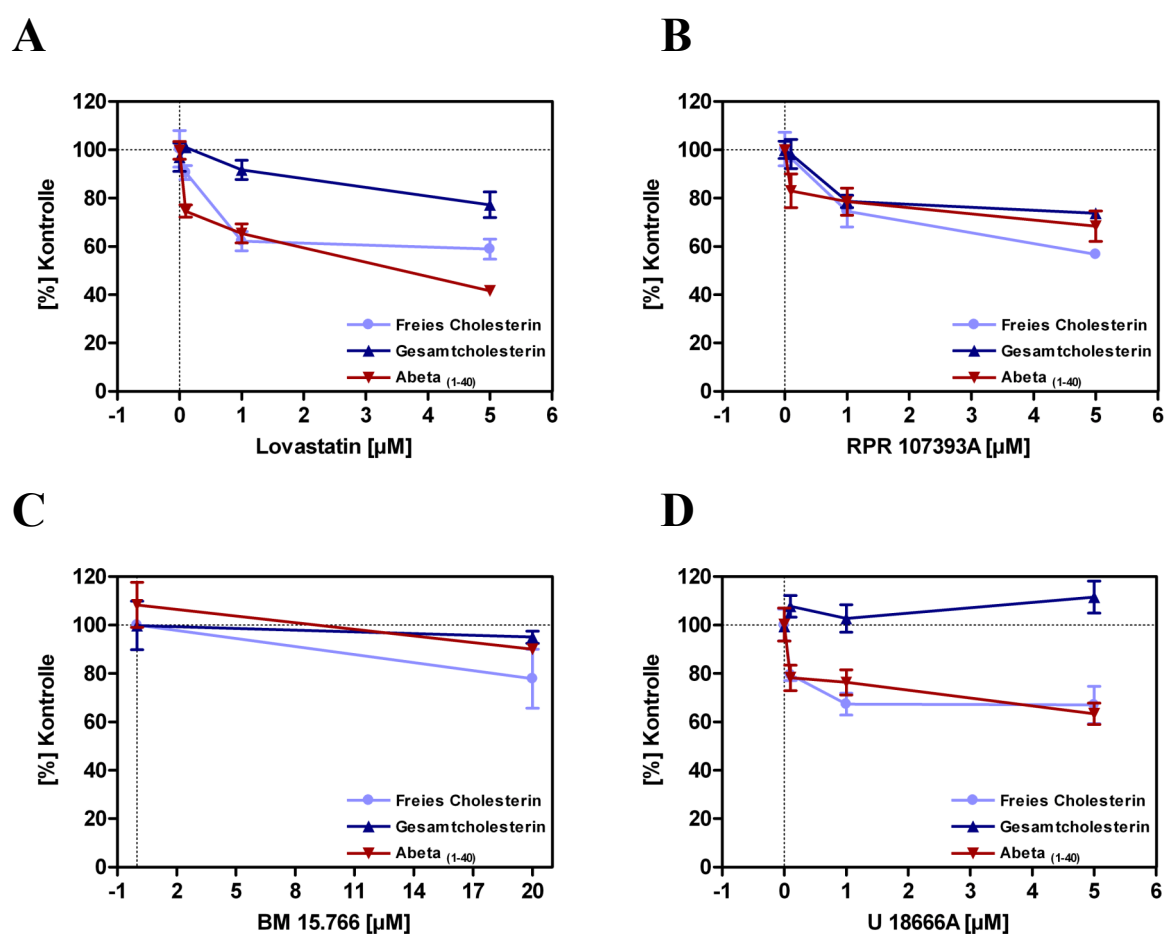


Abbildung 36 Zusammenfassende Darstellung der Effekte von Lovastatin (A), RPR 107393A (B), BM 15.766 (C) und U18666A (D) auf den Gehalt an freiem Cholesterin, Gesamtcholesterin und sezerniertem Abeta.

4.2.2.4. BACE-Aktivität

Abbildung 35 zeigt, dass alle drei Inhibitoren zu einer Reduktion von sezerniertem Abeta₍₁₋₄₀₎ führen. Um zu überprüfen, ob dieser Effekt auf eine verminderte Aktivität der β -Sekretase zurückzuführen ist, wurde das Enzym aus den behandelten Zellen isoliert und auf seine Funktion hin überprüft. Abbildung 37 zeigt die prozentuale Änderung der *in vitro* Aktivität in Bezug auf ein externes Substrat. Die Werte wurden auf den zellulären Proteingehalt der verwendeten Probe normiert. Weder RPR 107393A noch BM 15.766 oder U 18666A beeinflussten die Aktivität der Sekretase. Die detektierte Reduktion an Abeta kann daher nicht auf eine Inhibition der β -Sekretase zurückgeführt werden.

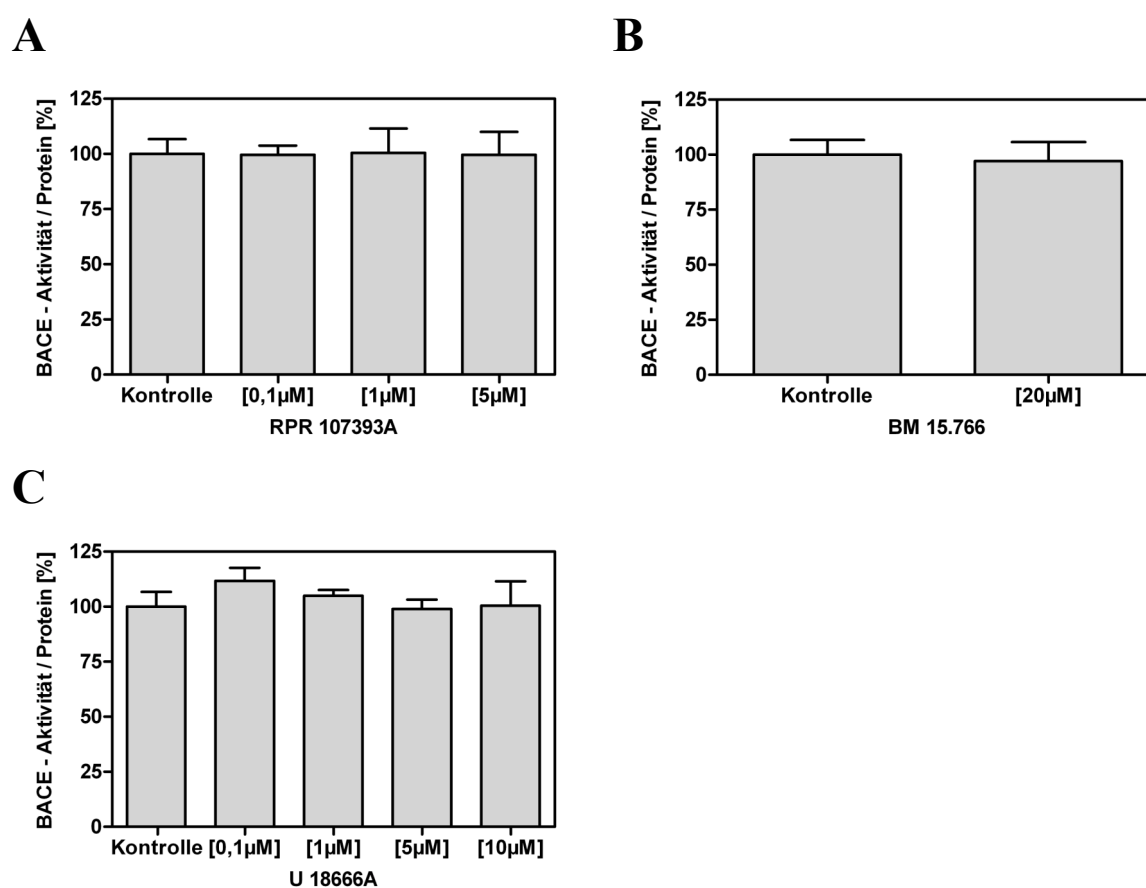


Abbildung 37 Einfluss von RPR 107393A (A), BM 15.766 (B) und U 18666A (C) auf die *in vitro* Aktivität der β -Sekretase BACE in SY5Y-APPwt Zellen. Das Enzym wurde aus den behandelten Zellen extrahiert und die Aktivität gegenüber einem zugegebenen Substrat bestimmt. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)

4.2.2.5. Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse

Zusammenfassend zeigen die bisherigen Ergebnisse, dass die Inhibition der Cholesterinbiosynthese an unterschiedlichen Schlüsselenzymen jeweils zu einer Reduktion der Aβ₍₁₋₄₀₎ Sekretion führt. Der Effekt scheint dabei vor allem von der Menge an freiem Cholesterin abhängig zu sein (Tabelle 5), da U 18666A bei zunehmendem Gesamtcholesteringehalt und reduziertem freiem Cholesterin zu einer Abnahme an Aβ führt (Abbildung 36).

	Freies Cholesterin	Gesamtcholesterin	FPP-Transfer	GGPP-Transfer	Aβ
Lovastatin	↓	↓	↓	↓	↓
GGTi 286	↔	↔	↔	↓	↔
FTi 277	↔	↔	↓	↔	↔
RPR 107393	↓	↓	↔	↔	↓
BM 15.766	↓	↓	↔	↔	↓
U 18666A	↓	↑	↔	↔	↓

Tabelle 5 Zusammenfassung der Effekte der eingesetzten Substanzen auf Cholesterin, Isoprenoide und Aβ

4.3. Modulation der Membranfluidität

Wie in den vorangegangenen Experimenten gezeigt werden konnte, ist die Statin-induzierte Reduktion der Aβ Sekretion durch die selektive Senkung von freiem Cholesterin zu provozieren. Freies Cholesterin ist als Strukturelement hauptsächlich in der Plasmamembran lokalisiert und determiniert maßgeblich deren physikalisch-chemische Eigenschaften. Ein wichtiger Parameter ist dabei die Membranfluidität, die direkt durch den Gehalt an freiem Cholesterin beeinflusst wird und eine essentielle Komponente für eine Vielzahl an membranären Prozessen darstellt. Im Folgenden wurden die Auswirkungen der Statinbehandlung auf die Fluidität und die APP-Prozessierung in den Membranen der Zellen untersucht. Des Weiteren wurde die Membranfluidität cholesterinunabhängig moduliert.

4.3.1. Lovastatin

4.3.1.1. Anisotropiemessungen an intakten Zellen

SY5Y-APPwt und HEK293-APPwt Zellen wurden für 48 Stunden mit 0,1 bis 5 μ M Lovastatin behandelt. Im Anschluss wurde die Anisotropie als Maß für die Fluidität in den Membranen der intakten Zellen mittels Fluoreszenz Polarisationspektroskopie ermittelt. Als Fluoreszenzfarbstoff diente TMA-DPH. Abbildung 38A zeigt den Effekt von Lovastatin auf die Membranfluidität in SY5Y-APPwt Zellen. Es konnte eine konzentrationsabhängige Abnahme der Anisotropie beobachtet werden, was einer Zunahme der Membranfluidität entspricht. Den gleichen Effekt zeigten HEK293-APPwt Zellen (Abbildung 38B), wobei die Abnahme im neuronalen Zellmodell stärker ausgeprägt war.

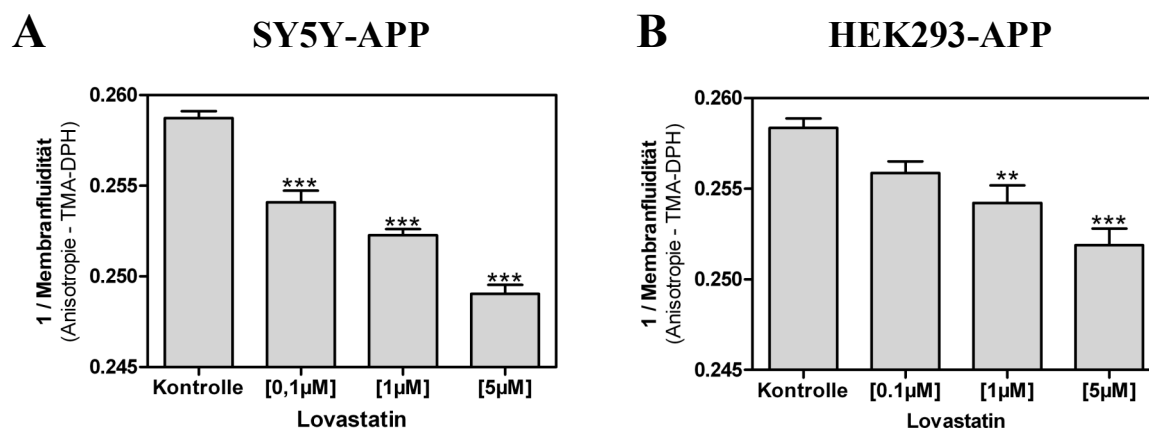


Abbildung 38 Einfluss von Lovastatin auf die Anisotropie der Plasmamembran von intakten SY5Y-APPwt (A) und HEK293-APPwt (B) Zellen. Nach der Behandlung wurden 700 000 Zellen in HBSS plus TMA-DPH [2 μ M] mittels Fluoreszenz Polarisationspektroskopie vermessen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 9 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)

4.3.1.2. Korrelation

Die detektierte Membranfluidität wurde mit dem Gehalt an sezerniertem Abeta korreliert. Abbildung 39A zeigt die Korrelation für Abeta₍₁₋₄₀₎ in SY5Y-APPwt Zellen. Die basale Menge an Abeta₍₁₋₄₂₎ lag in SY5Y-APPwt Zellen unterhalb der Nachweisgrenze. In HEK293-APPwt Zellen wurde die Anisotropie sowohl mit dem Abeta 1-40er (Abbildung 39B), als auch mit dem Abeta 1-42er Fragment (Abbildung 39C) korreliert. Dargestellt sind die Konzentrationen 0; 0,1; 1 und 5µM Lovastatin.

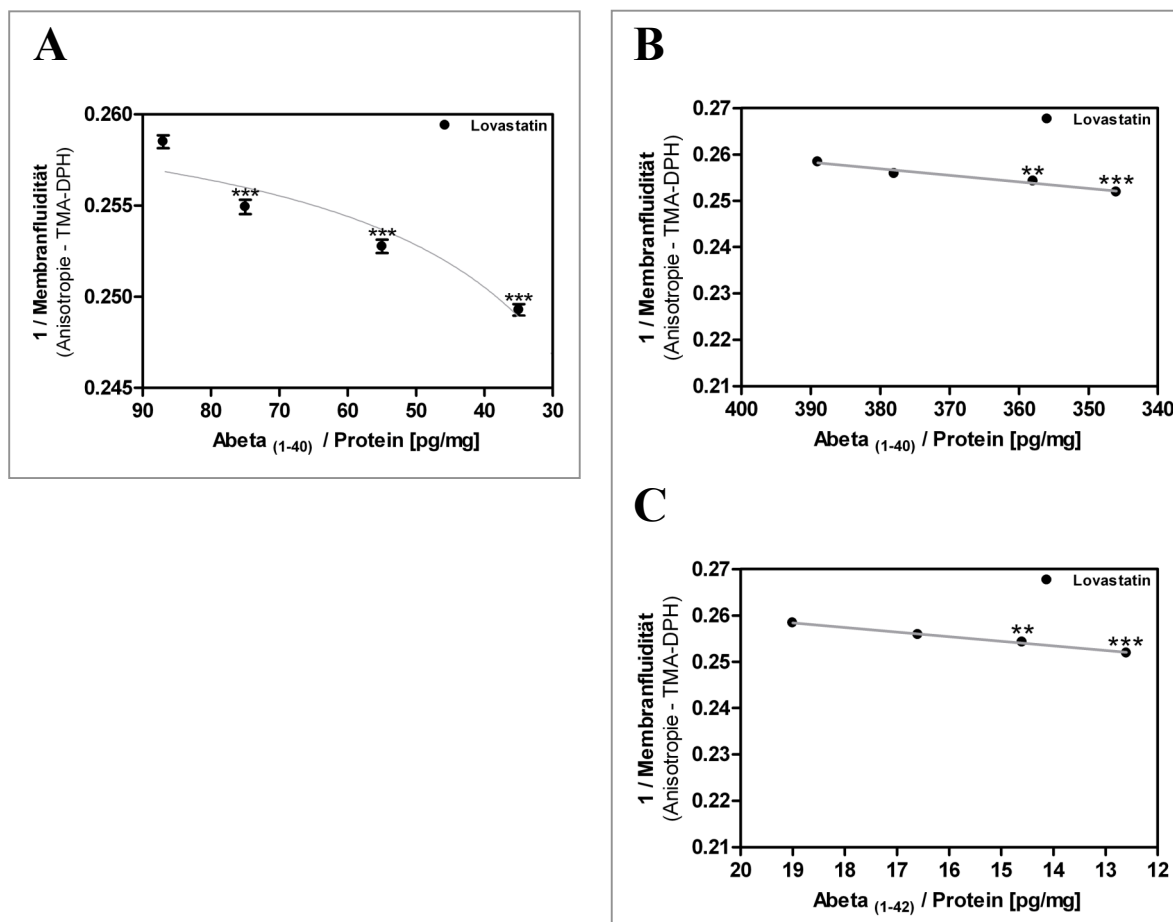


Abbildung 39 Korrelation von Membranfluidität und Abeta Produktion. A) SY5Y-APPwt Zellen; B und C) HEK-APPwt Zellen. Die dargestellten Punkte entsprechen den eingesetzten Konzentrationen von 0; 0,1; 1 und 5µM Lovastatin.

4.3.1.3. Western Blot Analyse der APP-Prozessierung

Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass Lovastatin zu veränderten Membraneigenschaften führt, was direkten Einfluss auf die APP-Prozessierung hat. Um ein genaueres Bild der veränderten Prozessierungswege zu erhalten, wurden mittels Western Blot Analyse die Fragmente der drei beteiligten Sekretasen analysiert. Zunächst wurde die Menge an APP detektiert, um auszuschließen, dass die beobachtete Reduktion an Abeta auf eine verminderte Expression von APP zurückzuführen ist. Abbildung 40 zeigt den Einfluss von Lovastatin auf den APP-Gehalt in SY5Y-APPwt Zellen (linke Seite) und in HEK293-APPwt Zellen (rechte Seite). In beiden Zellmodellen konnte kein verändertes APP-Expressionsmuster nach Lovastatin-Behandlung detektiert werden. Für die statistische Auswertung wurde die Bandenstärke densitometrisch bestimmt und auf die der Ladungskontrolle GAPDH normiert.

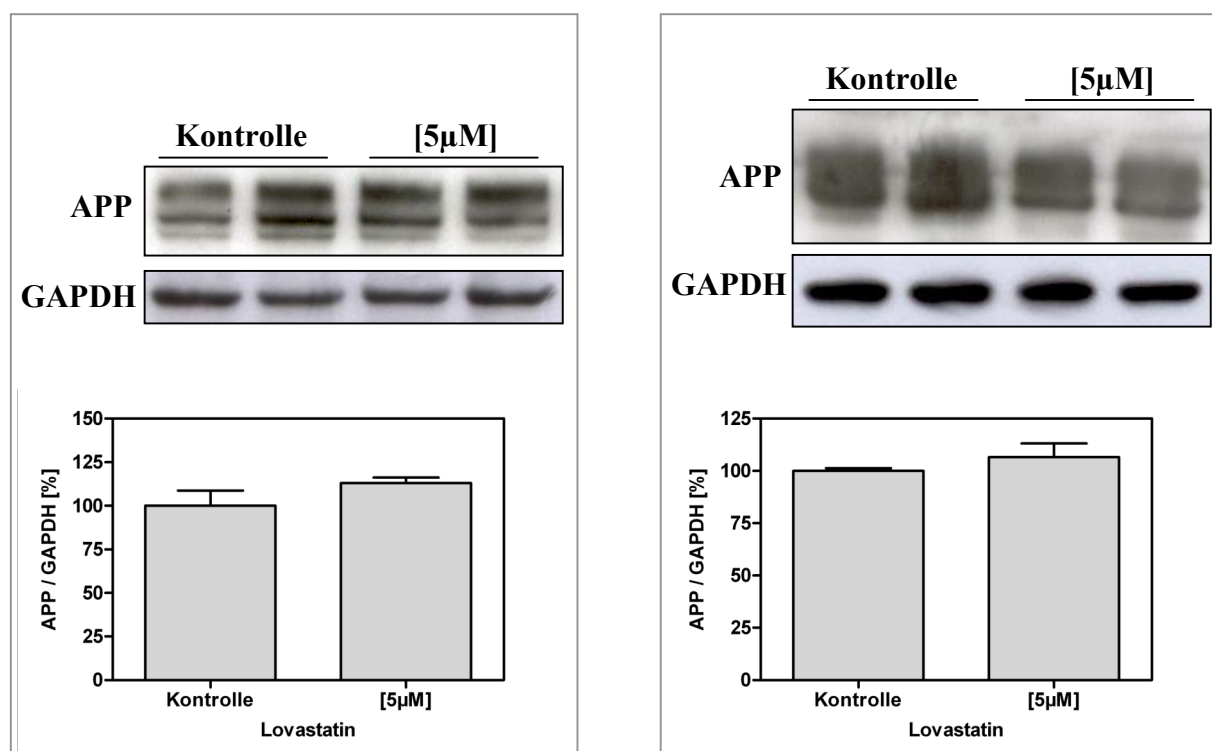


Abbildung 40 Einfluss von Lovastatin auf die Menge an APP in SY5Y-APPwt (linke Seite) und HEK293-APPwt (rechte Seite) Zellen. Die Zellen wurden 48h mit Lovastatin inkubiert. Die Analyse erfolgte im Zellhomogenat mit Hilfe des Antikörpers C1/6.1. Die Bandenstärke wurde auf GAPDH als Ladungskontrolle normiert. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit ImageJ und PrismGraph Pad 4.0. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 12 Einzelerperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)

Um Aufschluss über den Prozessierungsanteil der α -Sekretase zu erhalten, wurde das Medium der behandelten Zellen auf den Gehalt an APPs α hin untersucht (Abbildung 41). Da im Medium keine Ladungskontrolle möglich ist, wurde die Bandenstärke auf den Proteingehalt im Zelllysat normiert. Die Behandlung mit Lovastatin führte in beiden Zellmodellen zu einer signifikanten Zunahme an APPs α .

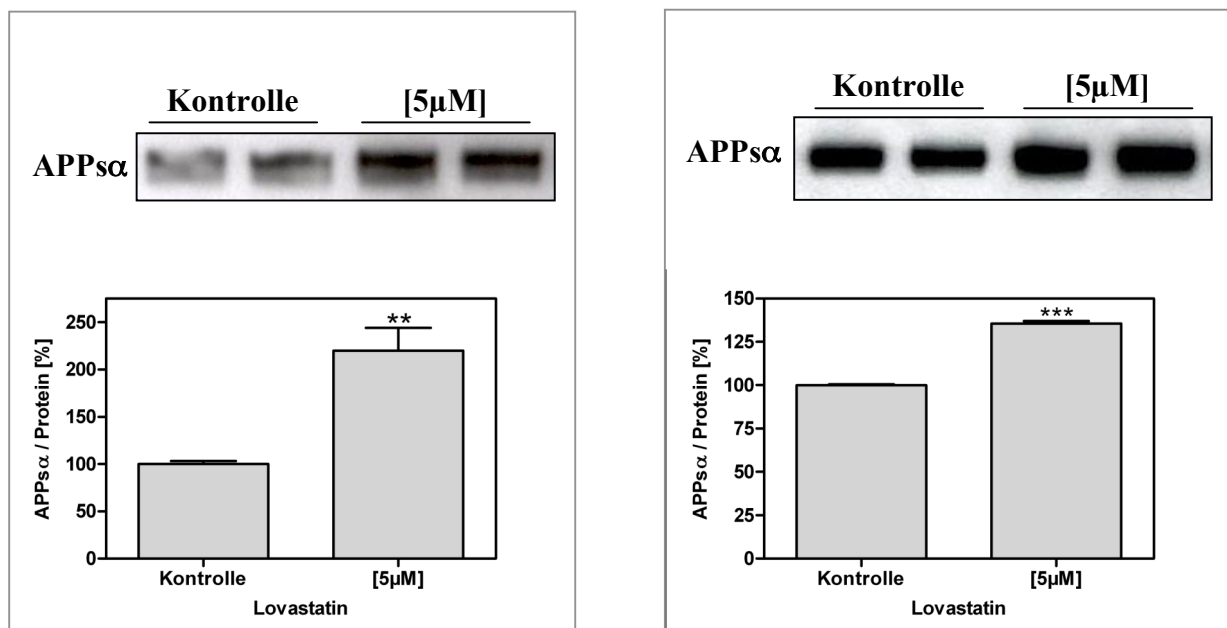


Abbildung 41 Einfluss von Lovastatin auf die Sekretion von APPs α in SY5Y-APPwt (linke Seite) und HEK293-APPwt (rechte Seite) Zellen. Nach 48stündiger Inkubation wurde das Kulturmedium gesammelt und mit Hilfe des Antikörpers 6E10 analysiert. Die Bandenstärke wurde densitometrisch ausgewertet und auf den zellulären Proteingehalt normiert. Die densitometrische und statistische Analyse erfolgte mit ImageJ und PrismGraph Pad 4.0. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 12 Einzelerperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass Lovastatin zu einer Verschiebung der APP-Prozessierung zugunsten der α -Sekretase führt, was mit einer Reduktion der amyloidenen Prozessierung einhergeht. Um diesen Befund zu bestätigen, wurden zusätzlich die membranständigen C-terminalen Fragmente (CTFs), C99 (β -Sekretase) und C83 (α -Sekretase) beider Prozessierungswege untersucht. Zusammen mit den sezernierten Fragmenten ergibt sich daraus eine detaillierte Aussage über die Aktivität der α -, β - und γ -Sekretase. Als Ladungskontrolle diente wiederum GAPDH.

Abbildung 42 zeigt die Western Blot Analyse der Fragmente aus dem Zellhomogenat von SY5Y-APPwt Zellen (linke Seite) und HEK293-APPwt Zellen (rechte Seite). In SY5Y-APPwt Zellen konnte kein C99 detektiert werden, da die Menge bereits in den Kontrollen unterhalb der Detektionsgrenze lag.

Die Behandlung mit Lovastatin führte zu einer starken Zunahme an C83, was mit der detektierten Zunahme an APP α korrespondiert. In HEK293-APPwt Zellen konnte sowohl eine Abnahme von C99, als auch eine Zunahme an C83 detektiert werden, was mit den Ergebnissen der sezernierten Fragmente übereinstimmt.

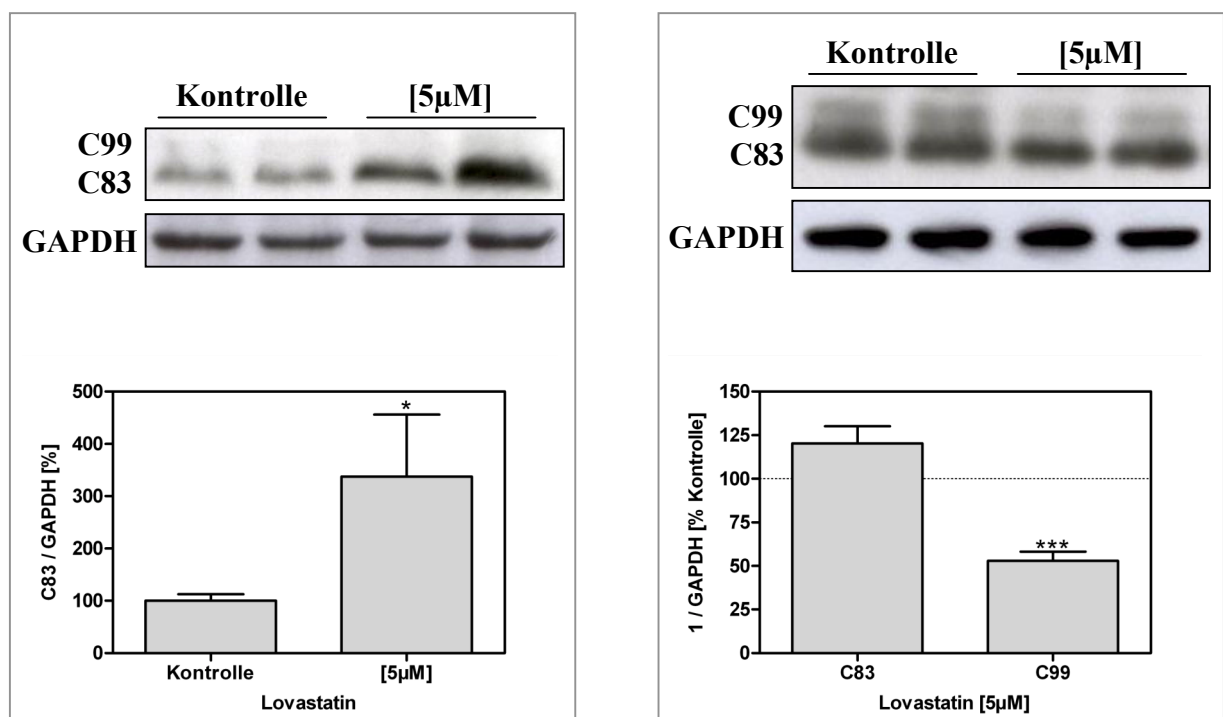
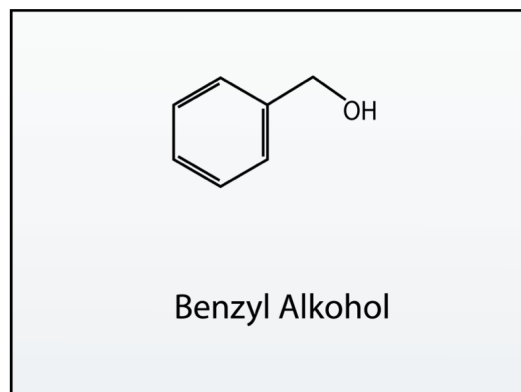


Abbildung 42 Einfluss von Lovastatin auf den Gehalt an C99 und C83 in SY5Y-APPwt (linke Seite) und HEK293-APPwt (rechte Seite) Zellen. Nach 48 stündiger Inkubation mit Lovastatin wurden die Zellen geerntet und lysiert. Die Analyse des Zellhomogenats erfolgte mit Hilfe des Antikörpers C1/6.1. Zur Normierung wurde die Bandenstärke auf GAPDH als Ladungskontrolle bezogen. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit ImageJ und PrismGraph Pad 4.0. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 12 Einzelerperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)

4.3.2. Studien mit dem Membranfluidizer Benzyl Alkohol

Um zu überprüfen, ob die beobachteten Effekte nach der Statin-Behandlung auf die eigentliche Reduktion des freien Cholesterins zurückzuführen sind, oder aber durch die daraus resultierenden Veränderungen der Membraneigenschaften hervorgerufen werden, wurde die Membranfluidität im folgenden Versuchsansatz unabhängig vom Cholesterin moduliert. Dafür wurden die Zellen 24 Stunden lang mit dem Membranfluidizer Benzyl Alkohol behandelt. Benzyl Alkohol wird durch den Benzyl Ring in der Membran verankert und führt zu einer Zunahme an Membranfluidität. Die Lipidzusammensetzung wird dabei nicht verändert.



4.3.2.1. Zell-Viabilität

Da Alkohol dosisabhängig zelltoxisch wirkt, wurden zunächst mittels MTT-Assay Konzentrationen ermittelt, die keine Beeinträchtigung der Zell-Viabilität in SY5Y-APPwt und HEK293-APPwt Zellen hervorrufen. Bei Konzentrationen von 1-10mM zeigte die Behandlung keine signifikanten Effekte auf die MTT-Reduktionsrate (Abbildung 43A). Die höchste Konzentration von 10mM wurde zusätzlich im ToxiLight-Assay getestet. Benzyl Alkohol zeigte hier in beiden Zellmodellen einen tendenziell protektiven Effekt (Abbildung 43B).

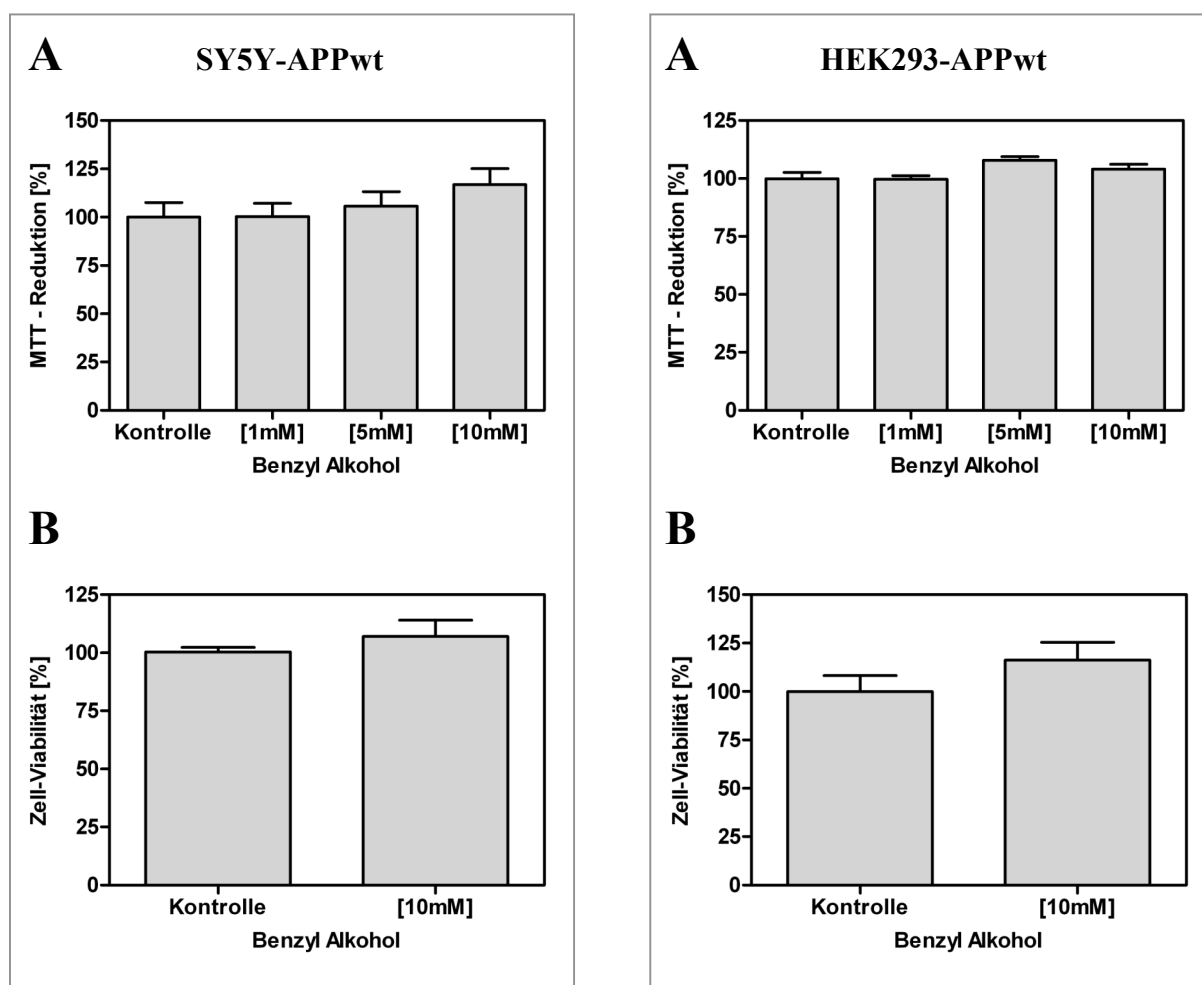


Abbildung 43 Einfluss von Benzyl Alkohol auf die Zell-Viabilität in SY5Y-APPwt (links) und HEK293-APPwt (rechts) Zellen; die Zellen wurden 24h lang mit den angegebenen Konzentrationen behandelt; A) MTT-Assay; B) ToxiLight-Assay. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 12 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)

4.3.2.2. Anisotropiemessungen an isolierten Membranen

Zunächst wurde an isolierten HEK-293-APPwt Zellmembranen die fluidisierende Wirkung von Benzyl Alkohol überprüft. Die Membranen wurden dafür *in vitro* mit 10mM Benzyl Alkohol versetzt und die Anisotropie mittels DPH- und TMA-DPH Fluoreszenzspektroskopie ermittelt. Mit beiden Farbstoffen konnte eine signifikante Abnahme der Anisotropie nach Benzyl Alkohol Zugabe detektiert werden, was einer entsprechenden Zunahme der Membranfluidität entspricht (Abbildung 44). Die beobachtete Fluidisierung der Membranen war mit DPH (A) stärker ausgeprägt, als mit TMA-DPH (B).

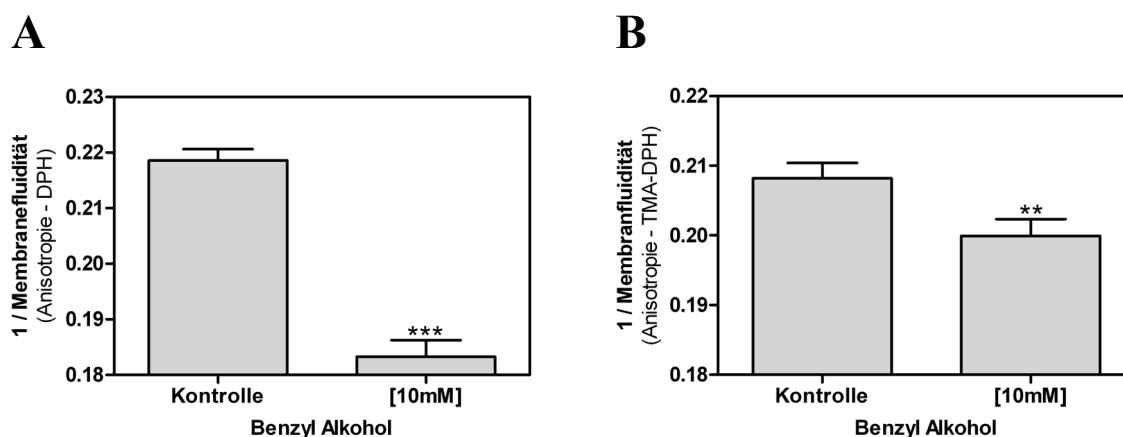


Abbildung 44 Einfluss von Benzyl Alkohol auf die Anisotropie von isolierten HEK293-APPwt Zellmembranen. Die isolierten Membranen wurden für 20 Minuten mit 10mM Benzyl Alkohol inkubiert und die Anisotropie mittels Fluoreszenz Polarisationspektroskopie bestimmt; A) DPH; B) TMA-DPH. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)

4.3.2.3. Pyren-Fluoreszenzmessungen an isolierten Membranen

Zusätzlich zu den Anisotropiemessungen wurde die Annular- und die Bulk-Fluidität mit Hilfe der Fluoreszenzsonde Pyren in isolierten HEK293-APPwt Membranen bestimmt. Wiederum wurden die isolierten Membranen *in vitro* mit 10mM Benzyl Alkohol behandelt. Abbildung 45 zeigt die veränderte Ratio von eximeren und monomeren Pyrenmolekülen. Sowohl die annulare (A), als auch die bulk-Fluoreszenz (B) zeigte einen signifikanten Anstieg der eximeren Pyrenstrukturen, was für eine erhöhte laterale Diffusionsfreiheit innerhalb der Membran spricht.

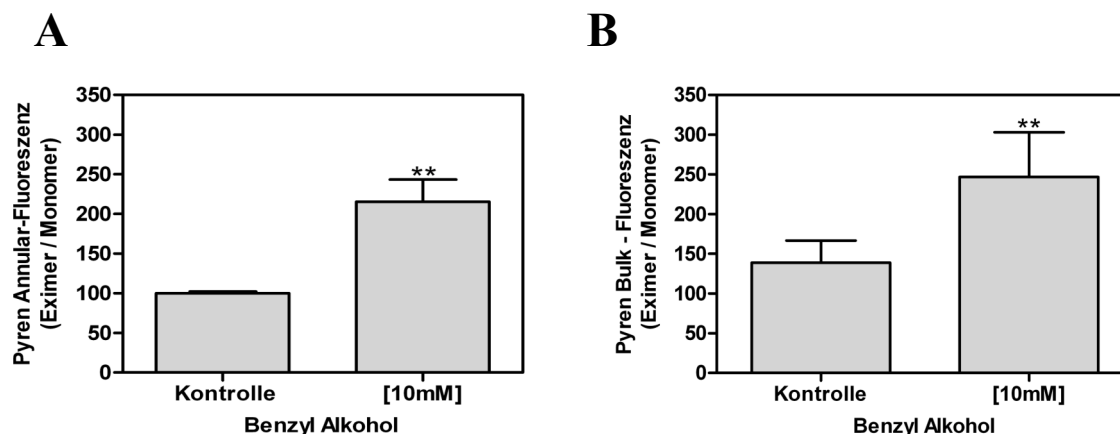


Abbildung 45 Einfluss von Benzyl Alkohol auf die Pyren-Fluoreszenz in isolierten HEK293-APPwt Zellmembranen. Die Membranen wurden 20 Minuten mit 10mM Benzyl Alkohol inkubiert. Im Anschluss wurde mittels Fluoreszenz Polarisationsspektroskopie die Annular (A) und die Bulk (B) -Fluoreszenz von Pyren bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)

4.3.2.4. Anisotropiemessungen an intakten Zellen

Die fluidisierende Wirkung von Benzyl Alkohol wurde im Folgenden auch durch Anisotropiemessungen in den Membranen von intakten Zellen überprüft. Hierfür wurden SY5Y-APPwt und HEK293-APPwt Zellen für 24 Stunden mit 5 und 10mM Benzyl Alkohol behandelt. Als Fluoreszenzsonde konnte in intakten Zellen nur TMA-DPH verwendet werden, da DPH ohne den hydrophilen TMA-Anker durch die Membran diffundiert und ins Innere der Zelle gelangt. Abbildung 46 zeigt, dass Benzyl Alkohol sowohl in SY5Y-APPwt (A), als auch in HEK293-APPwt (B) Zellen eine konzentrationsabhängige Abnahme der Anisotropie und damit eine entsprechende Zunahme der Membranfluidität bewirkte. Die Zunahme der Membranfluidität war dabei in den neuronalen SY5Y-APPwt Zellen stärker ausgeprägt als in HEK293-APPwt Zellen.

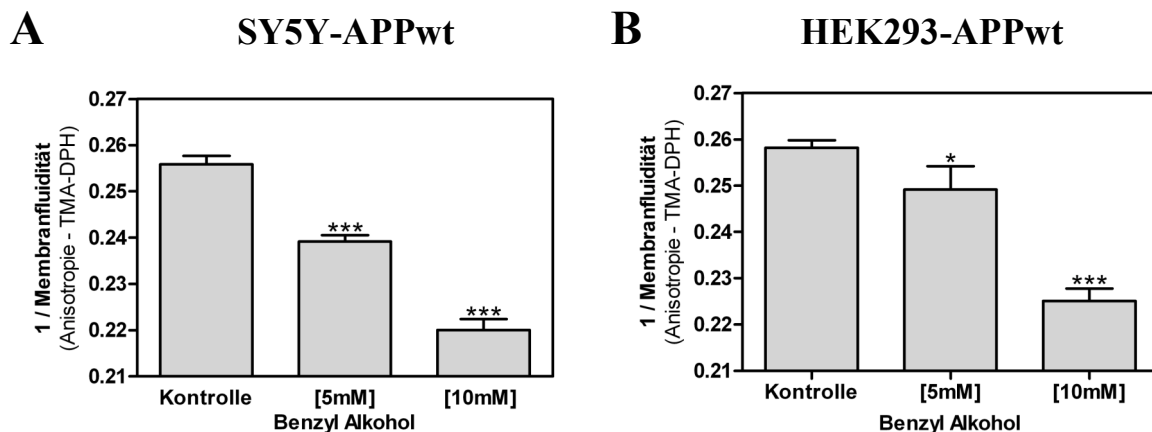


Abbildung 46 Einfluss von Benzyl Alkohol auf die Anisotropie der Plasmamembran von intakten SY5Y-APPwt (A) und HEK293-APPwt (B) Zellen. Die Zellen wurden 24h mit 5 bzw. 10mM Benzyl Alkohol behandelt. Im Anschluss wurde die Anisotropie der Membranen mittels TMA-DPH als Fluoreszenz-Sonde bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 9 Einzelerperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)

4.3.2.5. Sekretion von Abeta

Wie Lovastatin bewirkte Benzyl Alkohol in beiden Zellmodellen eine konzentrationsabhängige Zunahme der Membranfluidität. Im nächsten Schritt wurde die Sekretion von Abeta nach Benzyl Alkohol Behandlung gemessen, um zu überprüfen, ob die Statin-induzierte Reduktion auf das Fehlen von Cholesterin, oder aber auf die veränderten Membraneigenschaften zurückzuführen ist. Abbildung 47 zeigt, dass Benzyl Alkohol in beiden Zellmodellen zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme von sezerniertem Abeta führte. In SY5Y-APPwt Zellen (A) konnte nur die Menge an Abeta₍₁₋₄₀₎ detektiert werden. Bereits 1mM Benzyl Alkohol bewirkte in den Zellen eine signifikante Reduktion der Abeta Sekretion. Die höchste eingesetzte Konzentration von 10mM führte zu einer 50%igen Abnahme.

In HEK293-APPwt Zellen (B und C) wurde sowohl die Menge an sezerniertem Abeta₍₁₋₄₀₎, als auch Abeta₍₁₋₄₂₎ bestimmt. Beide Fragmente wurden durch die Benzyl Alkohol Behandlung signifikant und konzentrationsabhängig reduziert. Die prozentuale Abnahme beider Fragmente war nahezu identisch. Der Vergleich beider Zellmodelle zeigt wiederum einen stärkeren Effekt in SY5Y-APPwt Zellen.

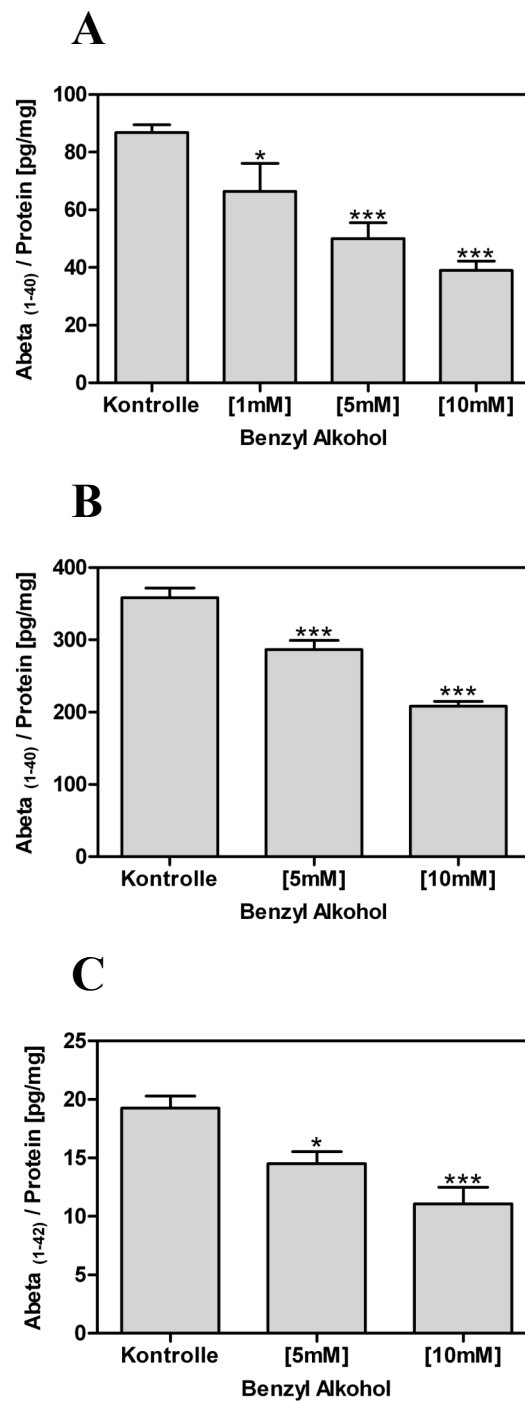


Abbildung 47 Einfluss von Benzyl Alkohol auf den Gehalt an sezerniertem Abeta in SY5Y-APPwt (A) und HEK293-APPwt (B und C) Zellen. Die Zellen wurden 24h mit 1-10mM Benzyl Alkohol behandelt; im Anschluss wurde das Medium mittels ELISA analysiert. Im Kulturmedium von SY5Y-APPwt Zellen konnte kein Abeta₍₁₋₄₂₎ nachgewiesen werden. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 9 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)

4.3.2.6. Korrelation

Der Befund, dass auch Benzyl Alkohol zu einer Abnahme an sezerniertem Abeta führt, spricht dafür, dass die veränderten Membraneigenschaften zu einer Verschiebung der APP-Prozessierung zugunsten der α -Sekretase führen. Abbildung 48 zeigt die Korrelation der detektierten Abnahme von Anisotropie und Abeta in SY5Y-APPwt (A) und HEK293-APPwt Zellen (B und C).

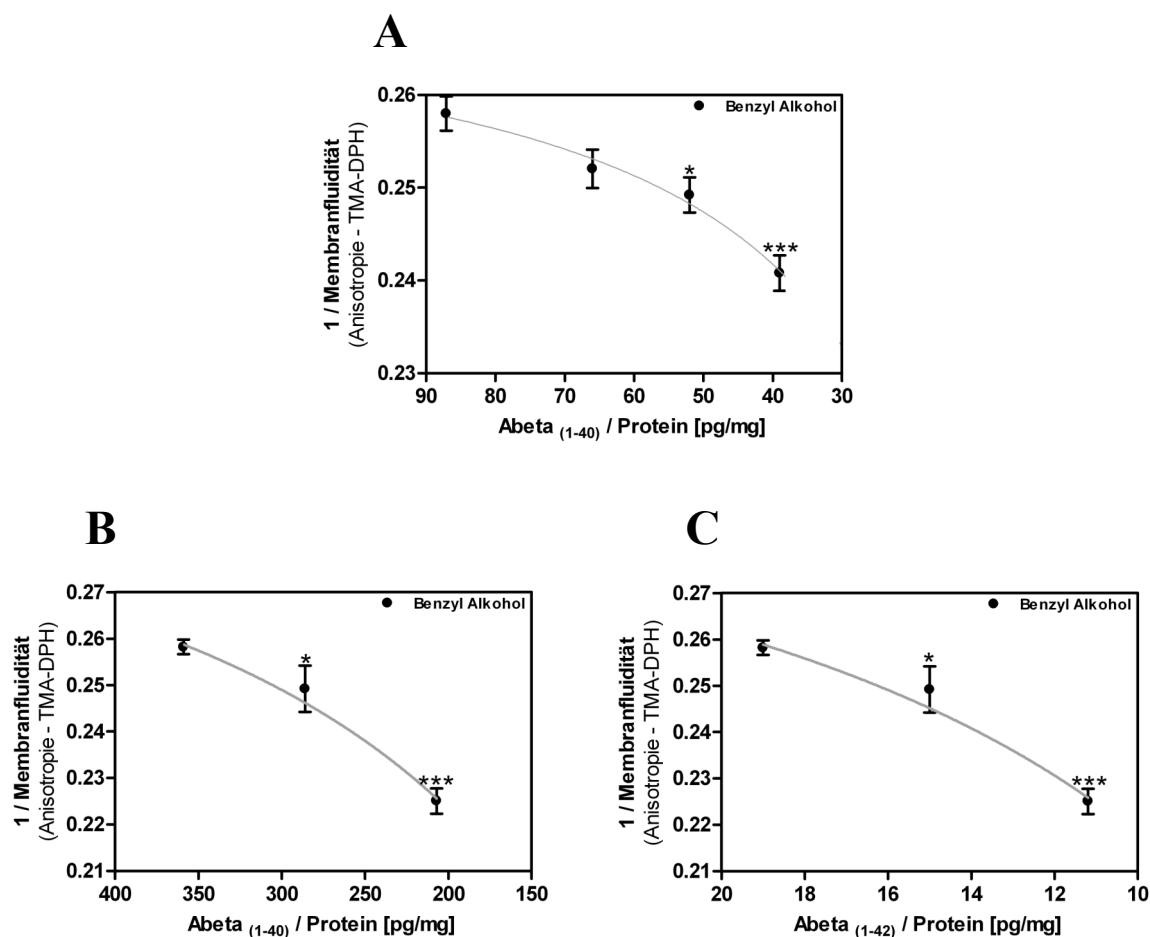


Abbildung 48 Korrelation von Membranfluidität und Abeta Produktion; A) SY5Y-APPwt Zellen; B und C) HEK293-APPwt Zellen. Dargestellt sind die eingesetzten Konzentrationen von 0; (1); 5 und 10mM Benzyl Alkohol.

4.3.2.7. Western Blot Analyse der APP-Prozessierung

Für eine detaillierte Analyse der APP-Prozessierung, wurden wiederum die Fragmente der Sekretasen mittels Western Blot überprüft. Abbildung 49 zeigt, dass die Proteinmenge an APP in SY5Y-APPwt (linke Seite) und HEK293-APPwt (rechte Seite) Zellen durch Benzyl Alkohol nicht verändert wurde. Für die statistische Analyse wurden die Bandenintensitäten densitometrisch ausgewertet und auf die Ladungskontrolle GAPDH normiert.

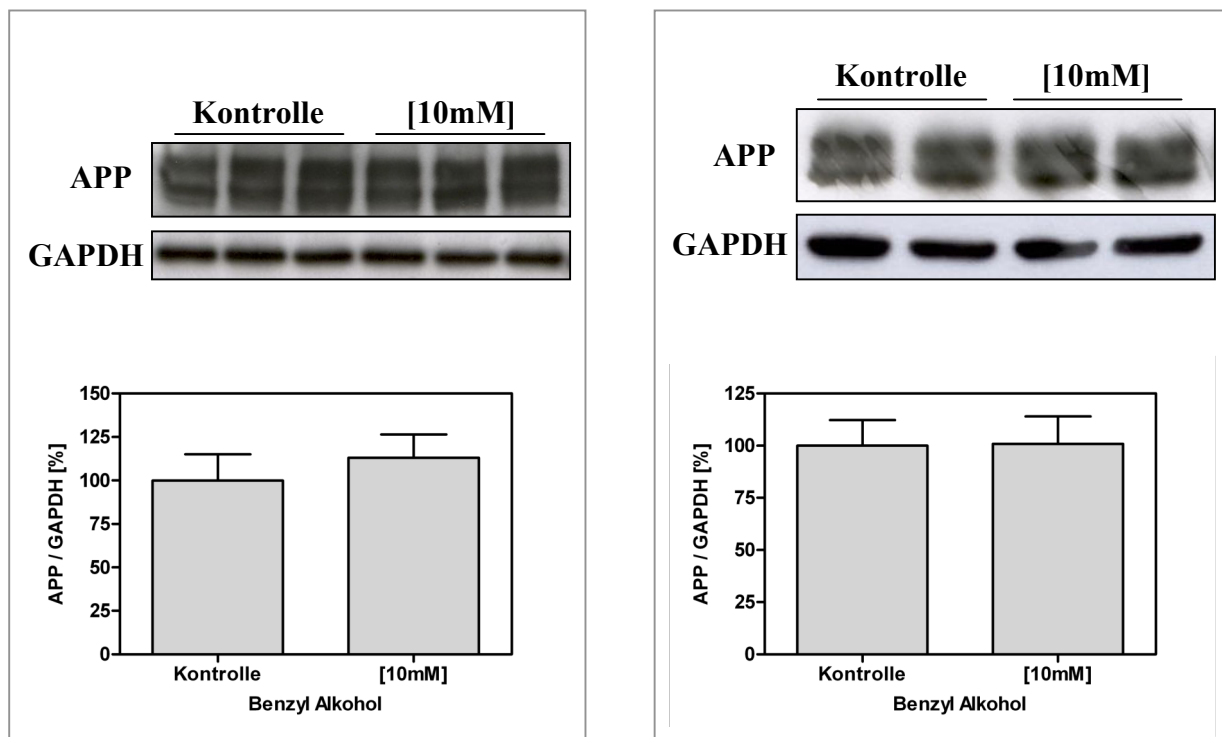


Abbildung 49 Einfluss von Benzyl Alkohol auf die Menge an APP in SY5Y-APPwt (linke Seite) und HEK293-APPwt (rechte Seite) Zellen. Die Zellen wurden 24h mit Benzyl Alkohol inkubiert. Die Analyse erfolgte im Zellhomogenat mit Hilfe des Antikörpers C1/6.1. Die Bandenstärke wurde auf GAPDH als Ladungskontrolle normiert. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit ImageJ und PrismGraph Pad 4.0. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)

Im Medium der behandelten Zellen wurde das sezernierte Fragment der α -Sekretase, APP α , bestimmt und die detektierte Bandenstärke auf den zellulären Proteingehalt normiert (Abbildung 50). Aufgrund der geringen basalen Menge an APP ist auch das sezernierte Fragment in SY5Y-APPwt Zellen (linke Seite) in deutlich schwächerem Maße zu detektieren als in HEK293-APPwt Zellen (rechte Seite). In beiden Zellmodellen konnte jedoch eine signifikante Zunahme an APP α nach der Behandlung mit Benzyl Alkohol beobachtet werden, was auf eine verstärkte α -Sekretase Prozessierung hindeutet.

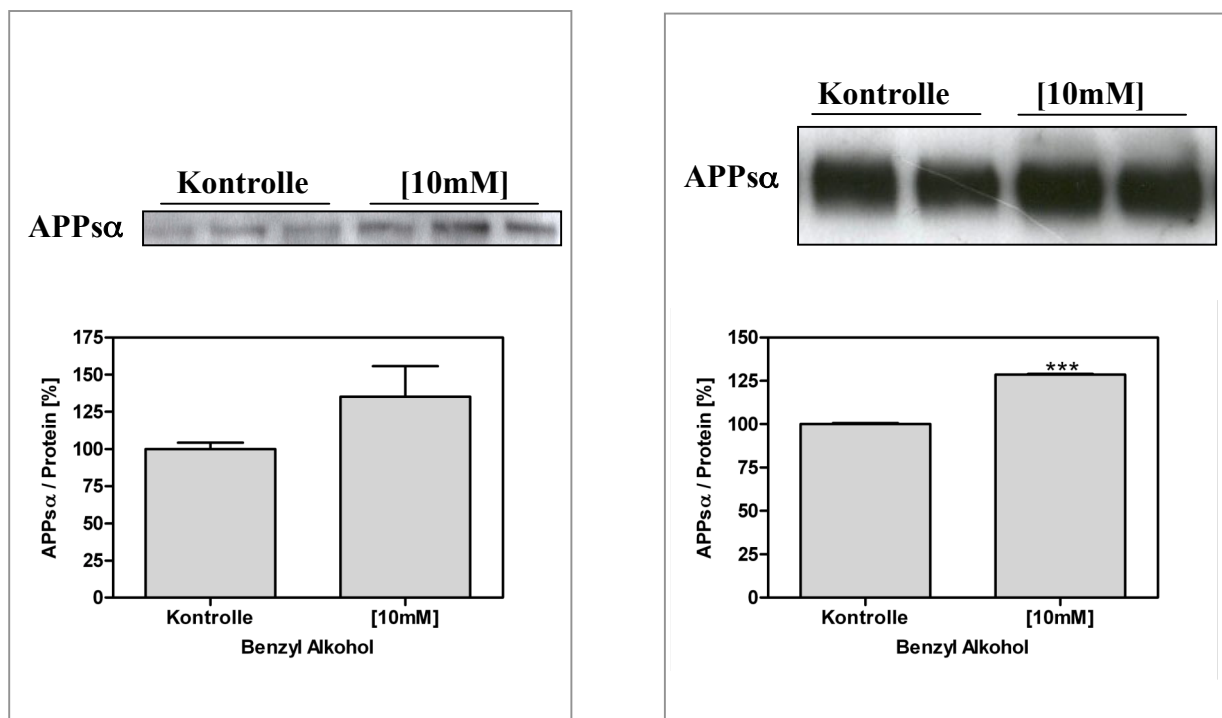


Abbildung 50 Einfluss von Benzyl Alkohol auf die Sekretion von APP α in SY5Y-APPwt (linke Seite) und HEK293-APPwt (rechte Seite) Zellen. Nach 24stündiger Behandlung mit Benzyl Alkohol wurde das Kulturmedium gesammelt und mit Hilfe des Antikörpers 6E10 auf den Gehalt an APP α untersucht. Die Bandenstärke wurde auf den Proteingehalt im Zellhomogenat normiert. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit ImageJ und PrismGraph Pad 4.0. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** p < 0,0001)

Um diesen Befund zu bestätigen, wurden auch die zellulären Fragmente beider Sekretasen analysiert. Abbildung 51 zeigt, dass sowohl in SY5Y-APPwt (linke Seite), als auch in HEK293-APPwt (rechte Seite) Zellen die Behandlung mit Benzyl Alkohol zu einer signifikanten Zunahme an C83 führt, was in Übereinstimmung zu der detektierten Menge an APPs α steht. Das β -Sekretase Fragment C99 konnte in SY5Y-APPwt Zellen nicht detektiert werden. In HEK293 Zellen zeigte sich jedoch, dass Benzyl Alkohol eine Reduktion von C99 induziert, was ebenfalls mit der detektierten Abnahme an Abeta korrespondiert. Insgesamt zeigen die Befunde, dass die Behandlung mit Benzyl Alkohol zu einer verminderten β -Sekretase Prozessierung führte, was mit einer stärkeren nicht-amyloidogenen Prozessierung einherging.

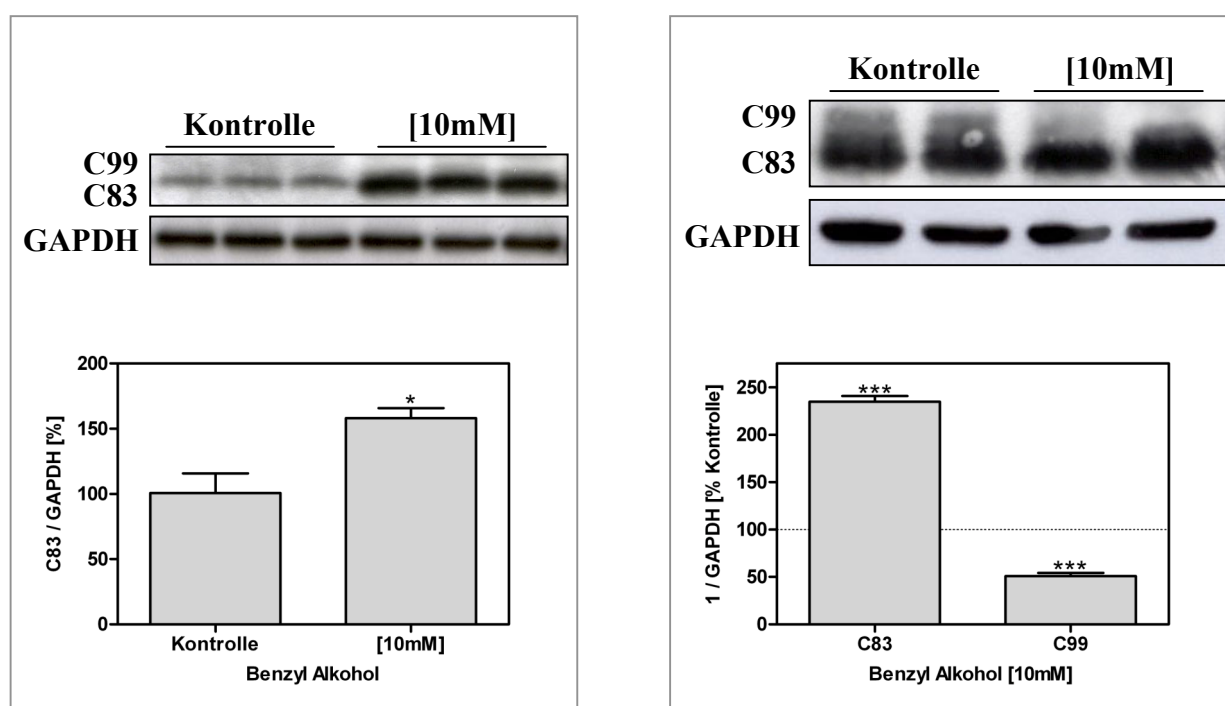


Abbildung 51 Einfluss von Benzyl Alkohol auf die Menge an C99 und C83 in SY5Y-APPwt (linke Seite) und HEK293-APPwt (rechte Seite) Zellen. Die Zellen wurden 24h mit Benzyl Alkohol inkubiert. Die Analyse erfolgte im Zellhomogenat mit Hilfe des Antikörpers C1/6.1. Die Bandenstärke wurde auf GAPDH als Ladungskontrolle normiert. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit ImageJ und PrismGraph Pad 4.0. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)

4.3.2.8. Cholesterinbestimmung

Um zu zeigen, dass Benzyl Alkohol keinen Einfluss auf den Cholesterinmetabolismus der Zellen nimmt, wurde nach der Behandlung die Menge an Gesamtcholesterin und freiem Cholesterin im Zellhomogenat bestimmt. Abbildung 52 zeigt, dass weder der Gesamtgehalt an Cholesterin, noch die Menge an freiem Cholesterin durch die Behandlung mit Benzyl Alkohol verändert wurde.

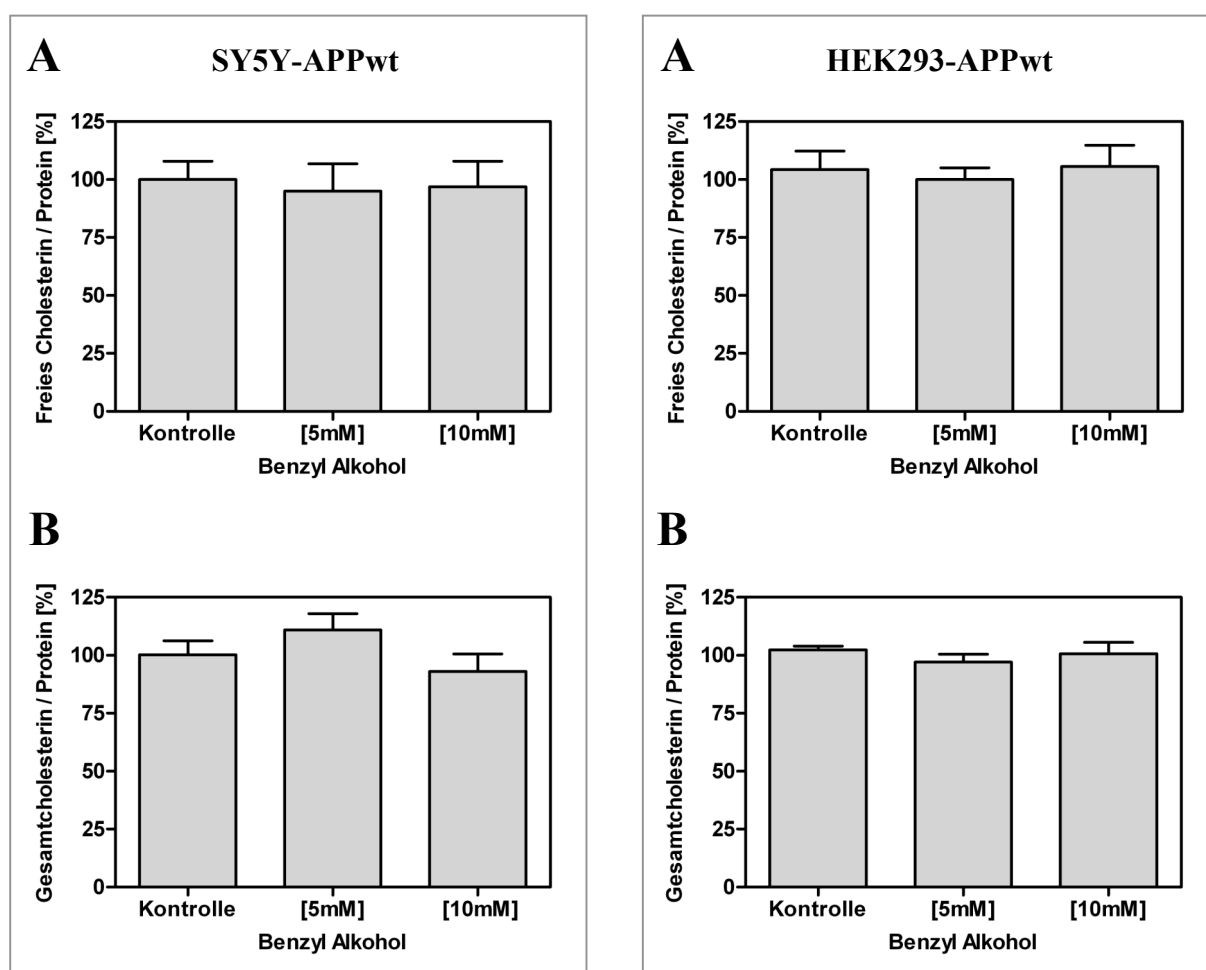


Abbildung 52 Einfluss von Benzyl Alkohol auf den Cholesteringehalt in SY5Y-APPwt (linke Seite) und HEK293-APPwt (rechte Seite) Zellen. Die Zellen wurden für 24h mit den angegebenen Konzentrationen an Benzyl Alkohol inkubiert. Untersucht wurde sowohl das freie, unveresterte Cholesterin (A), als auch das Gesamtcholesterin (B) im Zellhomogenat. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)

4.3.2.9. BACE-Aktivität

Die reduzierte amyloidogene Prozessierung könnte auf eine eingeschränkte Funktionalität der β -Sekretase hindeuten. Um dies zu überprüfen, wurde die Aktivität des isolierten Enzyms nach der Behandlung mit Benzyl Alkohol gemessen. Die detektierten Werte wurden auf den Proteingehalt der Probe normiert. Abbildung 53 zeigt, dass Benzyl Alkohol weder in SY5Y-APPwt (A), noch in HEK293-APPwt (B) Zellen die *in vitro* Aktivität des Enzyms beeinflusste, so dass die detektierte Abnahme an Abeta nicht auf einen Funktionalitätsverlust der β -Sekretase zurückzuführen ist.

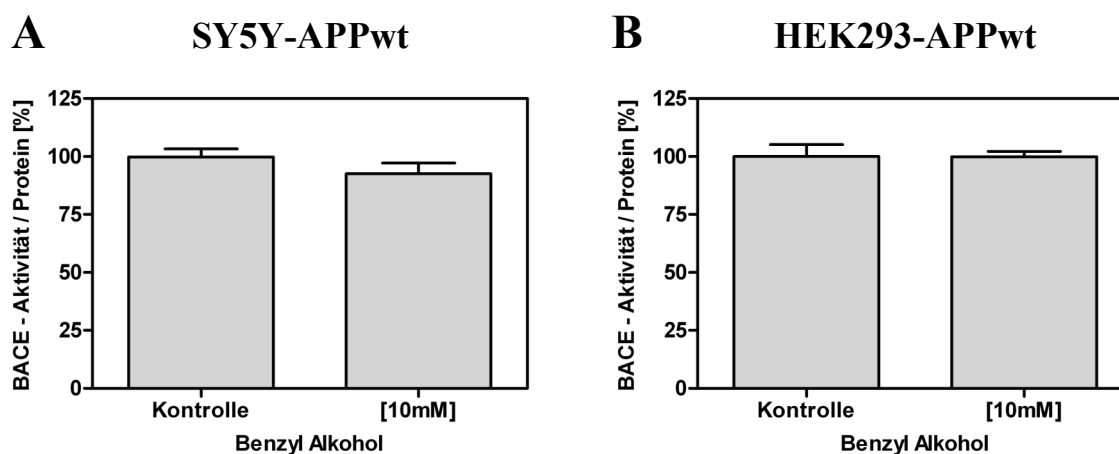
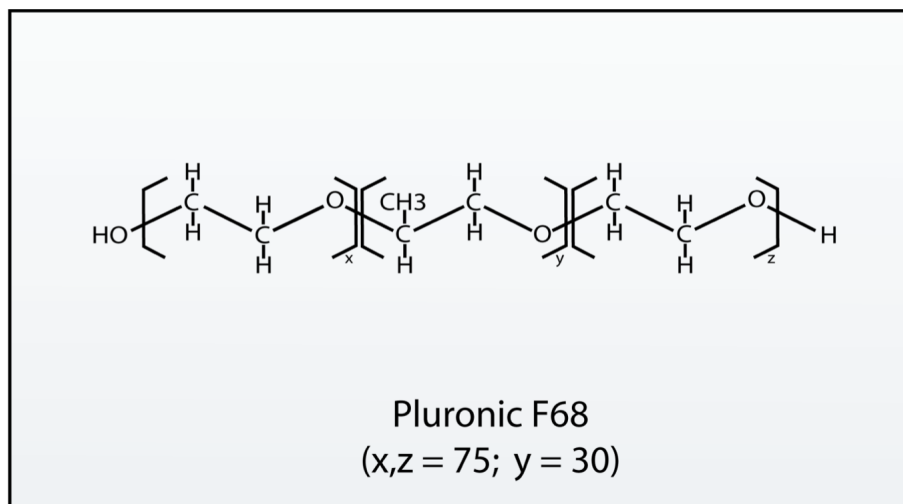


Abbildung 53 Einfluss von Benzyl Alkohol auf die *in vitro* Aktivität der β -Sekretase BACE in SY5Y-APPwt und HEK293-APPwt Zellen. Die membranständige β -Sekretase wurde aus den behandelten Zellen extrahiert und die Aktivität gegenüber einem zugegebenen Substrat bestimmt; A) SY5Y-APPwt Zellen; B) HEK293-APPwt Zellen. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelerperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)

4.3.3. Studien mit dem Membranrigidizer Pluronic F68

Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Statin-induzierte Reduktion der amyloidogene APP-Prozessierung nicht auf die Abnahme an Cholesterin, sondern vielmehr auf die damit verbundene Fluidisierung der Membran zurückzuführen ist. In den folgenden Experimenten wurde untersucht, ob dieser Zusammenhang auch invers bei einer Verringerung der Membranfluidität gegeben ist. Hierfür wurden die Membranen der Zellen cholesterin-unabhängig durch die Behandlung mit Pluronic F68 in einen Zustand verringerter Fluidität gebracht. Pluronic F68 ist eine polymere Substanz, die sich ähnlich dem Cholesterin in der Membran einlagert und zu einer erhöhten Ordnung der Fettsäureketten führt. Daraus resultiert eine Abnahme der Membranfluidität, ohne dass die Lipidzusammensetzung verändert wird.



4.3.3.1. Zell-Viabilität

Die Modulation der Membranfluidität stellt einen schweren Eingriff in die Physiologie der Zelle dar. Bei stark ausgeprägten Veränderungen sind daher Effekte auf die Integrität und damit auf die Zell-Viabilität der Zelle zu erwarten. Aus diesem Grund wurden zunächst mittels MTT- und ToxiLight-Assay Konzentrationen an Pluronic F68 ermittelt, die keine signifikanten zelltoxischen Effekte verursachen. Wie aus Abbildung 54 ersichtlich, konnten Konzentrationen bis $7,5\mu\text{M}$ eingesetzt werden, ohne dass es in SY5Y-APPwt (linke Seite) oder HEK293-APPwt (rechte Seite) Zellen zu detektierbaren Störungen der Zellintegrität kam.

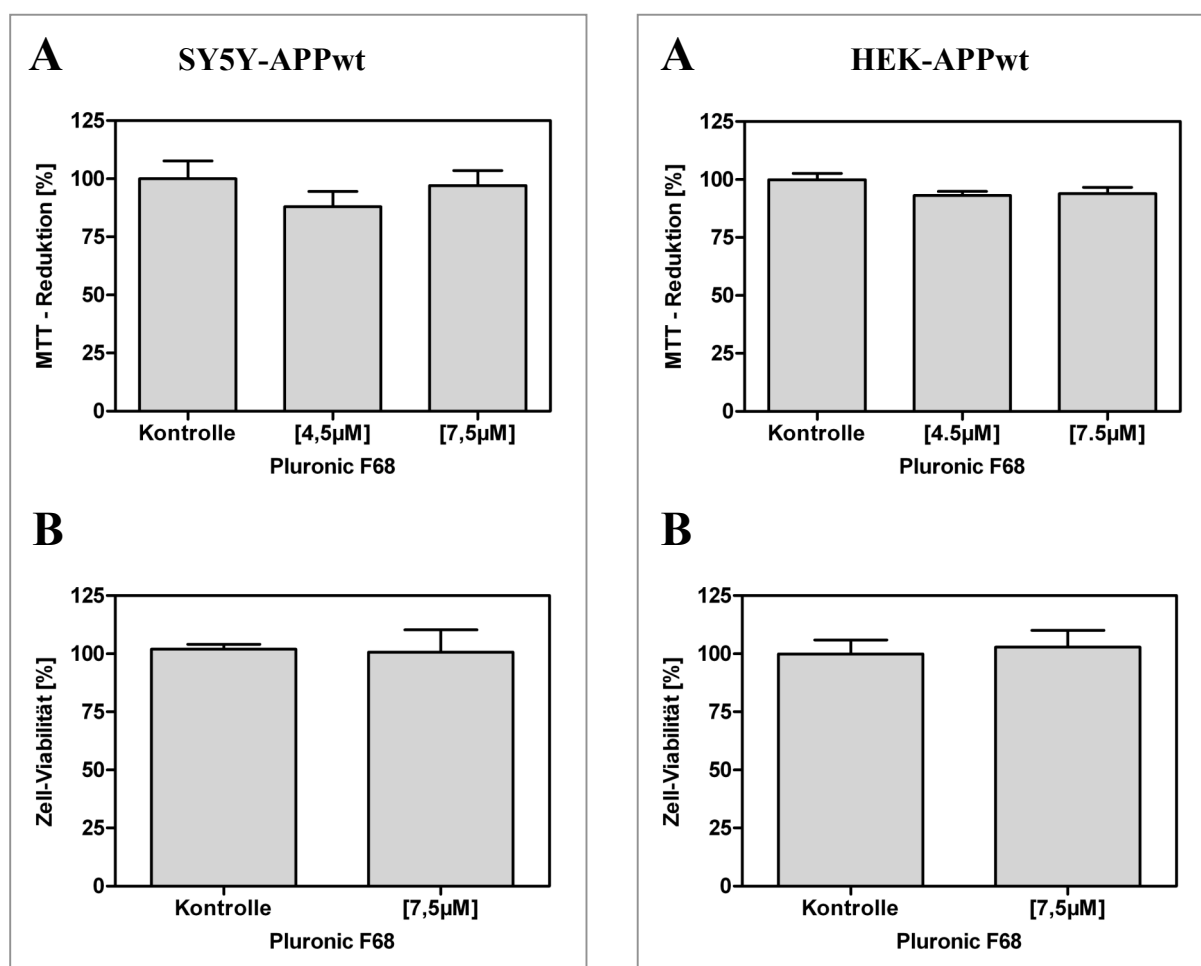


Abbildung 54 Einfluss von Pluronic F68 auf die Zell-Viabilität in SY5Y-APPwt (linke Seite) und HEK293-APPwt (rechte Seite) Zellen. Die Zellen wurden 24h lang mit den angegebenen Konzentrationen behandelt; A) MTT-Assay; B) ToxiLight-Assay. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)

4.3.3.2. Anisotropiemessungen an isolierten Membranen

Die rigidisierende Wirkung von Pluronic F68 wurde zunächst an isolierten Plasmamembranen untersucht. Hierfür wurden die Membranen von unbehandelten HEK293-APPwt Zellen isoliert und *in vitro* mit 7,5 μ M Pluronic F68 versetzt. Die Anisotropie der Membranen wurde analog zu den Benzyl Alkohol Experimenten mittels DPH und TMA-DPH ermittelt. Die TMA-DPH-Messungen zeigen, dass Pluronic F68 zu einem signifikanten Anstieg der Anisotropie führte, was bedeutet, dass die Fluidität der Membranen entsprechend gesenkt wurde (Abbildung 55A). Mit der Fluoreszenzsonde DPH wurde hingegen ein signifikanter Abfall der Anisotropie und somit eine Zunahme der Fluidität detektiert (Daten nicht gezeigt). Kontrollversuche ohne Zellen mit reinem Pluronic F68 und DPH zeigten, dass das Polymer mit dem Farbstoff interagiert und dadurch dessen Emission löscht (Abbildung 55B). Die Emission von TMA-DPH wurde nicht von Pluronic F68 beeinflusst.

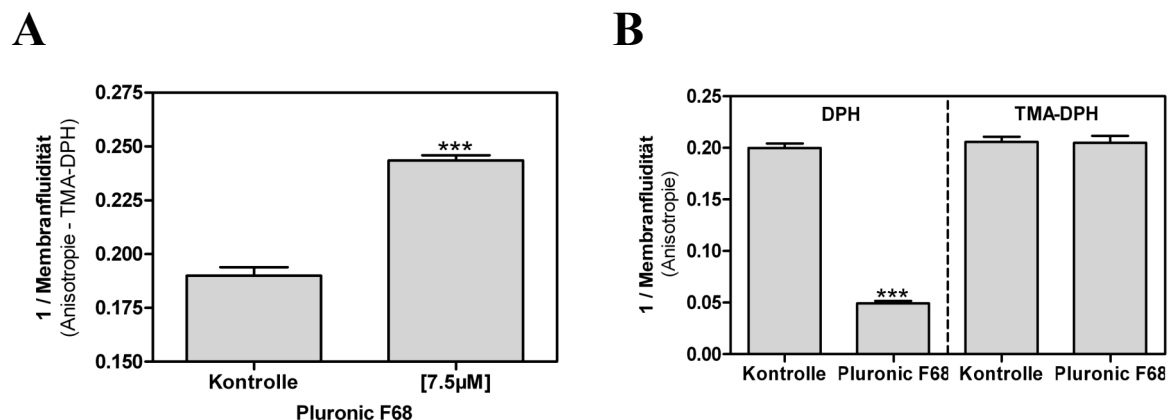


Abbildung 55 Einfluss von Pluronic F68 auf die Anisotropie von isolierten HEK293-APPwt Zellmembranen. Die isolierten Membranen wurden 20 Minuten mit Pluronic F68 inkubiert und die Anisotropie mittels Fluoreszenz Polarisationspektroskopie bestimmt. Mit der Fluoreszenzsonde DPH konnten keine aussagekräftigen Messungen gemacht werden, da die Emission des Farbstoffs durch Pluronic F68 gestört wurde; A) TMA-DPH; B) Kontrollversuche mit beiden Farbstoffen ohne Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelerperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)

4.3.3.3. Pyren-Fluoreszenzmessungen an isolierten Membranen

Analog zu den Benzyl Alkohol Experimenten wurde auch mit Pluronic F68 die Pyren-Fluoreszenz in den behandelten Membranen untersucht. Kontrollversuche bestätigten zuvor, dass Pluronic F68 zu keiner Störung der Pyren-Fluoreszenz führt. Sowohl die Annular- als auch die Bulk-Fluoreszenz zeigt, dass durch Pluronic F68 die Eximerbildung der Pyrenmoleküle fast vollständig verhindert wurde (Abbildung 56A und B), was auf eine stark verminderte laterale Diffusionsfreiheit innerhalb der behandelten Membranen hindeutet.

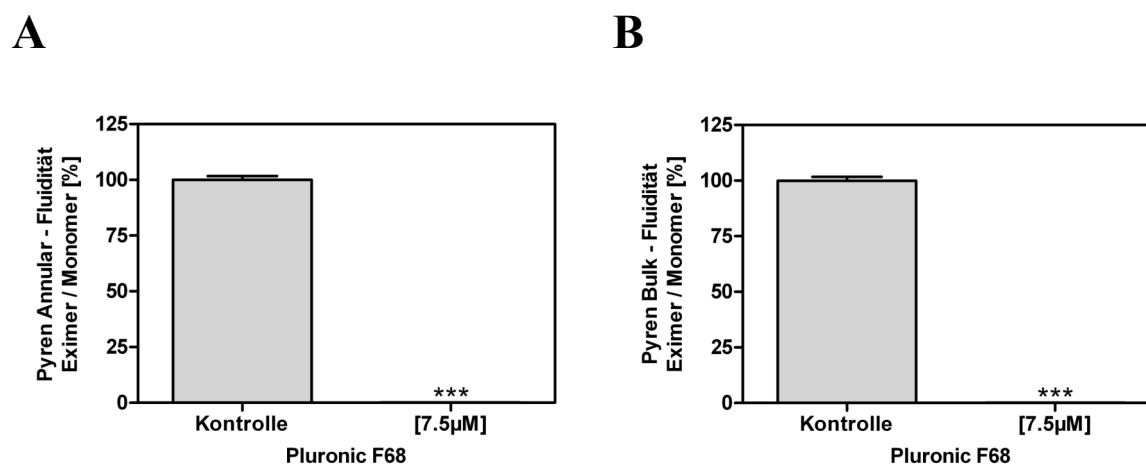


Abbildung 56 Einfluss von Pluronic F68 auf die Pyren-Fluoreszenz in isolierten HEK293-APPwt Zellmembranen. Die Membranen wurden für 20 Minuten mit 7,5μM Pluronic F68 inkubiert und anschließend mittels Fluoreszenz Polarisationspektroskopie die Annulare (A) und die Bulk (B) -Fluoreszenz von Pyren bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)

4.3.3.4. Anisotropiemessungen an intakten Zellen

Mit Hilfe der Fluoreszenzsonde TMA-DPH war es auch in intakten Zellen möglich, den rigidisierenden Einfluss von Pluronic F68 zu detektieren (Abbildung 57). Sowohl in SY5Y-APPwt (A) als auch in HEK293-APPwt (B) Zellen bewirkte die Behandlung mit Pluronic F68 eine signifikante und konzentrationsabhängige Zunahme der Anisotropie, was einer Abnahme der Membranfluidität entspricht.

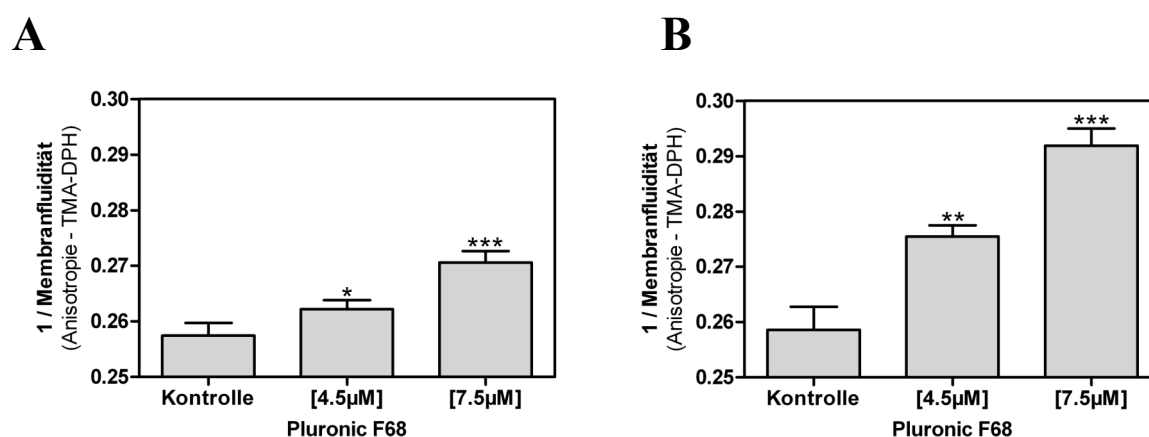


Abbildung 57 Einfluss von Pluronic F68 auf die Anisotropie der Plasmamembran von intakten SY5Y-APPwt (A) und HEK293-APPwt (B) Zellen. Die Zellen wurden 24h mit 7,5µM Pluronic F68 behandelt. Im Anschluss wurde die Anisotropie der Membranen mittels TMA-DPH als Fluoreszenz-Sonde bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 9 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)

4.3.3.5. Sekretion von Abeta

Um zu überprüfen, ob die detektierte Abnahme der Membranfluidität Einfluss auf die Sekretion von Abeta hat, wurde das Kulturmedium der behandelten Zellen mittels ELISA analysiert. In SY5Y-APPwt Zellen bewirkte die Behandlung mit Pluronic F68 eine signifikante und konzentrationsabhängige Zunahme an sezerniertem Abeta₍₁₋₄₀₎ (Abbildung 58A) Die Inkubation mit 7,5µM führte dabei zu einer fast 100%igen Steigerung der Sekretionsrate. In HEK293-APPwt Zellen wurde sowohl das Abeta 1-40er, als auch das Abeta 1-42er Fragment detektiert.

Die Menge beider Fragmente wurden durch Pluronic F68 signifikant erhöht, wobei die Zunahme an Abeta₍₁₋₄₂₎ stärker ausgeprägt war, als die von Abeta₍₁₋₄₀₎ (Abbildung 58B und C). Prozentual lag die Steigerung der Sekretionsrate des Abeta 1-40er Fragments in HEK293-APPwt Zellen etwas unter der von SY5Y-APPwt Zellen. Mit einer 150%igen Zunahme zeigte die Sekretion des Abeta 1-42er Fragments in HEK293-APPwt Zellen den größten Effekt nach der Inkubation mit Pluronic F68.

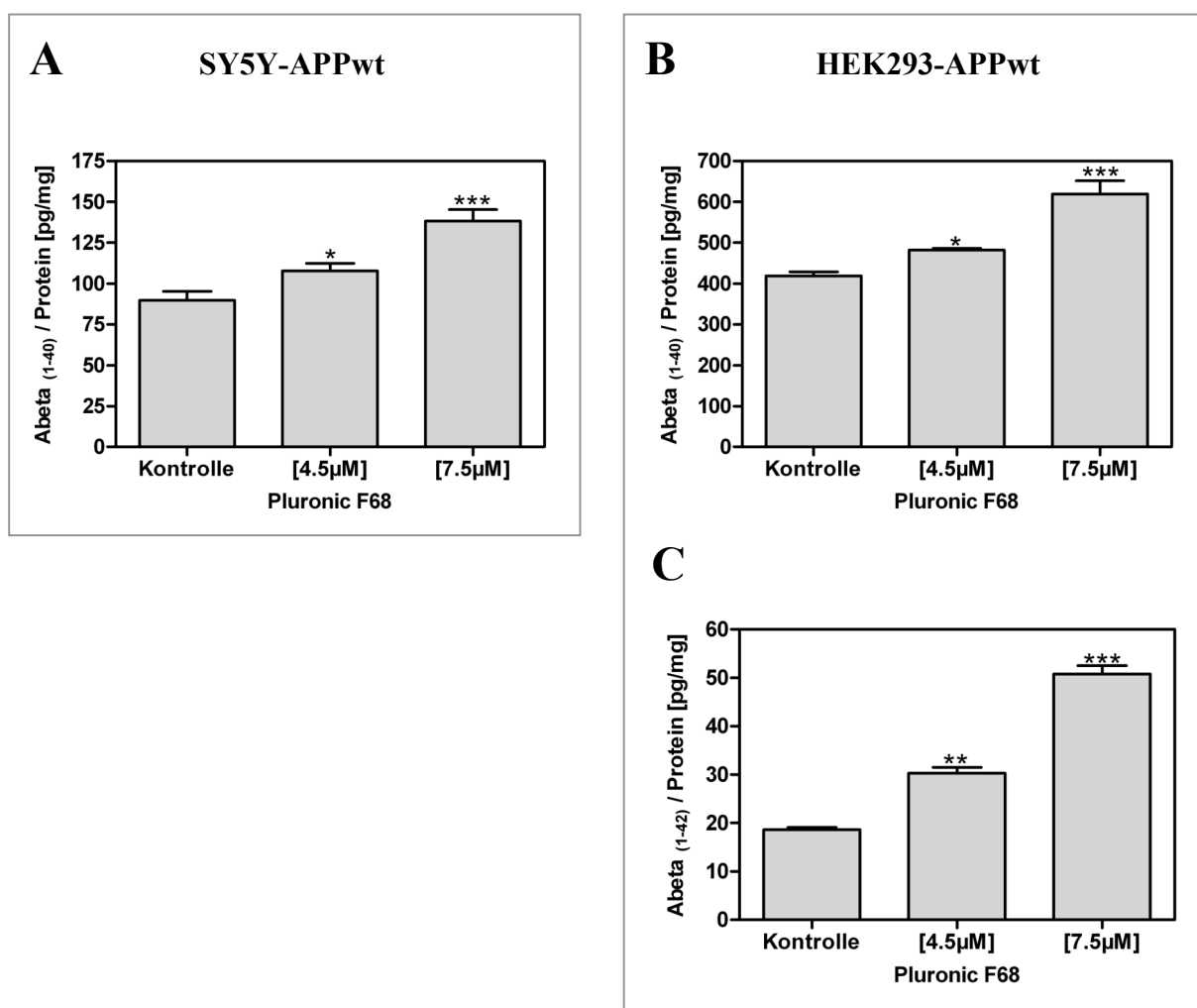


Abbildung 58 Einfluss von Pluronic F68 auf den Gehalt an sezerniertem Abeta in SY5Y-APPwt (A) und HEK293-APPwt (B und C) Zellen. Die Zellen wurden 24h mit 7,5µM Pluronic F68 behandelt. Im Anschluss wurde das Medium mittels ELISA analysiert. Im Kulturmedium der SY5Y-APPwt Zellen konnte kein Abeta₍₁₋₄₂₎ nachgewiesen werden. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von 9 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** p < 0,0001)

4.3.3.6. Korrelation

Die detektierte Zunahme der Abeta Sekretion wurde im Folgenden mit der Abnahme der Membranfluidität korreliert. Abbildung 59A zeigt die Korrelation des Abeta 1-40er Fragments in SY5Y-APPwt Zellen, Abbildung 59B und C die der Abeta 1-40er und Abeta 1-42er Fragmente in HEK293-APPwt Zellen. Dargestellt sind die Konzentrationen von 0; 4,5 und 7,5 μ M Pluronic F68.

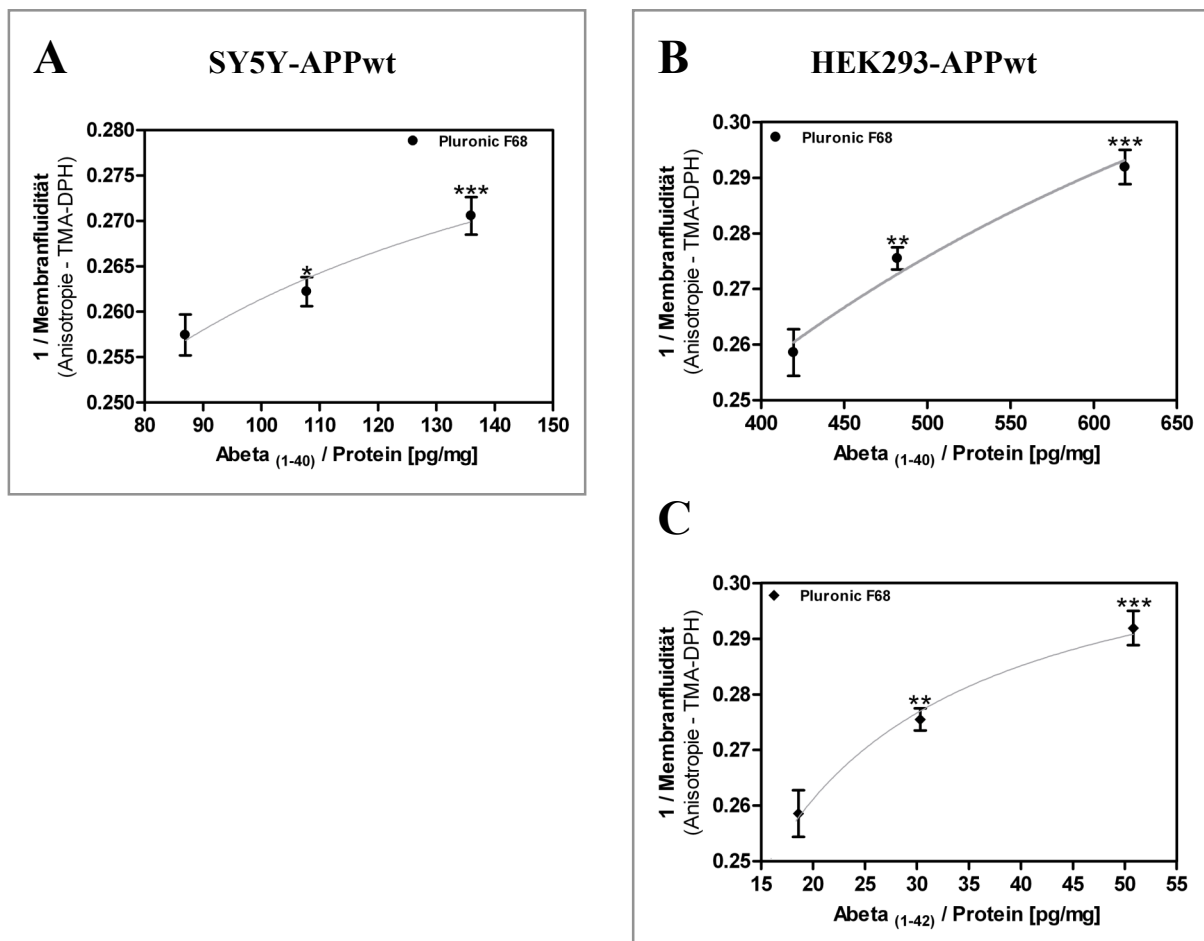


Abbildung 59 Korrelation von Membranfluidität und Abeta Produktion; A) SY5Y-APPwt Zellen; B und C) HEK293-APPwt Zellen. Dargestellt sind die eingesetzten Konzentrationen von 0; 4,5 und 7,5 μ M Pluronic F68.

4.3.3.7. Western Blot Analyse

Entsprechend den Lovastatin und Benzyl Alkohol Experimenten wurden auch in den Pluronic F68 behandelten Zellen die Mengen an APP, APP α und C99/C83 mittels Western Blot bestimmt. Abbildung 60 zeigt, dass Pluronic F68 in keinem der beiden Zellmodelle zu einem veränderten Gehalt an APP führte. Dieser Befund schließt aus, dass die detektierte Zunahme an Abeta auf ein verändertes Expressionsmuster von APP zurückzuführen ist.

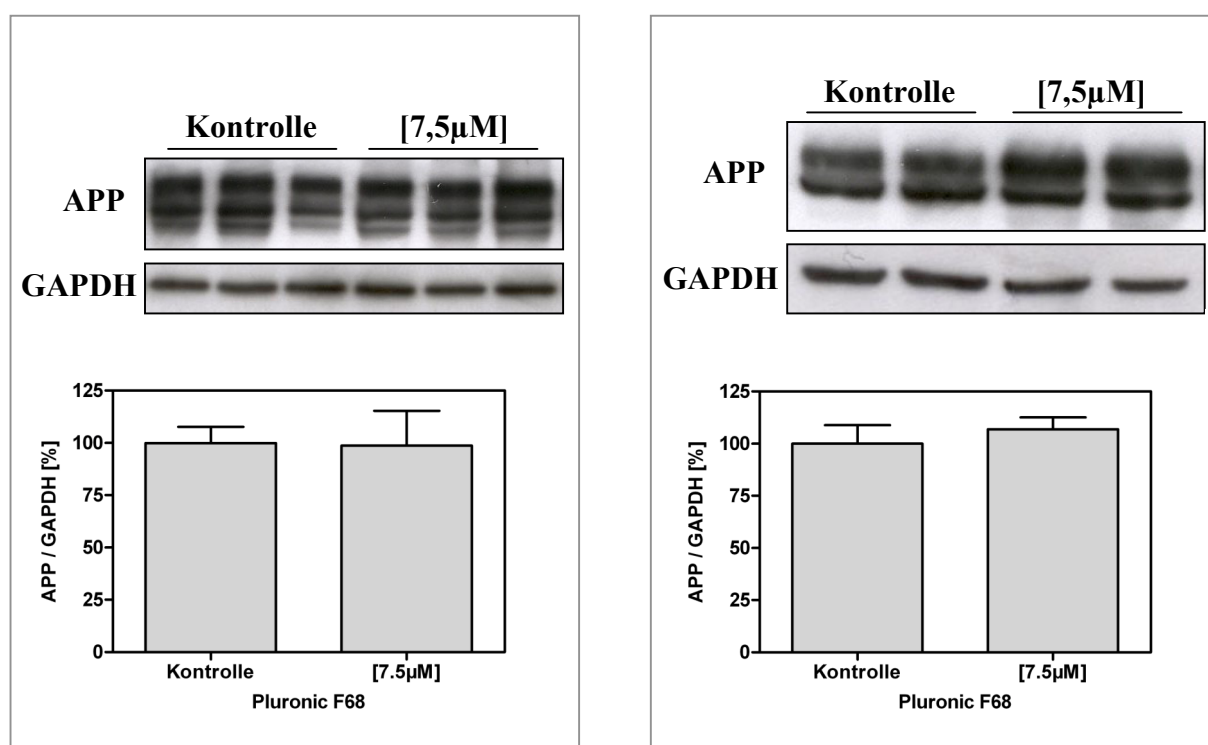


Abbildung 60 Einfluss von Pluronic F68 auf die APP Prozessierung in SY5Y-APPwt (linke Seite) und HEK293-APPwt (rechte Seite) Zellen. APP wurde nach 24stündiger Inkubation im Zellhomogenat mit Hilfe des Antikörpers C1/6.1 detektiert und auf GAPDH normiert. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit ImageJ und PrismGraph Pad 4.0. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 6-9 Einzelerperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)

Die Fragmente des Proteins hingegen weisen deutliche Unterschiede in behandelten und unbehandelten Zellen auf. Die Sekretion des α -Sekretase Fragments APPs α wurde durch Pluronic F68 signifikant gesenkt (Abbildung 61).

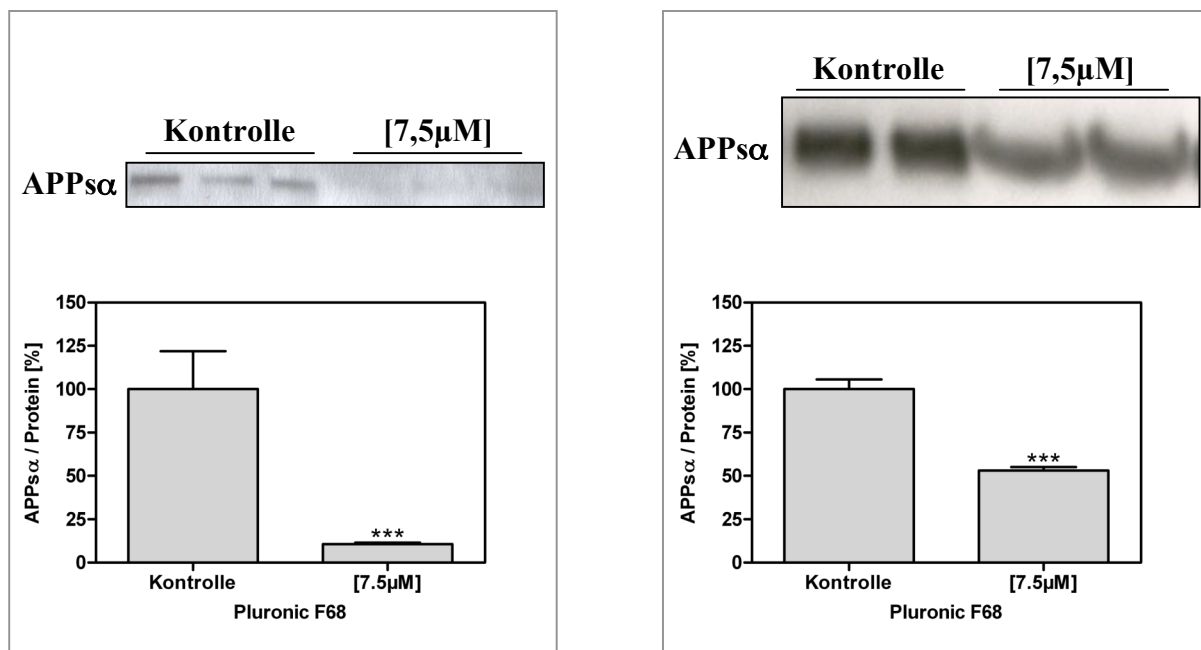


Abbildung 61 Einfluss von Pluronic F68 auf die Sekretion von APPs α in SY5Y-APPwt (linke Seite) und HEK293-APPwt (rechte Seite) Zellen. APPs α wurde nach 24stündiger Inkubation im Medium mit Hilfe des Antikörpers 6E10 detektiert und auf den Proteingehalt im Zellhomogenat normiert. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit ImageJ und PrismGraph Pad 4.0. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 6-9 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** p < 0,0001)

Der gleiche Effekt wurde für das korrespondierende membranständige Fragment C83 detektiert (Abbildung 62). Das C-terminale Fragment der β -Sekretase hingegen wurde durch die Behandlung mit Pluronic F68 in HEK293-APPwt Zellen signifikant erhöht (Abbildung 62), was in Übereinstimmung mit der detektierten Zunahme an Abeta steht. In SY5Y-APPwt Zellen konnte weder in den Kontrollzellen noch in den behandelten Zellen C99 detektiert werden. Zusammengefasst zeigt die Analyse der APP Fragmente, dass Pluronic F68 zu keiner veränderten APP Expression, wohl aber zu einer Verschiebung der Prozessierung zugunsten der β -Sekretase führte, die mit einer reduzierten α -Sekretase Prozessierung einherging.

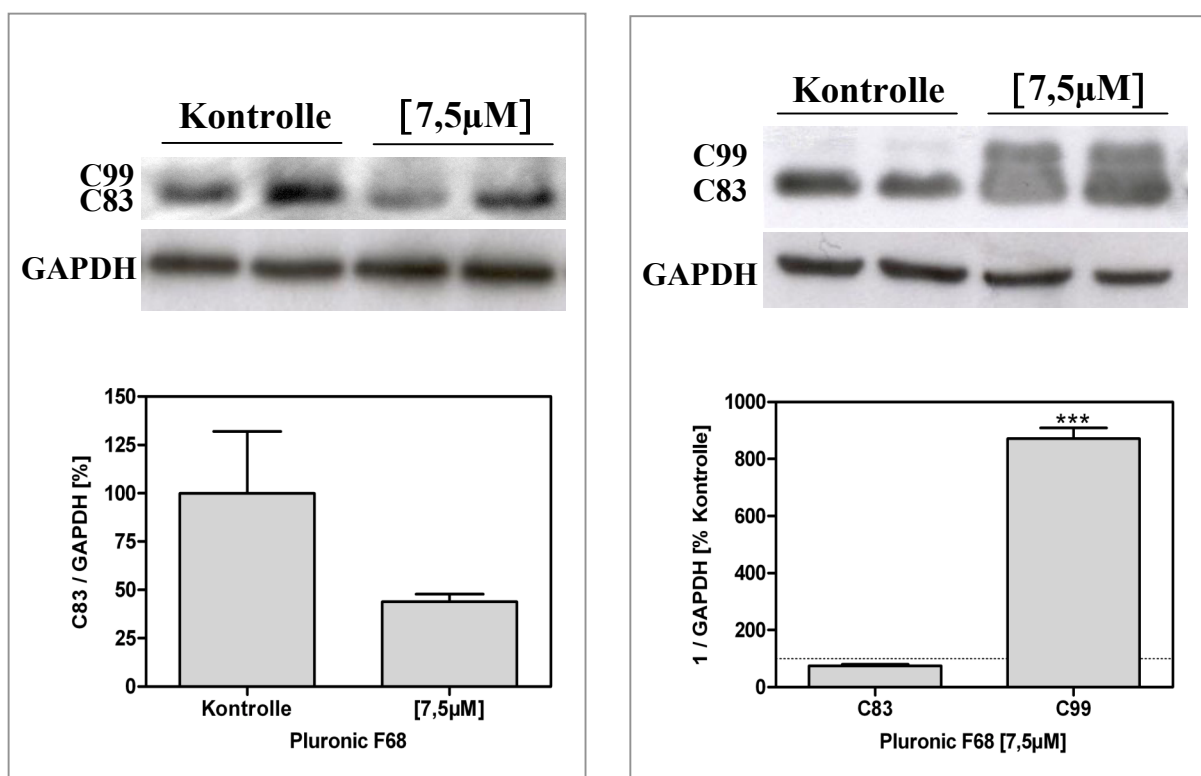


Abbildung 62 Einfluss von Pluronic F68 auf C99 und C83 in SY5Y-APPwt (linke Seite) und HEK293-APPwt (rechte Seite) Zellen. Die C-terminalen Fragmente wurden nach 24stündiger Inkubation im Zellhomogenat mit Hilfe des Antikörpers C1/6.1 detektiert und auf GAPDH normiert. In SY5Y-APPwt Zellen konnte kein C99 detektiert werden. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit ImageJ und PrismGraph Pad 4.0. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 6-9 Einzelerperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)

4.3.3.8. Cholesterinbestimmung

Um sicher zu stellen, dass die Abnahme der Membranfluidität durch Pluronic F68 unabhängig vom Cholesteringehalt der Zellen ist, wurde nach der Behandlung die Menge an Gesamtcholesterin und freiem Cholesterin im Zellhomogenat bestimmt. Abbildung 63A zeigt, dass weder in SY5Y-APPwt (linke Seite) noch in HEK293-APPwt (rechte Seite) eine veränderte Menge an freiem Cholesterin detektiert werden konnte. Das gleiche gilt für Gehalt an Gesamtcholesterin, was darauf hindeutet, dass auch die Menge an intrazellulärem veresterten Cholesterin durch die Behandlung mit Pluronic F68 unverändert blieb.

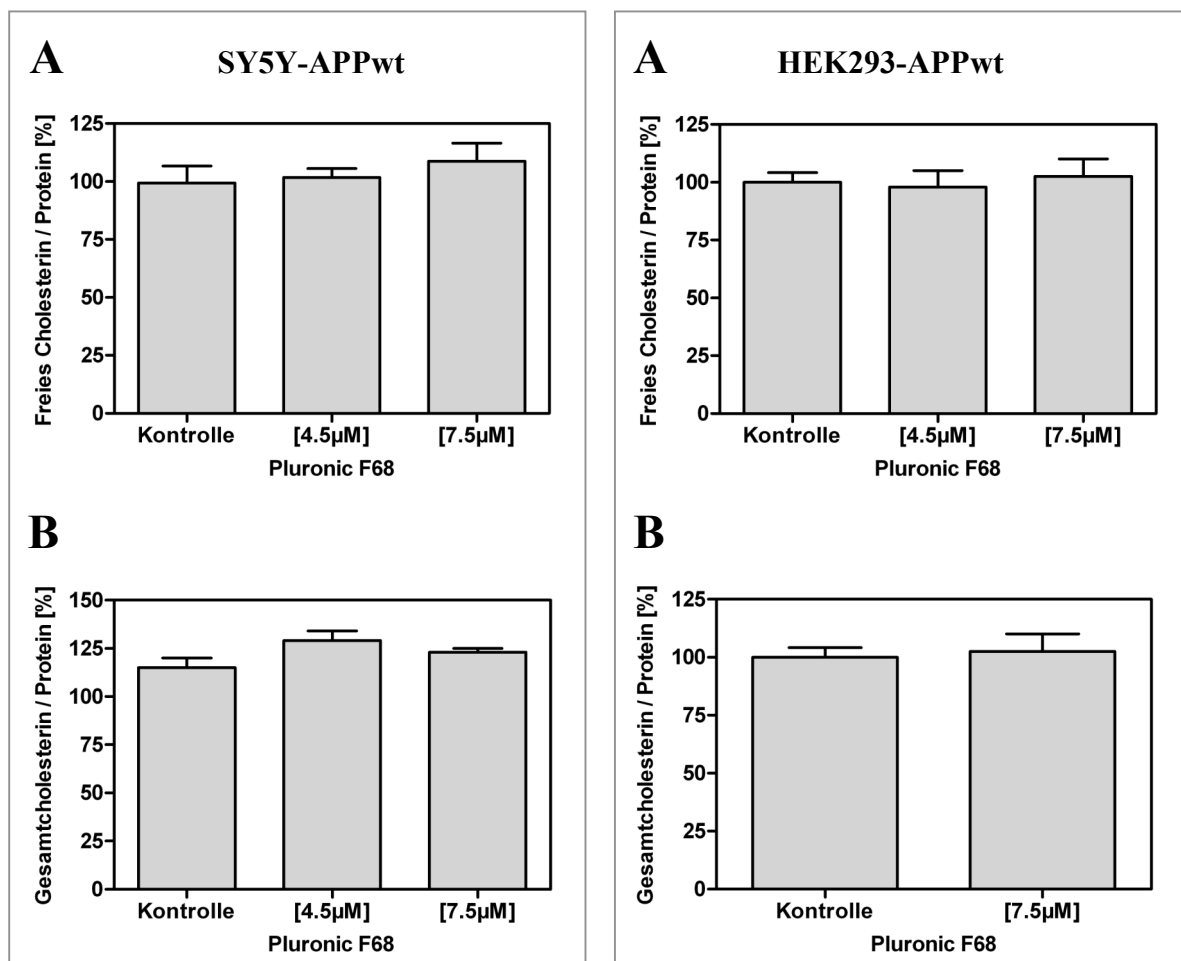


Abbildung 63 Einfluss von Pluronic F68 auf den Cholesteringehalt in SY5Y-APPwt (linke Seite) und HEK293-APPwt (rechte Seite) Zellen. Die Zellen wurden für 24h mit den angegebenen Konzentrationen an Pluronic F68 inkubiert. Untersucht wurde sowohl das freie, unveresterte Cholesterin (A), als auch das Gesamtcholesterin (B) im Homogenat. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)

4.3.3.9. BACE-Aktivität

Ein eventueller direkter Einfluss von Pluronic F68 auf die Funktionalität der β -Sekretase wurde mittels Aktivitätstest überprüft und ausgeschlossen (Abbildung 64). Weder in SY5Y-APPwt (A) noch in HEK293-APPwt (B) kam es nach der Behandlung mit Pluronic F68 zu einer Zunahme der *in vitro* Aktivität des Enzyms. Die detektierte Zunahme an sezerniertem Abeta ist somit nicht auf eine veränderte Funktionalität der β -Sekretase zurückzuführen.

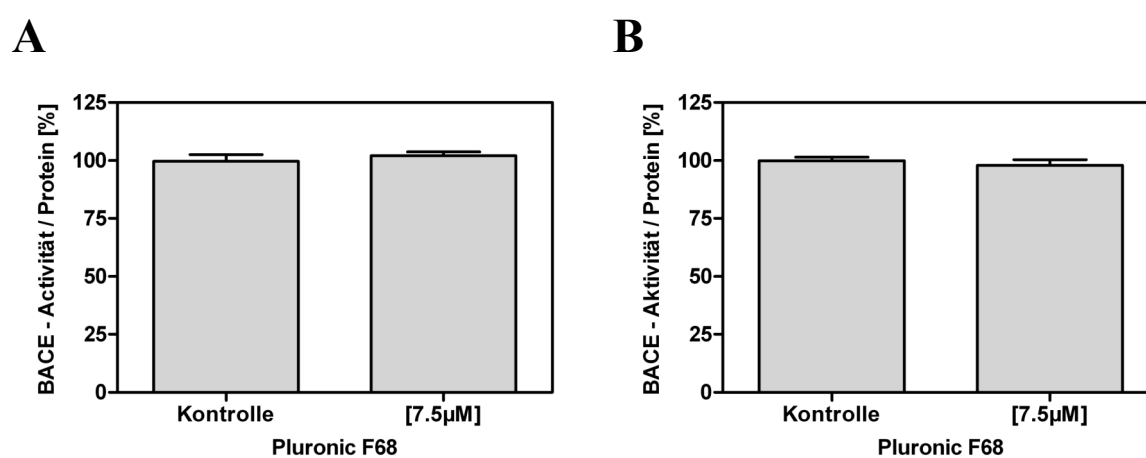


Abbildung 64 Einfluss von Pluronic F68 auf die *in vitro* Aktivität der β -Sekretase BACE in SY5Y-APPwt und HEK293-APPwt Zellen. Die membranständige β -Sekretase wurde aus den behandelten Zellen extrahiert und die Aktivität gegenüber einem zugegebenen Substrat bestimmt; A) SY5Y-APPwt Zellen; B) HEK293-APPwt Zellen. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)

4.3.3.10. Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass die Modulation der Membranfluidität starken Einfluss auf die Prozessierung von APP nimmt, ohne dass die Modulatoren direkt mit der Aktivität der β -Sekretase interagieren. Lovastatin und Benzyl Alkohol bewirkten eine Zunahme der Fluidität, was mit einer verminderten amyloidogenen Prozessierung einherging. Die Behandlung mit Pluronic F68 führte zur Abnahme der Membranfluidität, was mit einer signifikanten Steigerung der Abeta-Sekretion verbunden war (Abbildung 65).

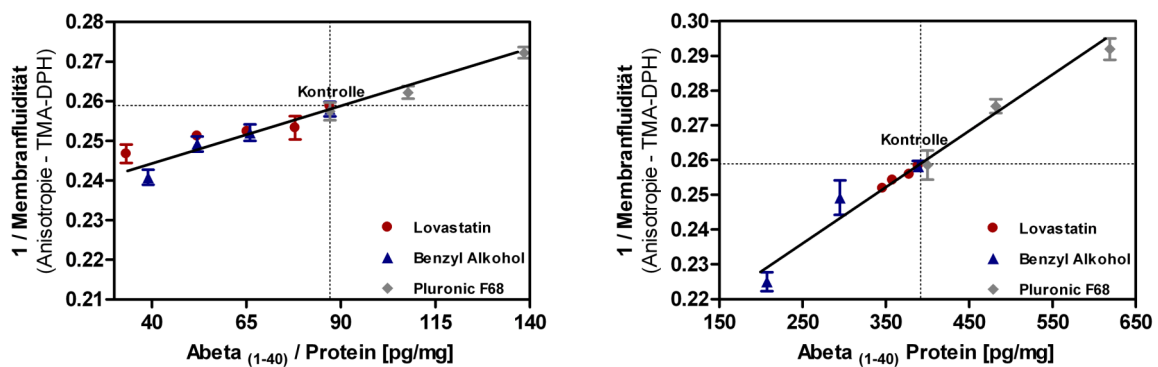


Abbildung 65 Zusammenfassende Darstellung der Effekte von Lovastatin, Benzyl Alkohol und Pluronic F68 auf die Membranfluidität und die Abeta₍₁₋₄₀₎-Sekretion in SY5Y-APPwt (linke Seite) und HEK293-APPwt (rechte Seite) Zellen.

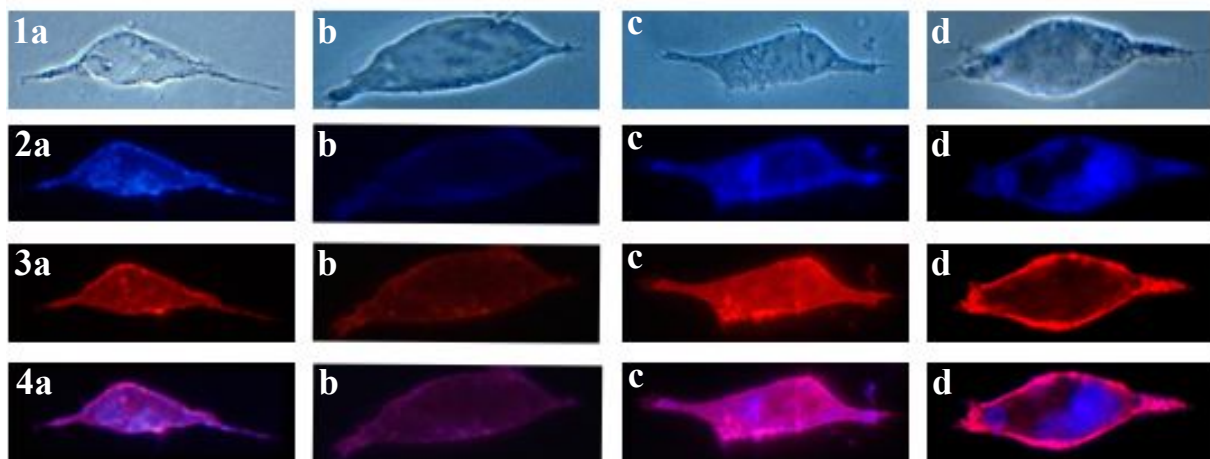
4.4. Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Lipid Raft Integrität

Keiner der eingesetzten Modulatoren zeigte *in vitro* eine direkte Interaktion mit der β -Sekretase oder eine veränderte APP-Expression. Trotzdem konnten nach der Behandlung jeweils Veränderungen in der APP-Prozessierung beobachtet werden. Eine mögliche mechanistische Erklärung ist eine veränderte Enzym-Substrat Zugänglichkeit. Etliche Befunde deuten auf eine Lipid Raft-assoziierte amyloidogene Prozessierung hin (Ehehalt et al., 2003), während die α -Sekretase sowie deren Aktivität außerhalb von Raft Strukturen detektiert werden konnte (Kojro et al., 2001). Ob die Behandlung mit den beschriebenen Modulatoren zu visuell detektierbaren Veränderungen innerhalb dieser Strukturen führt, wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

Hierfür wurden in den behandelten Zellen das membranäre Cholesterin und das Gangliosid GM-1 als Lipid Raft-Marker angefärbt (Abbildung 66). Die Färbungen wurden sowohl in SY5Y-APPwt (A), als auch in HEK293-APPwt (B) Zellen durchgeführt, wobei in beiden Zellmodellen die gleichen Effekte beobachtet wurden. Übereinstimmend mit der durchgeführten Cholesterinbestimmung resultiert die Behandlung mit Lovastatin in einer deutlich schwächer ausgeprägten Cholesterinfärbung gegenüber den Kontrollzellen (Abbildung 66, 2b). Da Cholesterin ein elementarer Bestandteil der Lipid Rafts ist, geht die Statin-induzierte Reduktion mit einer starken Abschwächung der GM-1 Färbung einher (Abbildung 66, 3b).

Benzyl Alkohol und Pluronic F68 zeigen analog zur enzymatischen Cholesterinbestimmung auch in der visuellen Kontrolle keinen Effekt auf die Menge an Cholesterin (Abbildung 66, 2c und d). Die Färbung zeigt jedoch, dass es durch Benzyl Alkohol zu einer veränderten Verteilung des Cholesterins kommt. In den Kontrollzellen markiert das gefärbte Cholesterin vor allem die Membran der Zelle. Zusätzlich zeigen sich definierte Bereiche, die auf die Dreidimensionalität der Zelle zurückzuführen sind. Nach der Behandlung mit Benzyl Alkohol ergibt sich eine diffuse und flächige Färbung, so dass die Membran der Zelle nicht mehr als scharfe Grenze zu erkennen ist. Die GM-1 Färbung zeigt, dass auch die Integrität der Lipid Rafts durch die Behandlung mit Benzyl Alkohol gestört wird. Es kommt zu einer schwammigen Verteilung der Raft-Strukturen, so dass keine inselartigen Kondensationspunkte von GM-1 mehr zu erkennen sind (Abbildung 66, 3c).

Das gegenteilige Bild ergibt sich nach der Behandlung mit Pluronic F68. Sowohl Cholesterin, vor allem aber GM-1 liegt kondensiert vor, so dass die Membran als scharf abgegrenzte Linie zu erkennen ist (Abbildung 66, 3d). Die Überlagerung beider Färbungen zeigt das hohe Maß an Kolo-kalisation von Cholesterin und GM-1 (Abbildung 66, 4a-d), was auf eine verstärkte Assemblierung der Lipid Rafts im Vergleich zu Kontrollzellen hinweist.

A

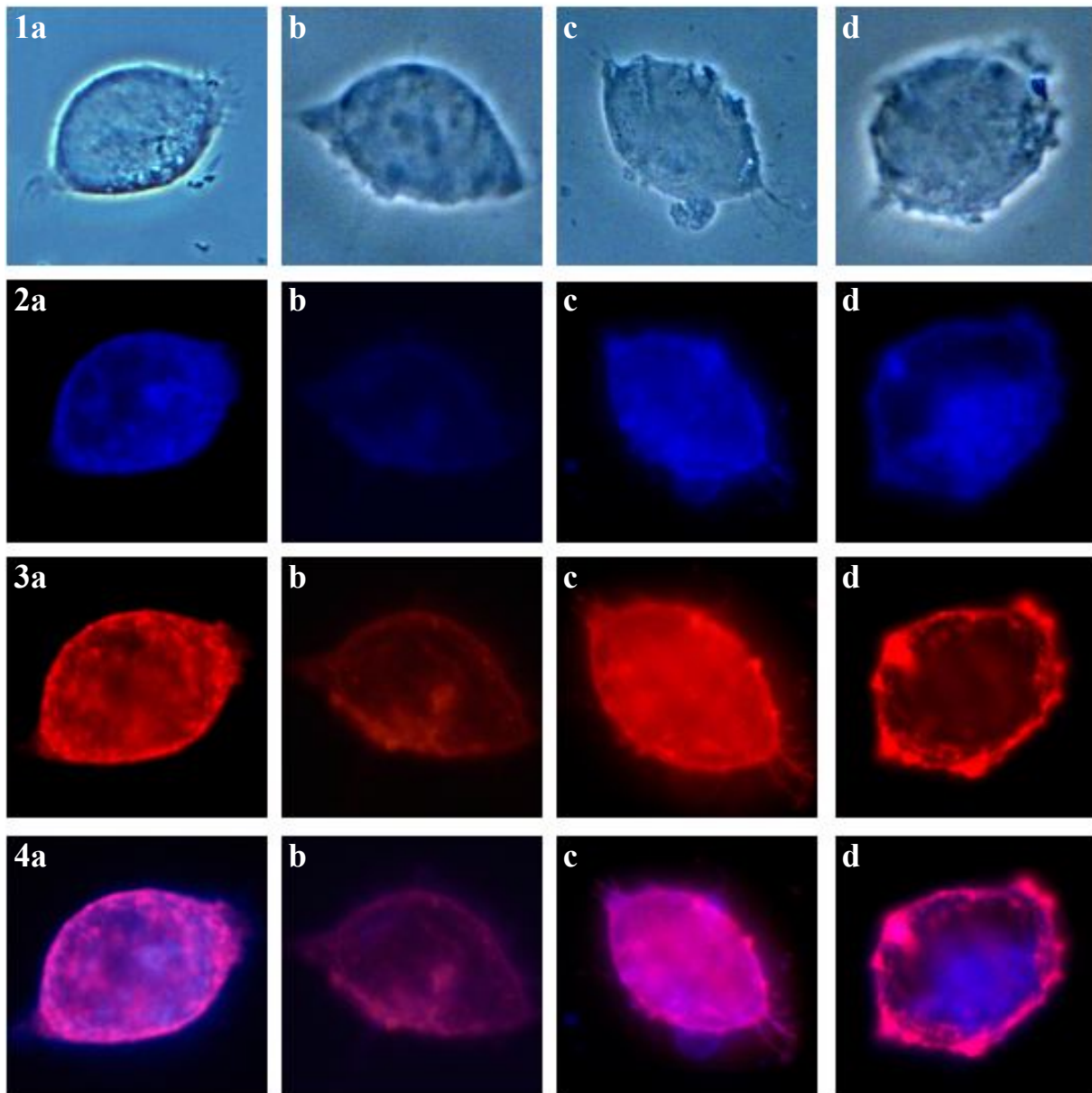
B

Abbildung 66 Fluoreszenzmikroskopische Detektion von Cholesterin und GM-1 in SY5Y-APPwt (A) und HEK293-APPwt (B) Zellen nach der Behandlung mit Lovastatin (Spalte b), Benzyl Alkohol (Spalte c) und Pluronic F68 (Spalte d). Spalte a zeigt jeweils eine unbehandelte Kontrollzelle. Dargestellt ist die Durchsicht der Zelle (Zeile 1a-d), die Cholesterinfärbung mit Filipin (Reihe 2a-d), die GM-1 Färbung mittels Alexa 555-gekoppeltem Choleratoxin (Reihe 3a-d) und die Übereinanderlagerung von Cholesterin- und GM-1 Färbung (Reihe 4a-d).

4.5. Einfluss von Abeta auf Membraneigenschaften und APP-Prozessierung

Die Zytotoxizität von Abeta wird vornehmlich durch die Einlagerung des Peptids in die Membran verursacht, was zu funktionellen Störungen innerhalb der membranären Prozesse und schließlich zur Degeneration der Zelle führt. Wie bereits gezeigt werden konnte, lagert sich aggregiertes Abeta an isolierten Plasmamembranen an, was einen Verlust an Fluidität zur Folge hat. Dieser Befund wirft die Frage auf, ob Abeta durch die Interaktion mit der Membran und die daraus resultierende Abnahme der Membranfluidität ebenfalls zu einer erhöhten amyloidogenen Prozessierung führt und somit einen Teufelskreislauf initiiert, in dem es die eigene Produktion stimuliert. Zur experimentellen Beantwortung dieser Frage wurden HEK293-APPwt Zellen mit fibrillärem bzw. oligomerem Abeta inkubiert und die resultierende APP-Prozessierung analysiert.

4.5.1. Fibrilläres Abeta₍₁₋₄₂₎

Das 1-42er Abeta-Fragment weist eine höhere Toxizität auf als das kürzere 1-40er Fragment, da es bereits in sehr niedrigen Konzentrationen zu fibrillären Strukturen aggregiert. Aus diesem Grund wurden die Zellen zunächst mit fibrillärem Abeta₍₁₋₄₂₎ inkubiert. Alle Abeta-Experimente wurden in HEK293-APPwt Zellen über 24 Stunden und unter Standardbedingungen durchgeführt. Die Kontrollzellen wurden mit der gleichen Menge an reinem Puffer ohne Abeta inkubiert.

4.5.1.1. Zell-Viabilität

Die Inkubation mit Abeta lässt einen Verlust an Zell-Viabilität erwarten. Zunächst wurden Konzentrationen von 1 und 2µM hinsichtlich ihrer Zytotoxizität getestet. Nach 24 Stunden zeigten die Zellen zwar keine sichtbaren Schädigungen und keinen Adhäsionsverlust, jedoch kam es zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Zell-Viabilität, die bei der Behandlung mit 2µM, nicht aber mit 1µM einen signifikanten Effekt im MTT-Assay aufwies (Abbildung 67A). Der ToxiLight-Assay zeigte bereits bei 1µM einen signifikanten Anstieg an Zytotoxizität (Abbildung 67B).

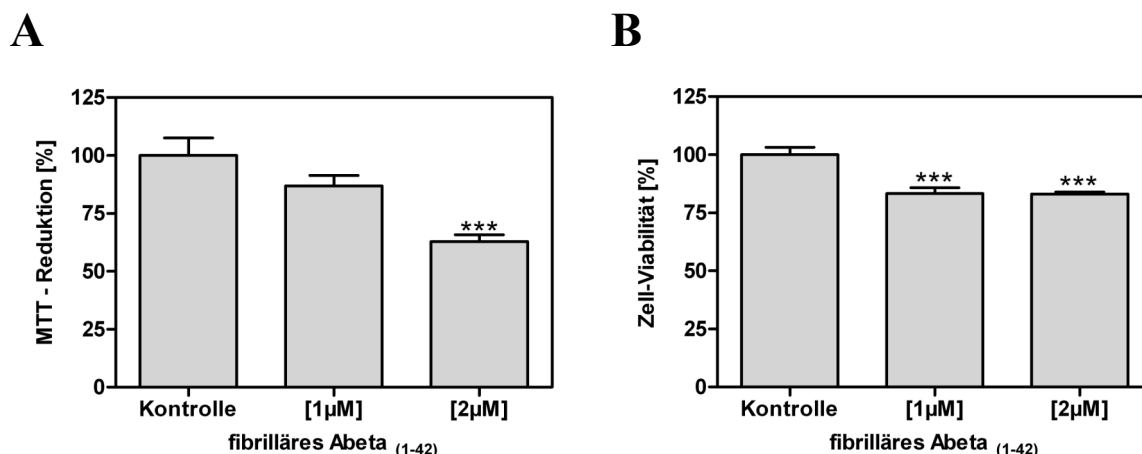


Abbildung 67 Einfluss von fibrillärem Abeta₍₁₋₄₂₎ auf die Zell-Viabilität in HEK293-APPwt Zellen. Die Zellen wurden 24h lang mit den angegebenen Konzentrationen behandelt; A) MTT-Assay; B) ToxiLight-Assay. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)

4.5.1.2. Anisotropiemessungen an intakten Zellen

Nach 24stündiger Behandlung wurde die Membranfluidität in den Zellen mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes TMA-DPH untersucht. Bei einer Konzentration von 1µM konnte kein Effekt auf die Anisotropie beobachtet werden. Die Behandlung mit 2µM hingegen führte zu einer signifikanten Zunahme der Anisotropie, was einer Abnahme der Membranfluidität entspricht (Abbildung 68).

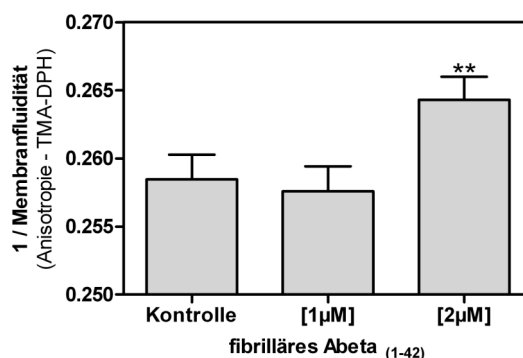


Abbildung 68 Einfluss von fibrillärem Abeta₍₁₋₄₂₎ auf die Anisotropie der Plasmamembran von intakten HEK293-APPwt Zellen. Die Zellen wurden 24h mit den angegebenen Konzentrationen von fibrillärem Abeta₍₁₋₄₂₎ behandelt. Im Anschluss wurde die Anisotropie der Membranen mittels TMA-DPH als Fluoreszenz-Sonde bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 3 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)

4.5.1.3. Sekretion von Abeta

Um Veränderungen der Abeta-Sekretion nach der Behandlung mit extern zugegebenem Abeta₍₁₋₄₂₎ zu detektieren, wurde das Kulturmedium der behandelten Zellen mittels ELISA auf den Gehalt an sezerniertem Abeta₍₁₋₄₀₎ analysiert. Die verwendeten Antikörper sollten eigentlich selektiv das Abeta 1-40er Fragment detektieren, so dass das zugegebene Abeta₍₁₋₄₂₎ zu keinem Signal führen sollte. Abbildung 69 zeigt jedoch, dass die Negativ-Kontrolle aus reinem Abeta₍₁₋₄₂₎ von dem Detektionsantikörper des Kits erkannt wird, so dass die beobachtete Zunahme in den behandelten Proben keinen Aussagewert besitzt.

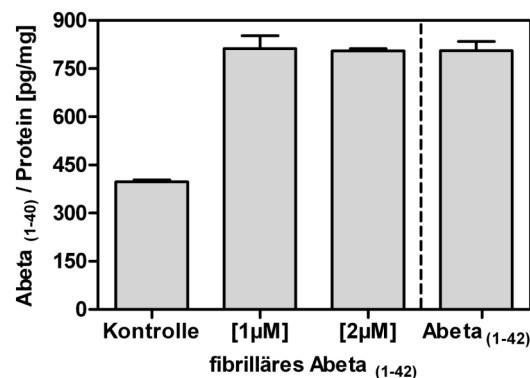


Abbildung 69 Einfluss von fibrillärem Abeta₍₁₋₄₂₎ auf den Gehalt an sezerniertem Abeta in HEK293-APPwt Zellen. Die Zellen wurden 24h mit den angegebenen Konzentrationen an fibrillärem Abeta₍₁₋₄₂₎ behandelt; im Anschluss wurde das Medium mittels ELISA analysiert. Wie die Kontrolle an reinem fibrillärem Abeta₍₁₋₄₂₎ zeigt, wurde das 1-42er Fragment von dem 1-40er-ELISA detektiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 3 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)

4.5.2. Fibrilläres Abeta₍₁₋₄₀₎

Aus den vorangegangenen ELISA-Analysen ist ersichtlich, dass sezerniertes Abeta₍₁₋₄₀₎ nicht von dem Abeta 1-42er ELISA detektiert werden kann. Aus diesem Grund wurde im nächsten Schritt eine Inkubation mit fibrillärem Abeta₍₁₋₄₀₎ vorgenommen, um anschließend Änderungen in der Sekretion des Abeta 1-42er Fragments detektieren zu können.

4.5.2.1. Zell-Viabilität

Da Abeta₍₁₋₄₂₎ erst ab einer Konzentration von 2µM einen Effekt auf die Membranfluidität zeigte, wurde das 1-40er Fragment zunächst auch nur in dieser Konzentration eingesetzt. Die resultierende MTT-Reduktionsrate entspricht in der prozentualen Abnahme dem Effekt des Abeta₍₁₋₄₂₎, jedoch mit einer geringeren Signifikanz (Abbildung 70). Im ToxiLight-Assay zeigt das 1-40er Fragment eine etwas niedrigere Toxizität als das 1-42er Fragment (Abbildung 70B). Zusammengenommen scheint fibrilläres Abeta₍₁₋₄₂₎ eine größere Zellschädigung zu verursachen als fibrilläres Abeta₍₁₋₄₀₎.

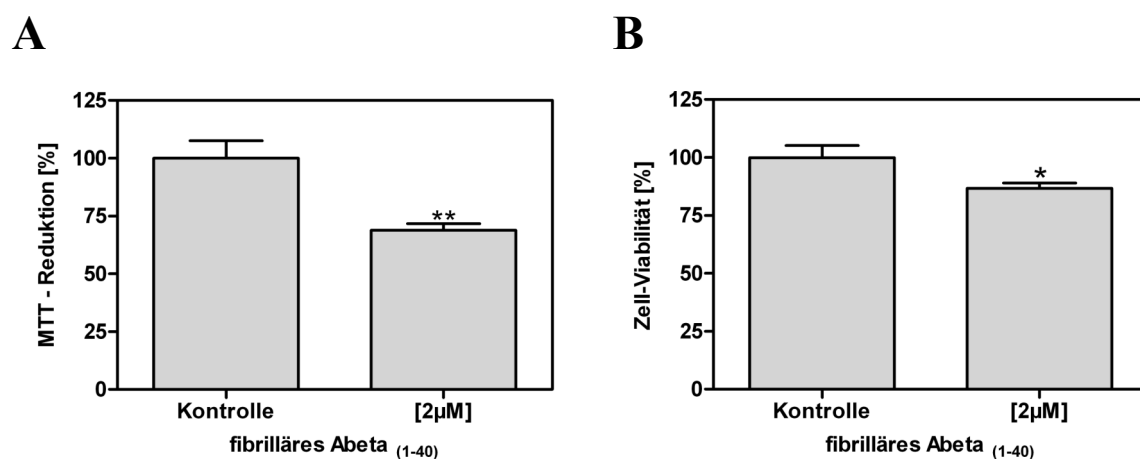


Abbildung 70 Einfluss von fibrillärem Abeta₍₁₋₄₀₎ auf die Zell-Viabilität in HEK293-APPwt Zellen. Die Zellen wurden 24h lang unter Standardbedingungen mit den angegebenen Konzentrationen inkubiert; A) MTT-Assay; B) ToxiLight-Assay. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte ± SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** p < 0,0001)

4.5.2.2. Anisotropiemessungen an intakten Zellen

Analog zu den vorangegangenen Experimenten wurde die Anisotropie der inkubierten Zellen mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes TMA-DPH ermittelt. Die Behandlung mit fibrillärem Abeta₍₁₋₄₀₎ führte in HEK293-APPwt Zellen zu einer signifikanten Zunahme der Anisotropie (Abbildung 71). Im Verhältnis ist der Effekt jedoch weniger stark ausgeprägt als bei fibrillärem Abeta₍₁₋₄₂₎.

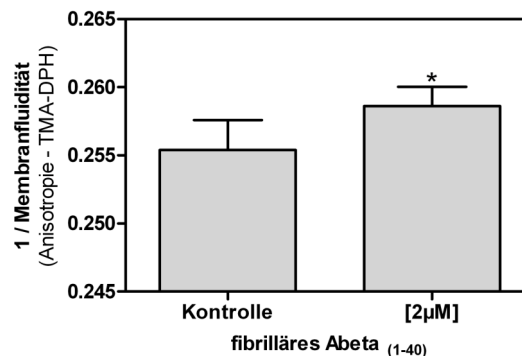


Abbildung 71 Einfluss von fibrillärem Abeta₍₁₋₄₀₎ auf die Anisotropie der Plasmamembran von intakten HEK293-APPwt Zellen. Die Zellen wurden 24h mit 2µM fibrillärem Abeta₍₁₋₄₀₎ behandelt. Im Anschluss wurde die Anisotropie der Membranen mittels TMA-DPH als Fluoreszenz-Sonde bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von 9 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** p < 0,0001)

4.5.2.3. Analyse der Abeta-Produktion

Zunächst wurde das Kulturmedium der behandelten Zellen mittels ELISA auf die Sekretion von Abeta₍₁₋₄₂₎ analysiert. Abbildung 72A zeigt, dass im Medium der behandelten Zellen kein Signal zu detektieren war. Als Kontrolle wurde reines fibrilläres Abeta₍₁₋₄₀₎ untersucht. Auch diese Probe zeigte nur ein Signal im Grundrauschen. Da das Abeta in einem ammoniakhaltigen Puffer gelöst wurde, musste zusätzlich eine Mediumsprobe mit der entsprechenden Menge an reinem Puffer ohne Abeta versetzt und analysiert werden. Hierfür wurde das Medium der Kontrollzellen verwendet. Abbildung 72A zeigt, dass nach der Zugabe des Puffers kein Signal mehr zu detektieren war, was darauf hindeutet, dass der Puffer in den Mediumsproben den ELISA stört.

Um dennoch eine Aussage über die Abeta-Produktion treffen zu können, wurden die behandelten Zellen wie im Methodenteil unter 3.7. beschrieben aufgearbeitet und die Menge an endogenem Abeta₍₁₋₄₂₎ bestimmt. Da durch die Aufarbeitung die störenden Bestandteile des Puffers beseitigt wurden, konnte das endogene Abeta₍₁₋₄₂₎ auch in den behandelten Zellen detektiert werden. Abbildung 72B zeigt, dass die Behandlung mit fibrillärem Abeta₍₁₋₄₀₎ zu einer signifikanten Zunahme an endogenem Abeta₍₁₋₄₂₎ führt. Dieser Befund deutet darauf hin, dass die Zugabe von Abeta zu einer erhöhten amyloidogenen APP-Prozessierung führt und somit die eigene Produktion begünstigt.

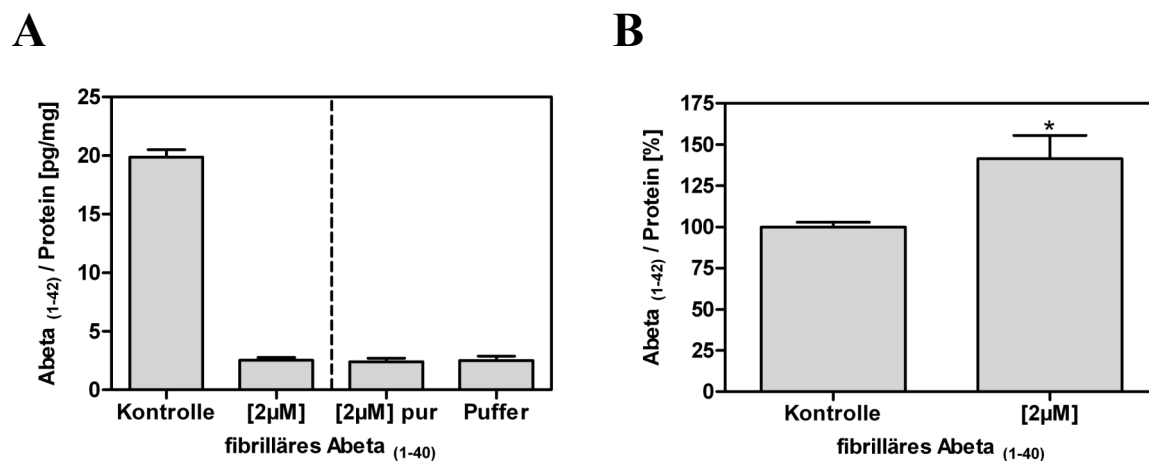


Abbildung 72 Einfluss von fibrillärem Abeta₍₁₋₄₀₎ auf den Gehalt an sezerniertem Abeta₍₁₋₄₂₎ (A) und endogenem Abeta₍₁₋₄₂₎ (B) in HEK293-APPwt Zellen. Die Zellen wurden 24h mit 2µM fibrillärem Abeta₍₁₋₄₀₎ behandelt; im Anschluss wurde das Medium mittels ELISA analysiert. Wie die Kontrollen an reinem fibrillärem Abeta₍₁₋₄₀₎ und dem Puffer, in dem das Abeta gelöst wurde zeigen, stört bereits die geringe Konzentration an Puffer im Medium den ELISA, so dass kein Signal detektiert werden konnte. Endogenes Abeta₍₁₋₄₂₎ konnte nach der Aufarbeitung der Zellen detektiert werden. Das reine 1-40er Fragment zeigte im 1-42er ELISA kein Signal. Dargestellt sind die (prozentualen) Mittelwerte ± SEM von 3-6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** p < 0,0001)

4.5.3. Oligomeres A β ₍₁₋₄₀₎

Laufende Studien deuten darauf hin, dass oligomere, statt fibrilläre Abeta-Strukturen maßgeblich für die Pathogenese der Alzheimer Demenz verantwortlich sind (Haass und Selkoe, 2007). In den folgenden Experimenten wurde daher untersucht, welchen Einfluss oligomeres Abeta auf die Membranfluidität und die APP-Prozessierung hat. Die Oligomerisierung wurde durch Zugabe von HFIIP als Lösungsmittel induziert. Um Effekte durch Interaktionen mit HFIIP auszuschließen, wurde bei allen Experimenten eine entsprechende Kontrolle ohne Abeta eingesetzt.

4.5.3.1. Zell-Viabilität

Abbildung 73A zeigt die Abnahme der MTT-Reduktionsrate nach der Behandlung mit oligomerem Abeta₍₁₋₄₀₎. Der Vergleich mit fibrillärem Abeta₍₁₋₄₀₎ und Abeta₍₁₋₄₂₎ zeigt, dass die oligomeren Strukturen bei einer Konzentration von 2 μ M die größte prozentuale Abnahme der MTT-Reduktion hervorrufen. Die niedrigste Konzentration von 1 μ M zeigte sowohl bei fibrillärem Abeta₍₁₋₄₂₎ als auch bei oligomerem Abeta₍₁₋₄₀₎ eine tendenzielle, nicht aber signifikante Abnahme der Reduktionsrate.

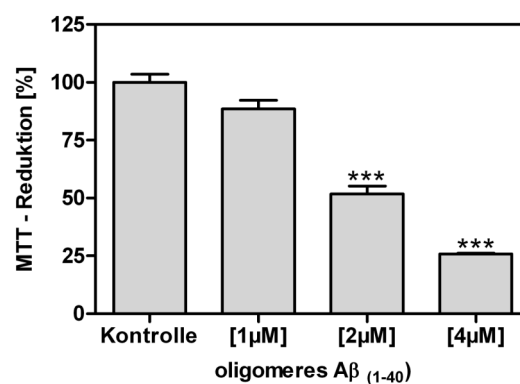


Abbildung 73 Einfluss von oligomerem Abeta₍₁₋₄₀₎ auf die MTT-Reduktionsrate in HEK293-APPwt Zellen. Die Zellen wurden 24h lang mit den angegebenen Konzentrationen Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)

4.5.3.2. Anisotropiemessungen an intakten Zellen

Abbildung 74 zeigt das Ergebnis der Anisotropiemessung an der Membran von intakten Zellen nach der Behandlung mit oligomerem $A\beta_{(1-40)}$. Die Zellen wurden mit einer Konzentrationsreihe von 1 bis $4\mu\text{M}$ inkubiert. Die höchste Konzentration führte zu einem starken Adhäsionsverlust, so dass mit den Zellen keine Messung mehr durchgeführt werden konnte. Bei geringeren Konzentrationen konnten keine sichtbaren Schädigungen an den Zellen festgestellt werden. Anisotropiemessung mit TMA-DPH zeigen, dass die Behandlung mit oligomerem $A\beta_{(1-40)}$ zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der Anisotropie und damit zu einer Reduktion der Membranfluidität führt. Verglichen mit fibrillärem $A\beta_{(1-40)}$ und $A\beta_{(1-42)}$ zeigt oligomeres $A\beta_{(1-40)}$ einen stärkeren Effekt auf die Membranfluidität, wobei bereits bei einer Konzentration von $1\mu\text{M}$ ein signifikanter Anstieg der Anisotropie zu beobachten ist.

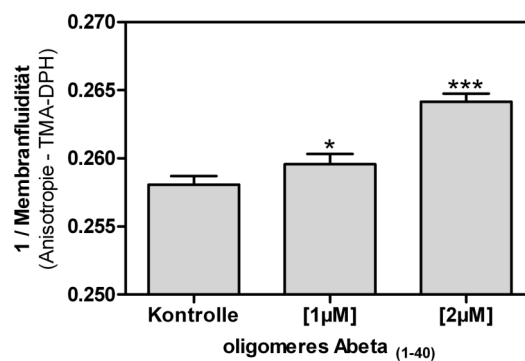


Abbildung 74 Einfluss von oligomerem $A\beta_{(1-40)}$ auf die Anisotropie der Plasmamembran von intakten HEK293-APPwt Zellen. Die Zellen wurden 24h mit den angegebenen Konzentrationen von oligomerem $A\beta_{(1-40)}$ behandelt. Im Anschluss wurde die Anisotropie der Membranen mittels TMA-DPH als Fluoreszenz-Sonde bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 9 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)

4.5.3.3. Analyse der Abeta-Produktion

Nach 24stündiger Inkubation wurden die Zellen für die Detektion von endogenem Abeta aufgearbeitet. Abbildung 75 zeigt, dass oligomeres Abeta₍₁₋₄₀₎ zu einer signifikanten und konzentrationsabhängigen Zunahme an endogenem Abeta₍₁₋₄₂₎ führte. Der Vergleich mit der detektierten Zunahme nach der Behandlung mit fibrillärem Abeta₍₁₋₄₀₎ zeigt, dass die oligomere Form einen wesentlich stärkeren Effekt ausübte, als die fibrilläre Form (siehe Abbildung 67). Bei einer Konzentration von 2µM bewirkte fibrilläres Abeta eine Zunahme von ungefähr 50%, während die oligomere Form zu einem fast 150%igen Anstieg an endogenem Abeta₍₁₋₄₂₎ führte.

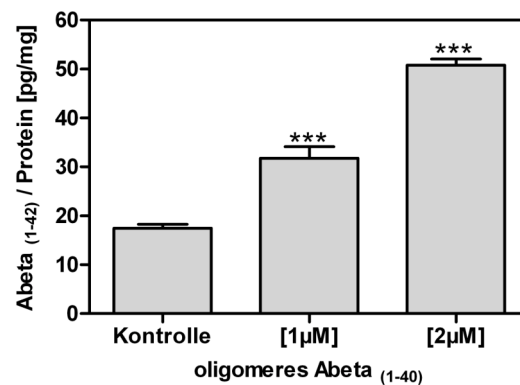


Abbildung 75 Einfluss von oligomerem Abeta₍₁₋₄₀₎ auf den Gehalt an endogenem Abeta in HEK293-APPwt Zellen. Die Zellen wurden 24h mit den angegebenen Konzentrationen an oligomerem Abeta₍₁₋₄₀₎ behandelt; im Anschluss wurden die Zellen mittels ELISA analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von 9 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** p < 0,0001)

4.5.3.4. Korrelation

Die detektierte Zunahme an Abeta wurde mit den entsprechenden Anisotropiewerten korreliert. Abbildung 76 zeigt die Korrelation mit mit endogenem Abeta₍₁₋₄₂₎.

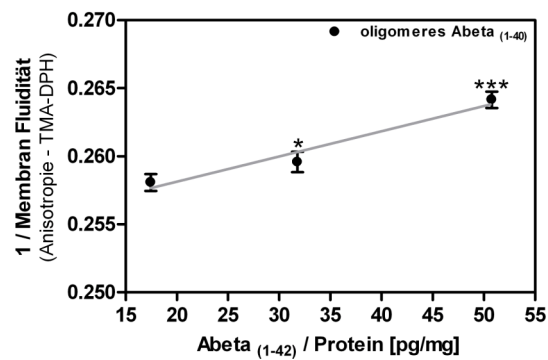


Abbildung 76 Korrelation von Membranfluidität und Abeta-Produktion in HEK293-APPwt Zellen nach der Behandlung mit oligomerem Abeta₍₁₋₄₀₎. Dargestellt sind die eingesetzten Konzentrationen von 0; 1 und 2 μ M.

4.5.3.5. Western Blot Analyse

Die bisherigen Ergebnisse deuten aufgrund der erhöhten Spiegel an endogenem $\text{Abeta}_{(1-42)}$ darauf hin, dass oligomeres $\text{Abeta}_{(1-40)}$ zu einer verstärkten amyloidogenen APP-Prozessierung durch die β -Sekretase führt. Um diesen Befund zu bestärken, wurden wiederum die C-terminalen Fragmente von APP in den behandelten Zellen analysiert. Zusätzlich wurde die Gesamtmenge an APP überprüft, um zu zeigen, dass die detektierte Zunahme an Abeta nicht auf eine verstärkte Expression von APP zurückzuführen ist. Beide Analysen wurden mit einer Konzentration von $1\mu\text{M}$ durchgeführt, um zytotoxische Effekte ausschließen zu können. Abbildung 77A zeigt, dass keine Zunahme an APP nach der Behandlung mit oligomerem $\text{Abeta}_{(1-40)}$ beobachtet werden konnte. Das oligomerisierte Abeta in den behandelten Proben führte dazu, dass Doppelbanden nicht mehr sauber aufgetrennt wurden.

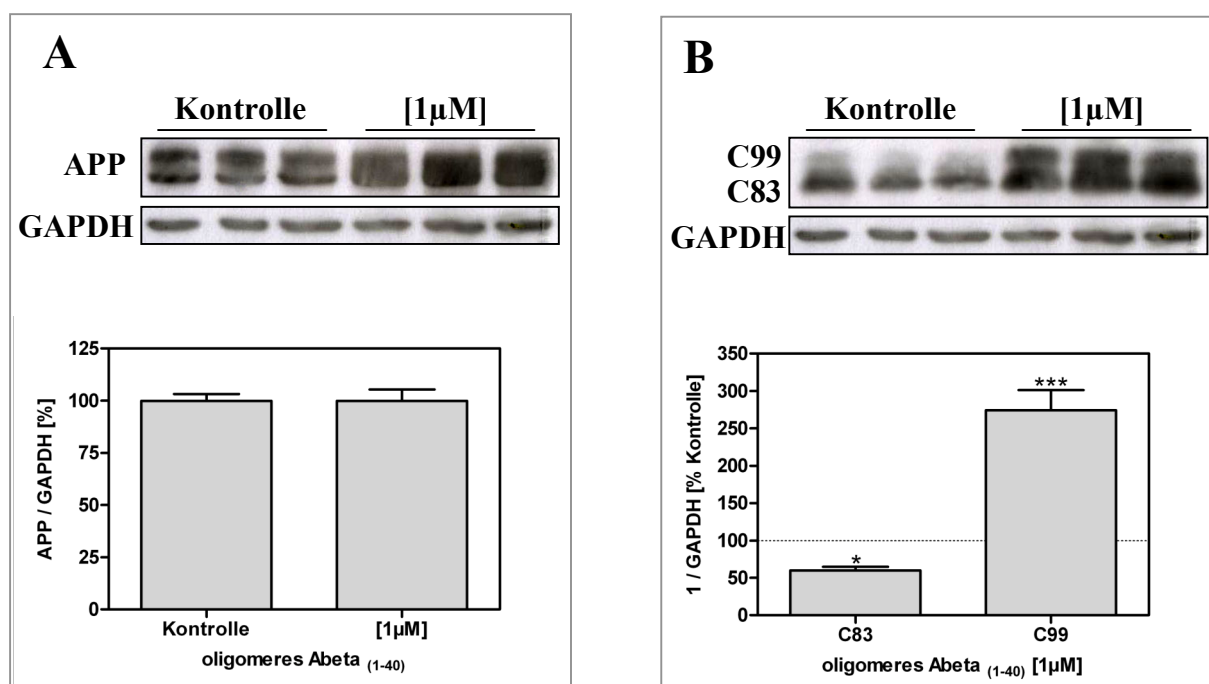


Abbildung 77 Einfluss von oligomerem $\text{Abeta}_{(1-40)}$ auf die APP Prozessierung in HEK293-APPwt Zellen. A) APP; B) C83/C99. APP, C83 und C99 wurden im Zellhomogenat mit Hilfe des Antikörpers C1/6.1 detektiert und auf GAPDH normiert. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit ImageJ und PrismGraph Pad 4.0. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 6-9 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)

Die Bandenintensitäten wurden auf die Ladungskontrolle GAPDH normiert. Gleiches gilt für die Analyse der C-terminalen Fragmente. Übereinstimmend mit der detektierten Zunahme an Abeta konnte in den behandelten Zellen eine signifikant erhöhte Menge an C99 beobachtet werden. Während die Bande in den Kontrollzellen aufgrund der kurzen Belichtungszeit kaum zu erkennen ist, zeigt sich in den behandelten Proben ein deutliches Signal (Abbildung 77B). Die Banden des C-terminalen Fragments der α -Sekretase, C83, wirken zunächst ebenfalls stärker als in den Kontrollen. Die Normierung auf GAPDH als Ladungskontrolle und die statistische Auswertung zeigten jedoch eher eine Abnahme von C83 in den behandelten Proben.

Um genaueren Aufschluss über die Prozessierung der α -Sekretase zu bekommen, wurde zusätzlich das Kulturmedium auf den Gehalt an APPs α untersucht. Es konnte jedoch keine veränderte Sekretion detektiert werden (Abbildung 78). Die Bandenstärke wurde zur Normierung auf den Gehalt an zellulärem Protein bezogen.

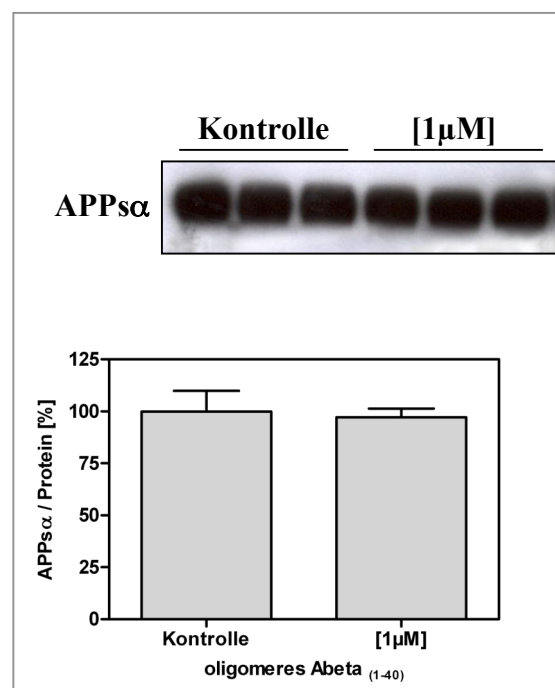


Abbildung 78 Einfluss von oligomerem Abeta₍₁₋₄₀₎ auf die Sekretion von APPs α in HEK293-APPwt Zellen. APPs α wurde nach 24stündiger Inkubation im Medium mit Hilfe des Antikörpers 6E10 detektiert und auf den Proteingehalt im Zellhomogenat normiert. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit ImageJ und PrismGraph Pad 4.0. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 6-9 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** p < 0,0001)

4.5.3.6. Cholesterinbestimmung

Nach der 24stündigen Behandlung mit oligomerem Abeta₍₁₋₄₀₎ wurde auch der Gehalt an Gesamt- und freiem Cholesterin untersucht. Es konnten keine Veränderungen im Cholesterinhaushalt der behandelten Zellen detektiert werden (Abbildung 79).

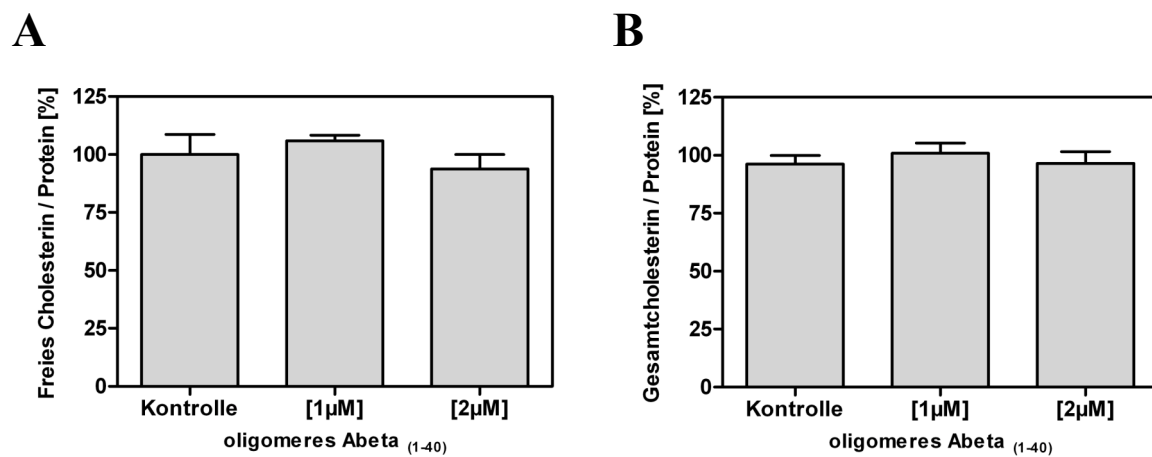


Abbildung 79 Einfluss von oligomerem Abeta₍₁₋₄₀₎ auf den Cholesteringehalt in HEK293-APPwt Zellen. Die Zellen wurden für 24h mit den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Untersucht wurde sowohl das freie, unveresterte Cholesterin (A), als auch das Gesamtcholesterin (B) im Zellhomogenat. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)

4.5.4. Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Abeta-Membran-Interaktion

Etliche Daten deuten darauf hin, dass Abeta an Lipid Raft Strukturen in der Membran bindet (Yanagisawa et al., 1998; Ariga et al., 2001; Kakio et al., 2001). Speziell Cholesterin und das Gangliosid GM-1 scheinen eine essentielle Rolle bei der Bindung von Abeta zu spielen (Matsuzaki et al., 2004). Um die Interaktion von oligomerem Abeta₍₁₋₄₀₎ mit der Membran genauer zu untersuchen, wurde der Oligomerisierungsansatz mit Fluoreszenz-markiertem Abeta₍₁₋₄₀₎ versetzt. Zusätzlich wurden Cholesterin und GM-1 angefärbt. Abbildung 80 zeigt exemplarisch eine Färbung an SY5Y-APPwt Zellen und Abbildung 81 eine an HEK293-APPwt Zellen.

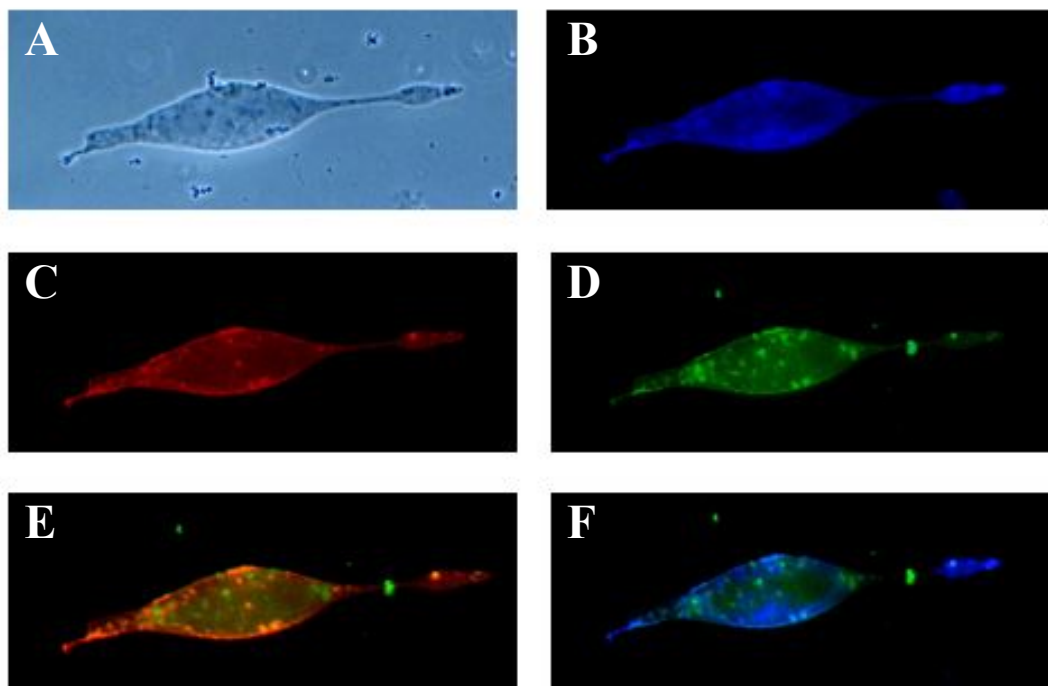


Abbildung 80 Fluoreszenzmikroskopische Detektion von oligomerem Abeta₍₁₋₄₀₎, Cholesterin und GM-1 in SY5Y-APPwt Zellen. Die Zellen wurden 24 Stunden lang mit 1 μ M oligomerem Abeta₍₁₋₄₀₎ plus 25nM Fluorescein-gekoppeltem Abeta inkubiert. (A) Durchsicht; (B) Cholesterin; (C) GM-1 Färbung; (D) Abeta₍₁₋₄₀₎; (E und F) Übereinanderlagerung von Abeta- und GM-1 bzw. Cholesterin-Färbung

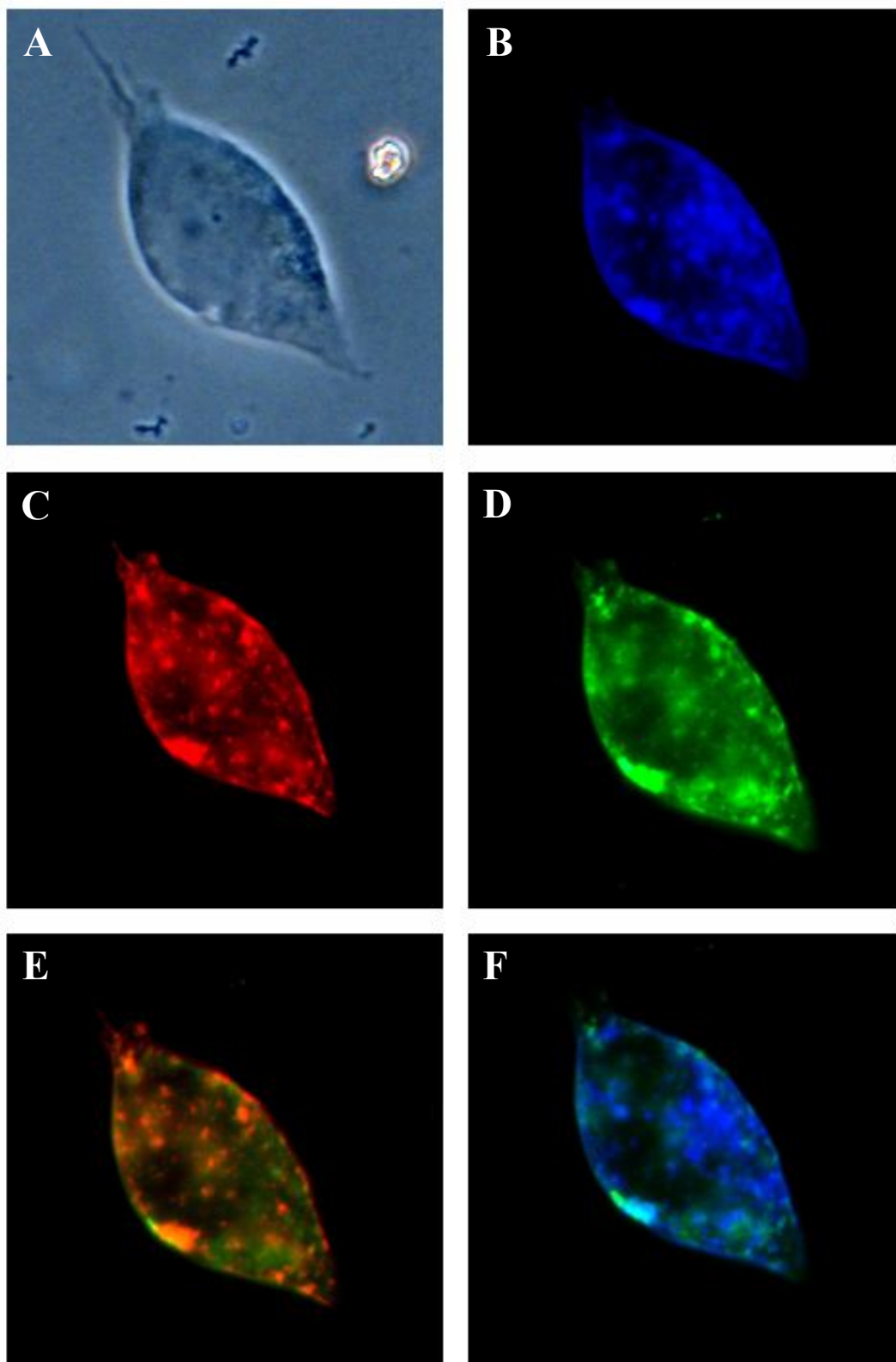


Abbildung 81 Fluoreszenzmikroskopische Detektion von oligomerem Abeta₍₁₋₄₀₎, Cholesterin und GM-1 in HEK293-APPwt Zellen. Die Zellen wurden 24 Stunden lang mit 1 μ M oligomerem Abeta₍₁₋₄₀₎ plus 25nM Fluorescein-gekoppeltem Abeta inkubiert. (A) Durchsicht; (B) Cholesterin; (C) GM-1 Färbung; (D) Fluorescein-gekoppeltes Abeta₍₁₋₄₀₎; (E und F) Übereinanderlagerung von Abeta- und GM-1 bzw. Cholesterin-Färbung

Dargestellt ist eine Durchlicht-Ansicht (A) der behandelten Zelle, sowie die Einzelfärbungen von Cholesterin (B), GM-1 (C) und das fluoreszierende Abeta (D). Die Übereinanderlagerung der GM-1-Färbung mit den fluoreszierenden Bereichen des oligomeren Abeta₍₁₋₄₀₎ zeigt, dass weite Teile beider Färbungen kolokalisieren, was darauf hindeutet, dass sich Abeta größtenteils in den Raft-Strukturen der Membran anlagerte (E). Analog zu der detektierten Kolokalisation von GM-1 und Cholesterin führt auch die gemeinsame Darstellung von Cholesterin- und Abeta-Färbung zu einer Überlagerung der Fluoreszenzsignale (F). Im Vergleich ist die Kolokalisation von Abeta und GM-1 stärker ausgeprägt als mit Cholesterin, was die Befunde von Yanagisawa et al. bestätigt, dass Abeta an GM-1 bindet.

4.6. Quervernetzung von Lipid Rafts mit Hilfe von Cholera toxin

Eine Reihe von Daten zeigen, dass der Komplex aus GM-1 und Abeta zu einer erhöhten Aggregationstendenz führen (Yanagisawa et al., 1998). Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die Bindung an GM-1 und zeigen, dass die Interaktion von Abeta mit der Membran zu einem Anstieg der amyloidogenen Prozessierung führt. Basierend auf diesen Befunden wurde postuliert, dass die Bindung und Aggregation von Abeta zu einer Kondensation von Lipid Rafts führt und so die Kolokalisation von Raft-assoziiertem APP und Raft-assoziiertes β -Sekretase stimuliert. Zur Überprüfung der Hypothese wurden HEK293-APPwt Zellen zunächst mit der nicht-toxischen Untereinheit B des Cholera toxins inkubiert, die ebenfalls mit hoher Affinität an GM-1 bindet. Im Anschluss wurde mit Hilfe eines Cholera toxin-Antikörpers eine Quervernetzung des gebundenen Toxins initiiert, um ebenfalls eine Kondensation von GM-1 Gangliosiden zu erwirken.

4.6.1. Anisotropiemessungen an intakten Zellen

Für das Experiment wurden HEK293-APPwt Zellen für 30 Minuten mit Cholera toxin (Untereinheit B) inkubiert. Die anschließende Inkubationszeit mit dem Antikörper betrug 24 Stunden.

In den behandelten Zellen wurde zunächst die Membranfluidität bestimmt. Abbildung 82 zeigt, dass die Quervernetzung von Lipid Rafts zu einer signifikanten Abnahme der Membranfluidität führt.

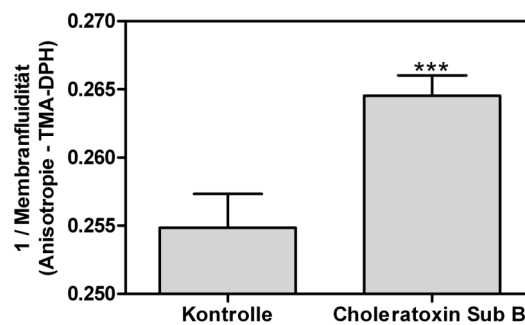


Abbildung 82 Einfluss der Lipid Raft Quervernetzung auf die Membranfluidität in HEK293-APPwt Zellen. Die Anisotropie wurde in den behandelten Zellen mit Hilfe von TMA-DPH bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 12 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)

4.6.2. Sekretion von Abeta

Das Medium der behandelten Zellen wurde auf den Gehalt an Abeta₍₁₋₄₀₎ und Abeta₍₁₋₄₂₎ hin analysiert. Abbildung 83 zeigt, dass die Behandlung zu einem signifikanten Anstieg der Abeta-Sekretion führte. Beide Abeta-Fragmente konnten in nahezu doppelter Menge im Vergleich zu den Kontrollzellen detektiert werden.

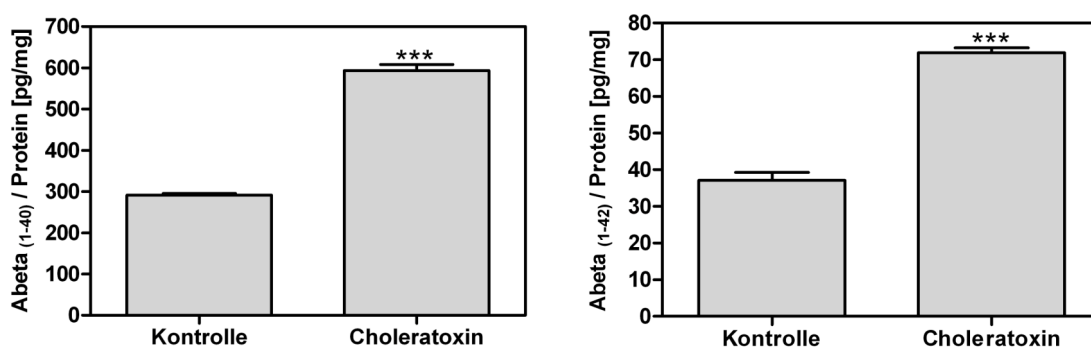


Abbildung 83 Einfluss der Lipid Raft Quervernetzung auf die Sekretion von Abeta₍₁₋₄₀₎ (linke Seite) und Abeta₍₁₋₄₂₎ (rechte Seite) in HEK293-APPwt Zellen. Die Zellen wurden 30 Minuten mit Cholera toxin und 24h mit anti-Cholera toxin-Antikörper behandelt. Im Anschluss wurde das Kulturmedium mittels ELISA analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelerperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)

4.6.3. Western Blot Analyse

Um zu untersuchen, ob die Behandlung zu einer Beeinflussung der α -Sekretase führt, wurde im Kulturmedium der Gehalt an sezerniertem APP α bestimmt. Abbildung 84 zeigt, dass die Quervernetzung der Lipid Rafts zu einer signifikanten Abnahme der α -Sekretase Aktivität führte. Nach der Behandlung konnte eine 25%ige Reduktion an APP α detektiert werden.

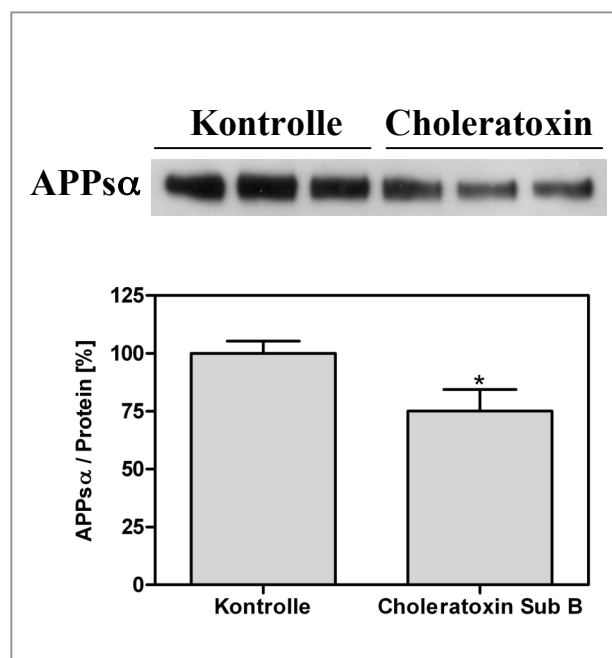


Abbildung 84 Einfluss der Lipid Raft Quervernetzung auf die Sekretion von APP α in HEK293-APPwt Zellen. APP α wurde nach 24stündiger Inkubation im Medium mit Hilfe des Antikörpers 6E10 detektiert und auf den Proteingehalt im Zellhomogenat normiert. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit ImageJ und PrismGraph Pad 4.0. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)

4.7. Einfluss von basalen Unterschieden in der Abeta-Sekretion

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die externe Zugabe von Abeta zu einer Abnahme der Membranfluidität und damit zu einer veränderten APP-Prozessierung führt. Im Folgenden wurden Zellmodelle mit stark abweichender basaler Abeta-Sekretion untersucht, um zu überprüfen, ob die Membranfluidität der unbehandelten Zellen ebenfalls unterschiedliche Basalwerte aufweist. Die bislang verwendeten HEK293-APPwt Zellen wurden hierfür mit untransfizierten Kontrollen (HEK293-ut) und HEK293 Zellen, die stabil mit humanem APP mit schwedischer Mutation transfiziert wurden (HEK293-APPsw), verglichen.

4.7.1. Sekretion von Abeta

Zunächst wurden die basalen Spiegel an sezerniertem Abeta₍₁₋₄₀₎ und Abeta₍₁₋₄₂₎ untersucht (Abbildung 85). Der Vergleich zeigt, dass die untransfizierten HEK293 Zellen signifikant weniger Abeta produzieren, als die APP-transfizierten Zellen. Die schwedische Mutation im APP führt dabei zu einer nochmals signifikant höheren Menge an Abeta, verglichen mit dem Wildtyp-APP.

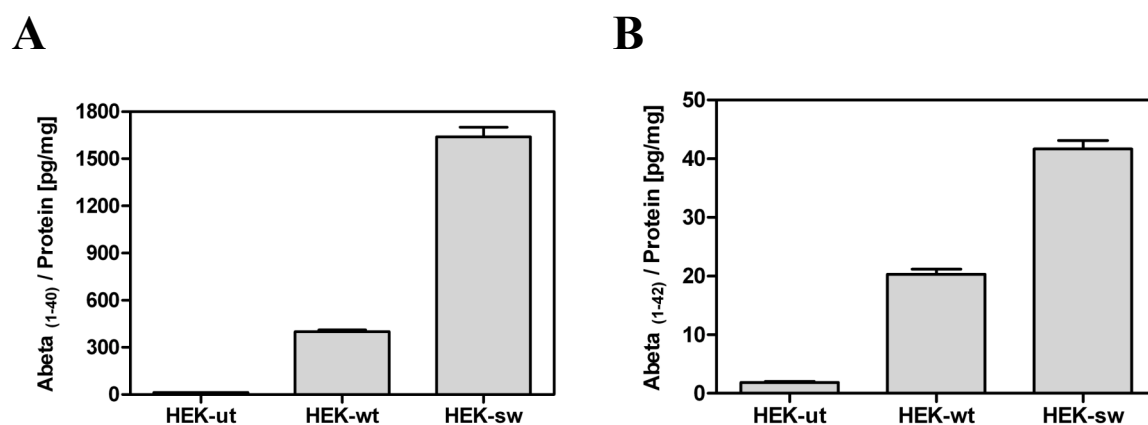


Abbildung 85 Unterschiede in der basalen Abeta-Sekretion zwischen untransfizierten HEK293 (HEK-ut), APP-Wildtyp transfizierten (HEK-wt) und APP-schwedisch transfizierten (HEK-sw) HEK293 Zellen; A) basale Sekretion von Abeta₍₁₋₄₀₎; B) basale Sekretion von Abeta₍₁₋₄₂₎

4.7.2. Anisotropiemessungen an intakten Zellen

Die Anisotropiemessung der unbehandelten Zellen zeigt, dass auch die basale Membranfluidität der drei Zelltypen signifikante Unterschiede aufweist, wobei in HEK-ut Zellen die höchste und in HEK-sw Zellen die niedrigste Membranfluidität detektiert wurde (Abbildung 86). Dieser Befund korreliert mit der basalen Abeta-Sekretion der Zellen (Abbildung 87).

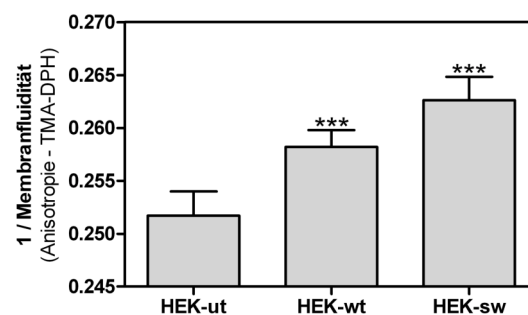


Abbildung 86 Unterschiede in der basalen Membranfluidität zwischen untransfizierten HEK293 (HEK-ut), APP-Wildtyp transfizierten (HEK-wt) und APP-swedish transfizierten (HEK-sw) HEK293 Zellen.

4.7.3. Korrelation

Zur besseren Übersicht wurden die ermittelten Basalwerte von Membranfluidität und Abeta-Sekretion miteinander korreliert. Abbildung 87A zeigt die Korrelation mit Abeta₍₁₋₄₀₎, Abbildung 87B die mit Abeta₍₁₋₄₂₎.

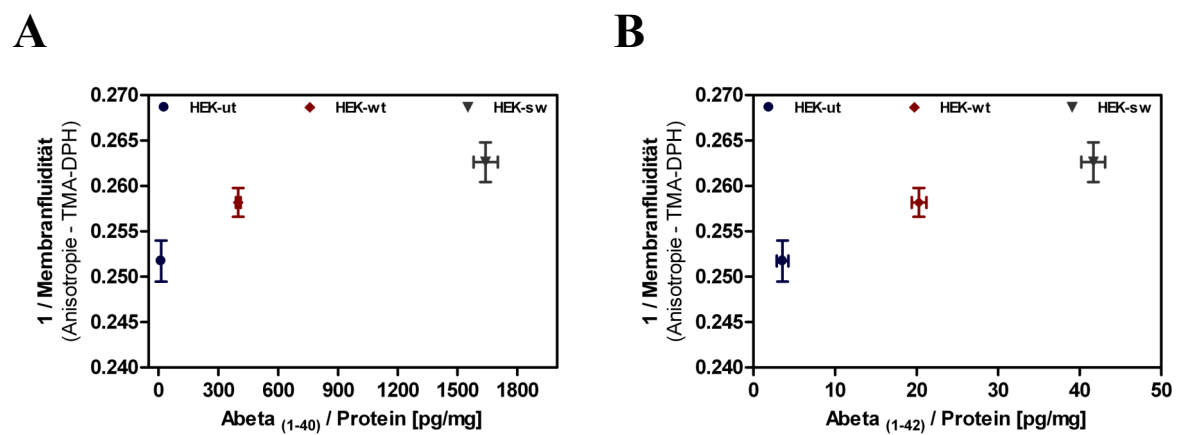


Abbildung 87 Korrelation von Membranfluidität und Abeta-Sekretion in HEK-ut, HEK-wt und HEK-sw Zellen; A) Abeta₍₁₋₄₀₎; B) Abeta₍₁₋₄₂₎

4.7.4. Einfluss von fibrillärem Abeta₍₁₋₄₂₎

Um den Einfluss von extern zugegebenem Abeta zu untersuchen, wurde das Kulturmedium der drei Zelltypen für 24 Stunden mit 2 μ M fibrillärem Abeta₍₁₋₄₂₎ versetzt. In HEK-ut und HEK-wt Zellen führte die Behandlung zu einer deutlichen Abnahme der Membranfluidität. In HEK-sw Zellen hingegen konnten keine signifikanten Veränderungen der Membranfluidität im Vergleich zu unbehandelten Zellen detektiert werden (Abbildung 88)

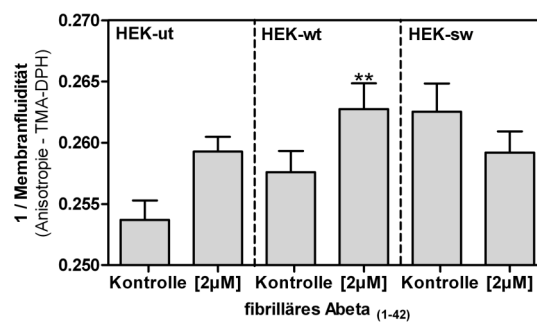


Abbildung 88 Einfluss von fibrillärem Abeta₍₁₋₄₂₎ auf die Membranfluidität von HEK-ut, HEK-wt und HEK-sw Zellen. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit Abeta inkubiert und anschließend mittels TMA-DPH als Fluoreszenzsonde analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 4 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)

4.8. γ -Sekretase Inhibitor DAPT

Der direkte Zusammenhang von Abeta-Produktion / -Membraninteraktion und der detektierten Abnahme der Fluidität sollte im folgenden Projekt bestätigt werden. Dafür wurde durch längerfristige Inkubation mit dem γ -Sekretase Inhibitor DAPT die Freisetzung von Abeta über mehrere Zellzyklen hinweg verhindert. Basierend auf früheren Experimenten (Doktorarbeit Astrid Bonert) wurde eine DAPT-Konzentration von $1\mu\text{M}$ gewählt. Der Inhibitor wurde den Zellen über einen Zeitraum von insgesamt 10 Passagen zugesetzt, um eine Zell-Population zu generieren, die über mehrere Zellteilungen hinweg eine stark verminderte Abeta-Sekretion und -Anlagerung aufweisen sollte. Parallel dazu wurden Kontrollzellen kultiviert, die nach jeder Passage die entsprechende Menge an DMSO (Lösungsmittel von DAPT) erhielten.

4.8.1. Zell-Viabilität

Die konstante Gegenwart von DAPT hatte keinen erkennbaren Einfluss auf die Zellproliferation. Auch bezüglich der MTT-Reduktionsrate konnten keine Veränderungen beobachtet werden, d.h. DAPT führte weder zu einer Verstärkung noch zu einer Reduktion der metabolischen Aktivität (Abbildung 89A). Im ToxiLight-Assay zeigte die Behandlung ebenfalls keinen Effekt (Abbildung 89B).

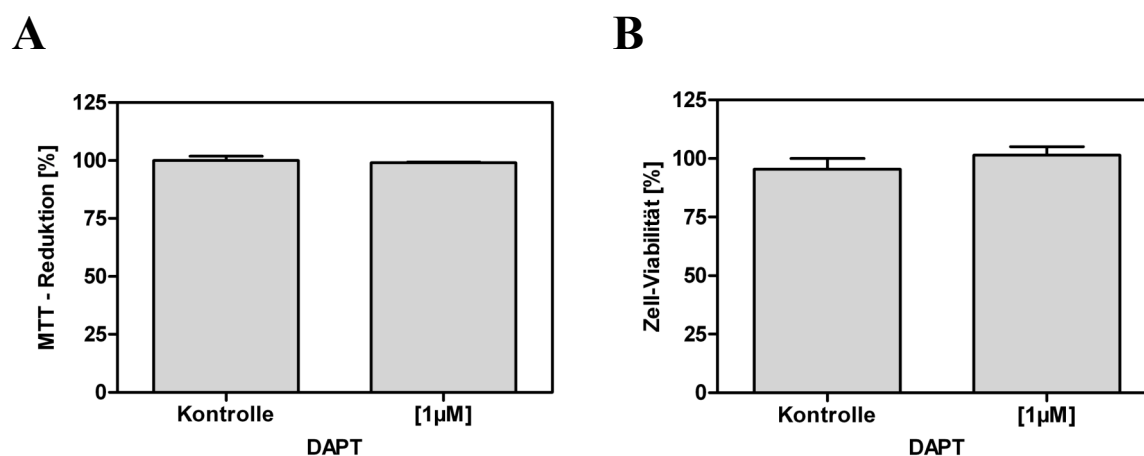


Abbildung 89 Einfluss von DAPT auf die Zell-Viabilität in HEK293-APPwt Zellen. Die Zellen wurden über 10 Passagen mit $1\mu\text{M}$ DAPT behandelt; A) MTT-Assay; B) ToxiLight-Assay. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelerperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)

4.8.2. Sekretion von Abeta

Die Analyse des Kulturmediums der behandelten Zellen zeigte bereits nach 24 Stunden eine nahezu vollständige Inhibition der Abeta-Sekretion (Daten nicht gezeigt). Abbildung 90 gibt die Reduktion an sezerniertem Abeta₍₁₋₄₀₎ (A) und Abeta₍₁₋₄₂₎ (B) am Ende der mehrwöchigen Inkubationszeit an. Die Freisetzung beider Fragmente wurde gegenüber den Kontrollzellen signifikant gesenkt.

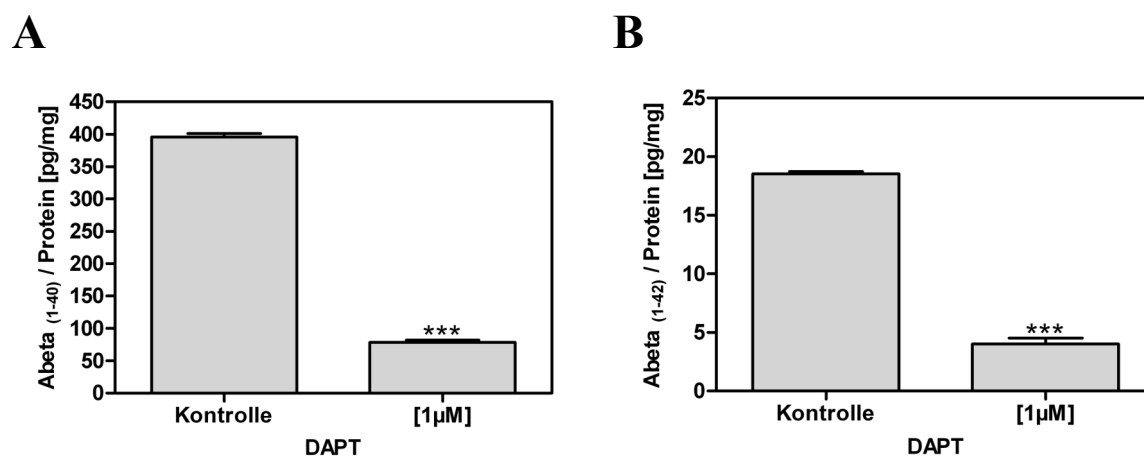


Abbildung 90 Einfluss von DAPT auf den Gehalt an sezerniertem Abeta₍₁₋₄₀₎ (A) und Abeta₍₁₋₄₂₎ (B) HEK293-APPwt Zellen. Die Zellen wurden über 10 Passagen mit 1 μM DAPT behandelt; im Anschluss wurde das Medium mittels ELISA analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von 9 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** p < 0,0001)

4.8.3. Anisotropiemessungen an intakten Zellen

Nach 24stündiger Inkubation mit DAPT konnten keine Veränderungen in der Membranfluidität beobachtet werden (Abbildung 91).

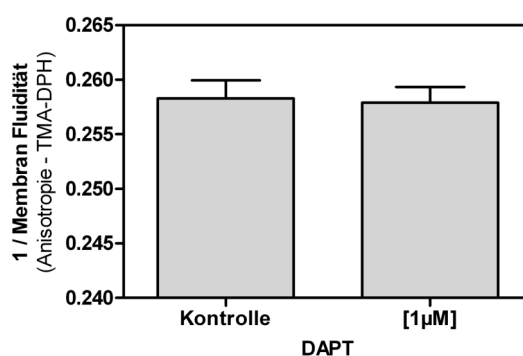


Abbildung 91 Einfluss von DAPT auf die Anisotropie der Plasmamembran von intakten HEK293-APPwt Zellen. Die Zellen wurden für 24h mit 1µM DAPT behandelt; die Anisotropie der Membranen wurde mittels TMA-DPH als Fluoreszenz-Sonde bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 3 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)

Erst ab der fünften Passage zeigte sich eine signifikante Abnahme der Anisotropie. Die Anisotropiemessungen wurden ab diesem Zeitpunkt einmal pro Woche durchgeführt. Die prozentuale Abnahme blieb während dem Zeitraum bei allen Messungen konstant. Abbildung 92 zeigt die Zusammenfassung der insgesamt neun Messungen.

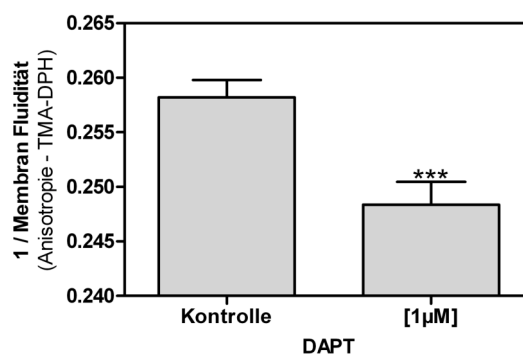


Abbildung 92 Einfluss von DAPT auf die Anisotropie der Plasmamembran von intakten HEK293-APPwt Zellen. Die Zellen wurden über 10 Passagen mit 1µM DAPT behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 9 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)

4.8.4. Kontrollexperimente mit untransfizierten HEK293 Zellen

Um zu bestätigen, dass der beobachtete Effekt auf eine reduzierte Anlagerung von Abeta zurückzuführen ist, wurden zusätzlich auch untransfizierte Zellen mit DAPT behandelt. Die Inkubation der HEK293-ut Zellen erfolgte analog zu den HEK293-APPwt Zellen. Abbildung 93A zeigt vergleichend die Sekretion von Abeta₍₁₋₄₂₎ in HEK293-APPwt und HEK293-ut Zellen mit und ohne DAPT. In HEK293-APPwt Zellen führte die Behandlung mit DAPT dazu, dass die Menge an sezerniertem Abeta₍₁₋₄₂₎ auf die der untransfizierten Zellen reduziert. In HEK293-ut Zellen hingegen bewirkt DAPT keine weitere Abnahme an Abeta₍₁₋₄₂₎. Abbildung 93B zeigt die Anisotropie beider Zellmodelle am Ende der Inkubationszeit. Auch hier führte die Inkubation mit DAPT in HEK293-ut Zellen zu keinem Effekt. Der Vergleich mit den behandelten HEK293-APPwt Zellen zeigt, dass die detektierte Anisotropie ungefähr den Werten der HEK293-ut Zellen entspricht. Der Befund deutet darauf hin, dass durch die Behandlung mit DAPT die Membranfluidität von HEK293-APPwt Zellen auf das Niveau von untransfizierten HEK293-Zellen reduziert bzw. regeneriert wurde.

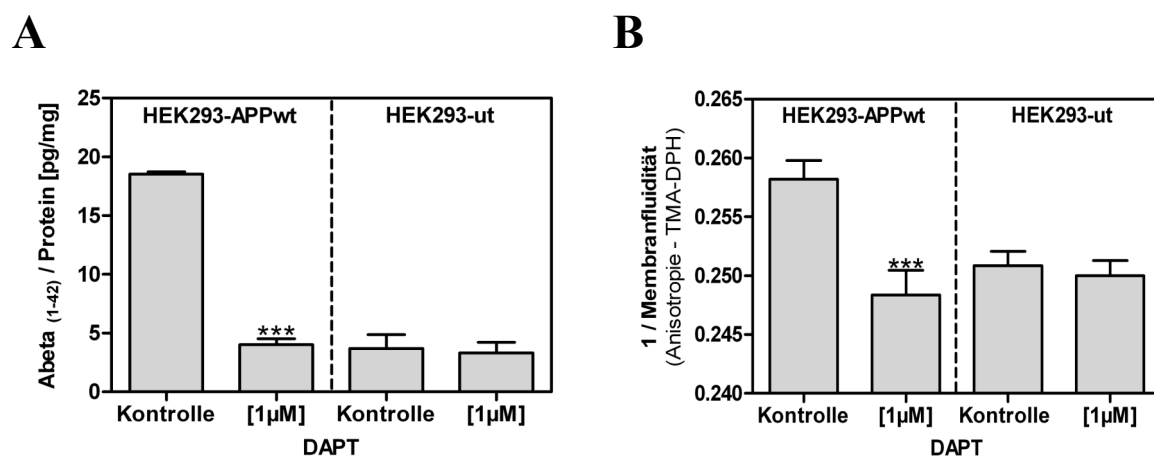


Abbildung 93 Einfluss von DAPT auf untransfizierte HEK293 Zellen im Vergleich zu APP-wt transfizierten HEK293 Zellen; A) sezerniertes Abeta₍₁₋₄₂₎; B) Anisotropie/Membranfluidität in intakten Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von 6-9 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** p < 0,0001)

4.8.5. Western Blot Analyse der APP-Prozessierung

Am Ende der DAPT-Inkubation wurden die Mengen an APP, APP α und CTFs mittels Western Blot analysiert. Die Behandlung führte zu keiner Veränderung des APP-Gehalts, so dass ausgeschlossen werden kann, dass die detektierte Reduktion von Abeta auf eine verminderte APP Expression zurückzuführen ist (Abbildung 94A). Das C-terminale Fragment der α -Sekretase wurde durch die langfristige Zugabe von DAPT stark erhöht, was für eine verstärkte nicht-amyloidogene APP-Prozessierung spricht (Abbildung 94B). Dieser Befund wurde durch die Detektion von APP α bestätigt. Auch hier kam es durch die Behandlung mit DAPT zu einer signifikant Zunahme des α -Sekretase Fragments (Abbildung 95).

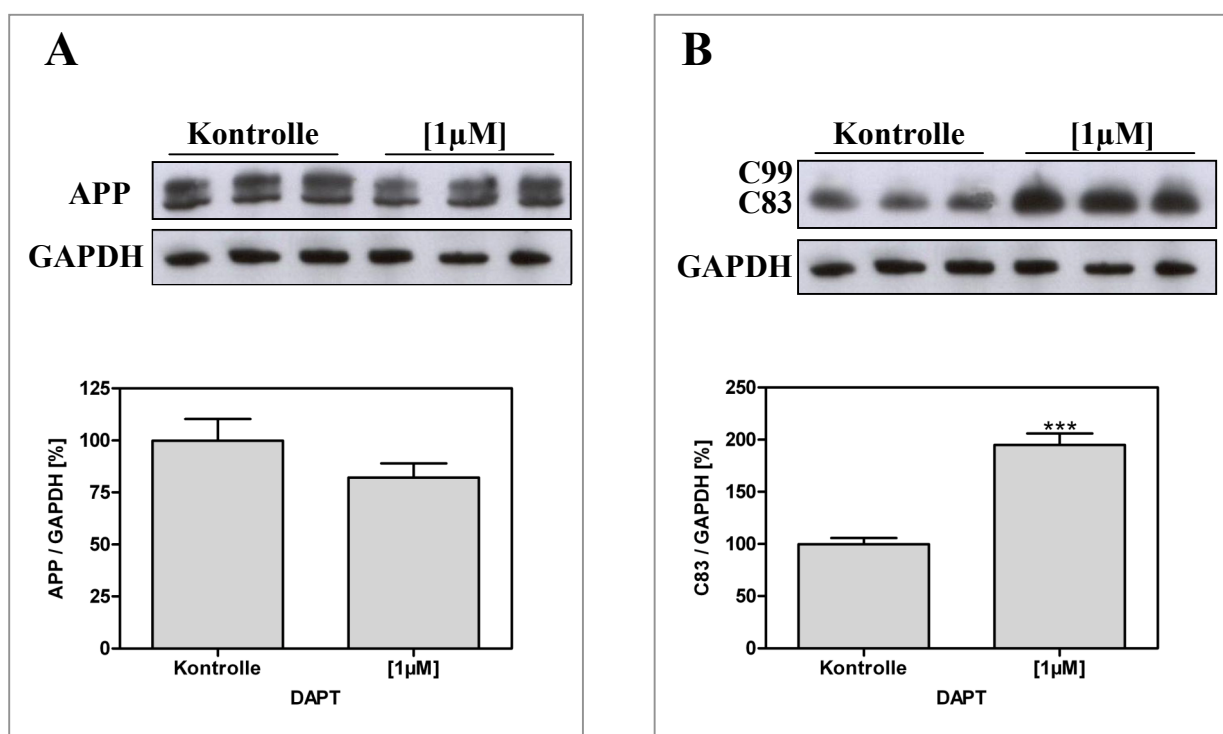


Abbildung 94 Einfluss von DAPT auf die APP Prozessierung in HEK293-APPwt Zellen. A) APP; B) C83/C99. APP, C83 und C99 wurden im Zellhomogenat mit Hilfe des Antikörpers C1/6.1 detektiert und auf GAPDH normiert. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit ImageJ und PrismGraph Pad 4.0. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 6-9 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)

Die Detektion des C-terminalen Fragments der β -Sekretase, C99, bedarf einer längeren Belichtungszeit, da die basale Menge deutlich geringer ist als die von C83. Aufgrund der stark erhöhten Menge an C83 nach der Behandlung mit DAPT, führte die längere Belichtung zu einem Überstrahlen der C83-Bande, so dass C99 nicht detektiert werden konnte.

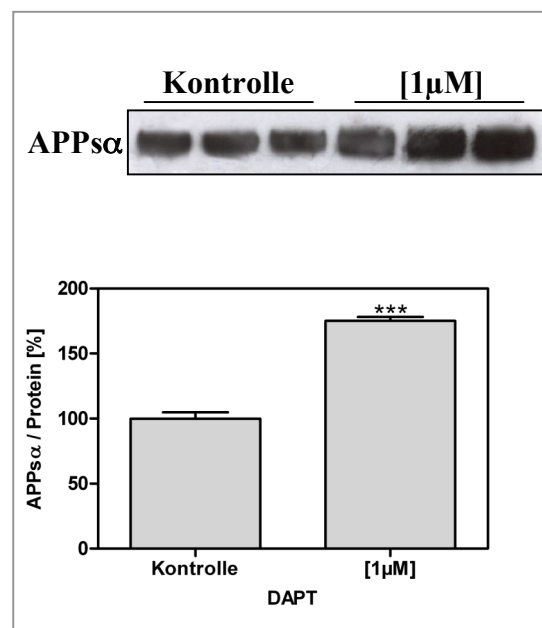


Abbildung 95 Einfluss von DAPT auf die Sekretion von APPs α in HEK293-APPwt Zellen. APPs α wurde am Ende der Inkubationszeit im Medium mit Hilfe des Antikörpers 6E10 detektiert und auf den Proteingehalt im Zellhomogenat normiert. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit ImageJ und PrismGraph Pad 4.0. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 6-9 Einzelerperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)

5. Diskussion

5.1. Statine und APP-Prozessierung – cholesterinabhängige vs. pleiotrope Effekte

In Bezug auf den Zusammenhang von Alzheimer Demenz und Cholesterin nimmt die Klasse der HMG-CoA Reduktase Hemmer eine besondere Rolle ein. Im Jahr 2000 zeigten zwei unabhängige epidemiologische Studien, dass die Einnahme von Statinen das Risiko einer Demenzerkrankung signifikant vermindert (Jick et al., 2000; Wolozin et al., 2000). Obwohl Statine in der primären Indikation zur Behandlung von Hypercholesterinämien eingesetzt werden, umfasst das pharmakologische Wirkungsspektrum eine Reihe von Effekten, die unabhängig von der Cholesterinreduktion auftreten (Mason et al., 2003; Rajanikant et al., 2007).

Die lipidunabhängigen, pleiotropen Effekte begründen sich auf der Tatsache, dass die Inhibition der HMG-CoA Reduktase kein definiertes Endprodukt hemmt, sondern die Synthese von mehreren stoffwechselrelevanten Intermediaten verhindert (Mason et al., 2003). Im Vordergrund stehen die Isoprenoide Farnesylpyrophosphat und Geranylgeranylpyrophosphat. Eine Reihe von Studien zieht die Statin-induzierte Inhibition von Protein Prenylierungen statt der Cholesterinsenkung als potentiellen Hauptwirkmechanismus, auch in Bezug auf die Prozessierung von APP, in Betracht (Wolozin et al., 2006; Cordle et al., 2005; Cole et al., 2005; Parson et al., 2006). Experimentelle Daten zeigen partiell eine cholesterinunabhängige Beeinflussung der APP-Prozessierung durch Statine (Cole et al., 2005; Parsons et al., 2006).

Auf der anderen Seite führt die selektive Depletion von Cholesterin beispielsweise durch Methyl- β Cyclodextrin (M β CD) ebenfalls zu einer signifikanten Senkung der Abeta Spiegel, ohne dass der Isoprenoidstoffwechsel betroffen ist (Simons et al., 1998; Frears et al., 1999; Buxbaum et al., 2000; Fassbender et al., 2001; Kojro et al., 2003; Eehalt et al., 2003). Der Effekt ist zudem umkehrbar, da die Beladung von Zellmembranen mit Cholesterin zu einem starken Anstieg der Abeta Produktion führt, was eindeutig für die spezifische Rolle von Cholesterin spricht (Bodovitz et al., 1996; Racchi et al., 1997; Galbete et al., 2000).

Aufgrund der kontroversen Datenlage wurden im Zuge der vorliegenden Arbeit in zwei unabhängigen Modellsystemen zunächst Lovastatin und anschließend selektive Inhibitoren des Isoprenoid- und Cholesterinstoffwechsels bezüglich ihres Einflusses auf die Abeta-Produktion untersucht.

5.1.1. Lovastatin

Die Behandlung mit Lovastatin erfolgte in neuronalen SH-SY5Y-Neuroblastomazellen (SY5Y-APPwt) und nicht-neuronalen HEK293-Zellen (HEK293-APPwt). Beide Zell-Linien sind humanen Ursprungs und lagen stabil mit humanem APP695 transfiziert vor. In beiden Zell-Modellen konnte eine konzentrationsabhängige Abnahme von Cholesterin und Abeta detektiert werden. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen zuvor publizierte Arbeiten (Simons et al., 1998; Frears et al., 1999; Buxbaum et al., 2000; Fassbender et al., 2001; Kojro et al., 2003; Eehalt et al., 2003). Die Unterscheidung von freiem und Gesamtcholesterin ermöglichte dabei eine genaue Analyse der Statin-induzierten Effekte. Bei allen eingesetzten Konzentrationen konnte eine Reduktion beider Fraktionen detektiert werden. Der prozentuale Vergleich zeigt, dass das freie Cholesterin stärker reduziert wurde als das veresterte.

Interessanterweise waren die Effekte in den SY5Y-APPwt Zellen wesentlich stärker ausgeprägt, als in den HEK293-APPwt Zellen. Neuronale Zellen erscheinen demzufolge sensitiver gegenüber Lovastatin als nicht-neuronale.

Die Daten der vorliegenden Arbeit stehen im Widerspruch zu dem Befund, dass eine moderate Reduktion von Cholesterin (<25%) zu einer erhöhten Abeta-Produktion führt und erst eine stärkere Reduktion von >35% die Freisetzung inhibiert (Abad-Rodriguez et al., 2004). Allerdings wurde die Cholesterinreduktion in den beschriebenen Experimenten nicht durch Statine allein, sondern durch die Kombination von Mevilonin (Lovastatin) und Methyl- β -Cyclodextrin induziert. Als Modellsystem dienten außerdem primäre Hippocampus Neuronen, so dass kein direkter Vergleich der Daten möglich ist.

5.1.2. Selektive Inhibition von Protein Isoprenylierungen

Die pleiotrope Wirkung von Lovastatin in Bezug auf die reduzierte Isoprenoidsynthese wurde im Zuge dieser Arbeit durch Inhibition der beiden relevanten Prenyltransferasen nachgeahmt. Alle Versuche wurden im neuronalen Modell der SY5Y-APPwt Zellen durchgeführt. Der experimentelle Ansatz unterscheidet sich von den zuvor publizierten Daten zur Untersuchung von Statin-induzierten Isoprenoideffekten, die sich auf einen konzentrationsabhängigen Mechanismus der Statinwirkung beziehen (Cole et al., 2005; Parsons et al., 2006).

Das Modell geht davon aus, dass die intrazellulären Cholesterinester im Fall der inhibierten Neusynthese als Reserve dienen, wohingegen kein Reservoir für Isoprenoide zu existieren scheint (Cole et al., 2005). Daraus folgt, dass die Isoprenoidsynthese sehr viel sensitiver gegenüber der Statin-Wirkung ist als die Cholesterinsynthese. Geringe Statin-Konzentrationen von 1-5 μ M führen daher zu einer verminderten Isoprenoidsynthese (Bellosta et al., 1998), während die Cholesterinspiegel im gewählten Modell weiterhin konstant bleiben. Erst hohe Statin-Konzentrationen von 20-40 μ M bewirken die Reduktion beider Syntheseprodukte (Frears et al., 1999). In diesem Fall kann durch Zugabe einer geringen Menge an Mevalonat selektiv die sensitivere Isoprenoidsynthese reaktiviert werden, so dass ausschließlich der Cholesteringehalt reduziert wird (Cole et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit führte weder die Inhibition der Farnesyltransferase noch der Geranylgeranyltransferase zu einer Beeinflussung der Abeta Sekretion, was darauf hindeutet, dass in dem verwendeten Modellsystem keine der beiden Prenylierungen von essentieller Bedeutung für die APP-Prozessierung ist. Bislang liegen keine publizierten Daten vor, die ebenfalls den Effekt der verwendeten Transferase-Inhibitoren auf die Abeta-Produktion untersucht hätten.

Die Arbeit von Cole et al. zeigt jedoch, dass bei konstantem Cholesterinspiegel eine isoprenoid'abhängige Zunahme an intrazellulärem Abeta, sowie APP und C99 nach der Behandlung mit Lovastatin detektiert werden konnte (Cole et al., 2005). Gleichzeitig kommt es zu einer Reduktion des sezernierten Abeta, was in Übereinstimmung mit den vorliegenden Daten steht. Die reduzierte Prenylierung von kleinen GTPasen bewirkt möglicherweise eine Störung des APP-Transports, so dass das Protein in verstärktem Maße intrazellulär prozessiert wird, was die Akkumulation aller Fragmente erklären würde (Cole et al., 2005). Da in der vorliegenden Arbeit nur sezerniertes Abeta bestimmt wurde, schließen sich die Ergebnisse nicht aus.

Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von Parsons et al., in denen die Behandlung mit Lovastatin und Simvastatin bei einer Konzentration von 1 und 10 μM zu einer signifikanten Reduktion der gesamten und intrazellulären Abeta Produktion führt, ohne dass die Sekretion beeinflusst wird (Parsons et al., 2006). Simvastatin zeigt bei höheren Konzentrationen sogar einen Anstieg der Abeta Sekretion. Die Arbeit beruft sich auf das zuvor beschriebene Modell der konzentrationsabhängigen Inhibition von Isoprenoid- und Cholesterinsynthese und zeigt, dass bei 1 μM kein Effekt auf den Cholesteringehalt, wohl aber auf die APP-Prozessierung beobachtet werden konnte.

In den beschriebenen Publikationen wurde nur der Gehalt an Gesamtcholesterin bestimmt, was ein undifferenziertes Bild der Statin-induzierten Cholesterineffekte liefert. Die Daten der vorliegenden Arbeit unterscheiden hingegen zwischen freiem und Gesamtcholesterin. Lovastatin zeigt dabei einen wesentlich stärkeren Effekt auf das freie Cholesterin, was bei der ausschließlichen Bestimmung des Gesamtcholesterins nicht beobachtet werden kann. Im Zuge dieser Arbeit konnte daher bei einer Konzentration von 1 μM eine Reduktion von Cholesterin detektiert werden. Lovastatin-Konzentrationen über 5 μM führen in den verwendeten Modellsystemen zu einer signifikanten Abnahme der Zell-Viabilität.

5.1.3. Selektive Inhibition der Cholesterinsynthese

Die cholesterinabhängige Wirkung von Lovastatin wurde durch verschiedene Inhibitoren der Cholesterinbiosynthese imitiert, die unterhalb des Verzweigungspunktes zur Isoprenoidsynthese angreifen und keinen Einfluss auf die Protein Isoprenylierungen nehmen. Zwei der verwendeten Substanzen, BM 15.766 und U 18666A wurden bereits zuvor in Bezug auf Abeta-Bildung untersucht, allerdings in unterschiedlichen Modellsystemen und unter differierenden experimentellen Bedingungen. BM 15.766 inhibiert die 7-Dehydrocholesterol-7-Reduktase und damit den letzten Schritt der Cholesterinbiosynthese. Eine Studie an transgenen Mäusen zeigte eine signifikante Reduktion der Plasma Cholesterinspiegel sowie der Abeta-Konzentration im Gehirn (Refolo et al., 2001). Der Oxidosqualen-Zyklase und Cholesterintransport-Inhibitor U 18666A wurde in verschiedenen Zellmodellen untersucht. Die Behandlung resultierte einerseits in einer signifikanten Reduktion der sezernierten Abeta Spiegel (Runz et al., 2002). Andererseits führte die Behandlung aber zur Akkumulation von intrazellulärem Cholesterin und Abeta (Yamazaki et al., 2001). Der Effekt ist nach Entfernen des Inhibitors reversibel (Yamazaki et al., 2001). Der dritte eingesetzte Inhibitor RPR 107393A hemmt die Squalen-Zyklase und wurde bislang nicht in Bezug auf die Abeta Produktion untersucht, sondern nur hinsichtlich der cholesterinsenkenden Wirkung. In Rattenleberzellen zeigt RPR 107393A diesbezüglich eine höhere Effizienz als Lovastatin und Pravastatin (Amin et al., 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurden die drei Inhibitoren unter gleichen experimentellen Bedingungen in SY5Y-APPwt Zellen untersucht. Die Daten bestätigen die cholesterinsenkende Wirkung der Substanzen. Gleichzeitig führt die Behandlung jeweils zu einer reduzierten Abeta Sekretion. Die Ergebnisse unterstützen die Daten von Refolo et al. (2001), auch wenn der Effekt von BM 15.766 im verwendeten Zellmodell nur schwach ausgeprägt ist. Gleichzeitig zeigen die Daten, dass auch die Inkubation mit RPR 107393A Einfluss auf die amyloidogene Prozessierung nimmt und parallel zu einer Senkung von Cholesterin und sezerniertem Abeta führt. Beide Inhibitoren bewirken die Reduktion von verestertem und freiem Cholesterin.

U 18666A führt in dem verwendeten Modellsystem ebenfalls zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Abeta-Sekretion. Der Befund steht in Übereinstimmung mit den Daten von Runz et al. (2002). Da in der vorliegenden Arbeit nur die Sekretion von Abeta untersucht wurde, kann keine Aussage über eine mögliche intrazelluläre Akkumulation von Abeta gemacht werden. Interessanterweise bewirkt die Behandlung jedoch eine konzentrationsabhängige Zunahme des Gesamtcholesterins, bei gleichzeitiger Reduktion des freien Cholesterins. Das Ergebnis spricht für eine verstärkte Esterbildung, die vermutlich auf die Inhibition des intrazellulären Cholesterintransports zur Zellmembran zurückzuführen ist. Die Arbeit von Runz et al. zeigt, dass die gleichzeitige Gabe von LDL (angereichert mit ^{14}C) und U 18666A zu einer stark reduzierten Formation von Estern führt, was durch die Inhibition des Cholesterintransports zum ER begründet wird (Runz et al., 2002). Im Zuge dieser Arbeit erfolgte die Inkubation ohne Zugabe von LDL. Möglicherweise tritt daher verstärkt die Inhibition des Transports von freiem Cholesterin zur Plasmamembran hervor.

Die Arbeit von Puglielli et al. (2001) zeigt, dass die Zunahme von intrazellulären Cholesterinestern mit einer verstärkten Abeta-Produktion korreliert. Die Acyl-Coenzym A Cholesterin Acyltransferase (ACAT) katalysiert die Formation von Cholesterinestern und kontrolliert das dynamische Gleichgewicht beider zellulärer Cholesterinfraktionen (Stryer, 2000). Puglielli et al. zeigen, dass die kompetitive Inhibition des Enzyms zu verminderter Esterbildung und reduzierten Abeta-Spiegeln führt. Gleichzeitig kommt es zu einer Akkumulation von freiem Cholesterin in der Zelle (Puglielli et al., 2001). Dagegen zeigt die Behandlung mit U 18666A in der vorliegenden Arbeit trotz erhöhtem Gesamtcholesterin eine konzentrationsabhängige Reduktion von sezerniertem Abeta, die in starkem Maß mit der Abnahme an freiem Cholesterin korreliert. Die Diskrepanz der Ergebnisse kann zum einen auf die unterschiedlichen Modellsysteme zurückgeführt werden, zum anderen zeigen etliche Daten, dass die zelluläre Verteilung des Cholesterins und nicht die Gesamtmenge Einfluss auf die APP-Prozessierung nimmt (Runz et al., 2002; Burns et al., 2006). Die intrazelluläre Akkumulation von freiem Cholesterin trifft daher keine Aussage über beispielsweise den Gehalt an Cholesterin in der Plasmamembran. Da weder in der beschriebenen, noch in der vorliegenden Arbeit zwischen unterschiedlichen Cholesterinfraktionen unterschieden wurde, kann keine Aussage über die Verteilung des intrazellulären Cholesterins gemacht werden.

Keiner der eingesetzten Inhibitoren zeigt eine Beeinflussung der *in vitro* Aktivität der β -Sekretase gegenüber einem externen Substrat. Damit kann ausgeschlossen werden, dass die reduzierte Abeta Sekretion auf eine kompetitive Inhibition der β -Sekretase zurückzuführen ist. Für Lovastatin und Simvastatin wurde bereits in HEK293 Zellen gezeigt, dass keine Korrelation zwischen Abeta-Produktion und BACE-Aktivität besteht (Parsons et al., 2006).

Insgesamt führen damit drei unterschiedliche Inhibitoren der Cholesterinbiosynthese zu einer verminderten exogenen Abeta Produktion, was für einen Zusammenhang von Cholesteringehalt und APP Prozessierung spricht. Die Behandlungen zeigen jeweils eine starke Korrelation von freiem Cholesterin und Abeta-Sekretion, während das veresterte Cholesterin durch Inkubation mit U 18666A eine inverse Korrelation mit der Menge an sezerniertem Abeta aufweist. Zusammen mit den Ergebnissen der Isoprenoidtransferasen-Inhibition deuten die Daten darauf hin, dass die Lovastatin-induzierte Reduktion der Abeta Sekretion in den verwendeten Modellsystemen auf die beobachtete Abnahme von freiem Cholesterin zurückzuführen ist.

	Freies Cholesterin	Gesamt-cholesterin	FPP-Transfer	GGPP-Transfer	Abeta
Lovastatin	↓	↓	↓	↓	↓
GGTi 286	↔	↔	↔	↓	↔
FTi 277	↔	↔	↓	↔	↔
RPR 107393	↓	↓	↔	↔	↓
BM 15.766	↓	↓	↔	↔	↓
U 18666A	↓	↑	↔	↔	↓

Tabelle 6 Zusammenfassung der Effekte der verwendeten Substanzen auf Cholesterin, Isoprenylierungen und Abeta-Sekretion

5.2. Membranfluidität – ein regulatorisches Element in der APP-Prozessierung?

Freies Cholesterin ist in der Zelle als essentielles Strukturelement vor allem in der Plasmamembran lokalisiert. Der Gehalt an Cholesterin bestimmt in starkem Maße die Flexibilität der Membran und die damit verbundene Funktionalität der assoziierten Proteine. Da sowohl APP als auch die relevanten Sekretasen membranständige Proteine darstellen, liegt die Vermutung nahe, dass Cholesterin-induzierte Änderungen der physikalisch-chemischen Membraneigenschaften die Prozessierung beeinflussen. Die Depletion von Cholesterin durch M β CD führt in isolierten Membranen zu einem starken Anstieg der Fluidität (Kirsch et al., 2003; Kojro et al., 2001). Umgekehrt bewirkt die zusätzliche Beladung der Membran mit Cholesterin eine signifikante Abnahme der Fluidität, da die Einlagerung von Cholesterin einen ordnenden Effekt auf die Fettsäureketten hat (Kirsch et al., 2003). Die Behandlung mit Statinen zeigt ein widersprüchliches Bild hinsichtlich der Membranfluidität (Morita et al., 1997; Kojro et al., 2001).

Im Zuge dieser Arbeit konnte ein Statin-induzierter und konzentrationsabhängiger Effekt auf die Fluidität beobachtet werden. Sowohl im neuronalen Modell der SY5Y-APP Zellen, als auch in nicht-neuronalen HEK293-APP Zellen führt die Behandlung mit Lovastatin aufgrund der Cholesterinreduktion zu einem Anstieg der Membranfluidität. Der Effekt wurde sowohl in isolierten Membranen, als auch in lebenden Zellen detektiert. Die signifikante Zunahme der Fluidität korreliert mit der gemessenen Reduktion an freiem Cholesterin und der verminderten Sekretion an Abeta₍₁₋₄₀₎ und Abeta₍₁₋₄₂₎. Der gleiche Effekt konnte jedoch cholesterinunabhängig durch die Inkubation mit Benzyl Alkohol erzielt werden. Die fluidisierende Wirkung des Alkohols bewirkt ebenfalls eine signifikante Reduktion der sezernierten Abeta₍₁₋₄₀₎ und Abeta₍₁₋₄₂₎ Spiegel, ohne den Cholesteringehalt der Membran zu beeinflussen. Die Analyse von APPs α zeigt, dass sowohl Lovastatin als auch Benzyl Alkohol in Abhängigkeit der erhöhten Membranfluidität zu einer verstärkten Aktivität der α -Sekretase führen. Die amyloidogene Prozessierung wird dabei zugunsten der nicht-amyloidogenen Prozessierung reduziert.

Damit deuten die Daten der vorliegenden Arbeit auf eine cholesterinunabhängige Korrelation von Membranfluidität und APP-Prozessierung hin. Die Ergebnisse bestätigen die Arbeit von Kojro et al., in der gezeigt werden konnte, dass die Depletion von Cholesterin durch M β CD oder Lovastatin in HEK Zellen zu einer verstärkten Aktivität von ADAM 10, der potentiellen α -Sekretase führt. Der Effekt konnte ebenfalls als cholesterinunabhängig nachgewiesen werden, da die Substitution des depletierten Cholesterins mit Lanosterol, als fluidisierende Vorstufe von Cholesterin, zu einer unverändert hohen α -Sekretase Aktivität führte (Kojro et al., 2001). Die Wiederbeladung mit Cholesterin oder 4-Cholesten-3-on hingegen reduzierte die Sekretion von APPs α auf das Kontrollniveau (Kojro et al., 2001). In humanen Astroglioma U373 Zellen konnte nach der Behandlung mit M β CD ebenfalls eine 45%ige Reduktion an sezerniertem Abeta₍₁₋₄₀₎ detektiert werden, die mit einer verminderten Sekretion von APPs β einherging (Kojro et al., 2001).

Die vorliegenden Daten komplementieren die Analyse durch die Detektion der C-terminalen APP-Fragmente C99 und C83. Korrespondierend zu der beobachteten Reduktion an Abeta und der verstärkten Sekretion von APPs α führen Lovastatin und Benzyl Alkohol zu einer signifikanten Abnahme von C99 und einem Anstieg von C83. Die erhöhten Spiegel an C83 bestätigen, dass Lovastatin die Aktivität der α -Sekretase stimuliert. Die Reduktion an C99 in Verbindung mit der verminderten Sekretion von Abeta zeigt, dass die Prozessierung der β -Sekretase durch die Behandlung mit Lovastatin zugunsten der nicht-amyloidogenen Prozessierung reduziert wird. Damit bestätigt sich die zuvor postulierte These, dass beide Prozessierungswege in direkter Konkurrenz um das Substrat APP stehen.

Die Membranfluidität als regulatorischer Parameter der APP-Prozessierung konnte experimentell durch die Verwendung des cholesterinunabhängigen Membranrigidizers Pluronic F68 weiter bekräftigt werden. Die polymere Substanz lagert sich ähnlich dem Cholesterin in der Membran ein und bewirkt eine geordnete Orientierung der Fettsäureketten, was mit einer reduzierten Flexibilität der Membran einhergeht (Clarke et al., 1999). In beiden verwendeten Modellsystemen führt die Behandlung zu einer signifikanten Abnahme der Membranfluidität. Parallel dazu kommt es zu einer ausgeprägten Zunahme von sezerniertem Abeta₍₁₋₄₀₎ und Abeta₍₁₋₄₂₎, sowie des membranständigen β -Sekretasespaltproduktes C99.

Gleichzeitig wurde eine verminderte Sekretion von APP α beobachtet. Auch dem COX-Hemmer Celecoxib und dem PPAR- α Agonisten Fenofibrat konnten Lipid-ordnende Eigenschaften an Modellmembranen nachgewiesen werden (Gamerdinger et al., 2007). Wie Cholesterin und Pluronic bewirken die Substanzen eine erniedrigte Membranfluidität, was in N2A Zellen zu einem Anstieg der APP- und Abeta-Spiegel führt (Gamerdinger et al., 2007).

Zusammengenommen bekräftigen die Ergebnisse, dass die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Membran Einfluss auf das Verhältnis von α - und β -Sekretase Prozessierung nehmen. Ein hohes Maß an Membranfluidität scheint dabei die Aktivität der α -Sekretase zu stimulieren, während eine starre Membran die Prozessierung durch die β -Sekretase begünstigt.

Die Lipidzusammensetzung bzw. die daraus resultierenden Membraneigenschaften wurden bereits vielfach als mechanistische Regulatorinstanz für Enzymaktivitäten diskutiert (de Foresta et al., 1987; Horvath et al., 1997; reviewed in Marguet et al., 2006). In Bezug auf die APP-Prozessierung stellt sich dabei zusätzlich die Frage, wie die unterschiedliche Zugänglichkeit der beiden konkurrierenden Enzyme reguliert wird. Aufgrund der Tatsache, dass weder Lovastatin, Benzyl Alkohol noch Pluronic F68 zu einer veränderten APP Expression oder zu einer veränderten BACE-Aktivität führen, liegt die Vermutung nahe, dass durch die Behandlungen die Enzym-Substrat Zugänglichkeit beeinflusst wird.

Zwei Befunde geben Hinweise darauf, dass die beiden Prozessierungswege in unterschiedlichen Membrankompartimenten stattfinden. Zum einen scheint die β -Sekretase-Aktivität an die Integrität von Lipid Rafts gebunden zu sein (Simons et al., 1998; Eehalt et al., 2003), während die α -Sekretase und deren Aktivität außerhalb von Raft-Strukturen lokalisiert werden konnte (Kojro et al., 2001). APP liegt demzufolge in der Membran in zwei Fraktionen vor, von denen eine in Assoziation mit Lipid Rafts lokalisiert ist und überwiegend der amyloidogenen Prozessierung durch die β -Sekretase unterliegt, während die andere außerhalb von Raft-Domänen detektiert werden konnte und das Primärsubstrat der α -Sekretase darstellt (Eehalt et al., 2003).

Zum anderen konnte die Aktivität der α -Sekretase vorwiegend an der Zelloberfläche lokalisiert werden (Haass et al., 1996; Parvathy et al., 1999), wohingegen die amyloidogene Prozessierung vor allem in endozytotischen Einschlüssen stattzufinden scheint, was möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass es im Zuge der Endozytose zur Fusion von einzeln Rafts kommt (Koo und Squazzo, 1994; Huse et al., 2000; Eehalt et al., 2003; Abbildung 15).

APP als Transmembranprotein ist zwar basal an der Zelloberfläche lokalisiert (Shivers et al., 1988), gelangt aber auch via clathrin-vermittelter Endozytose in den endosomal-lysosomalen Kreislauf (Nordstedt et al., 1993; Yamazaki et al., 1996; Haass et al., 1992). Mutationen in der APP-Sequenz, die die Internalisierung des Proteins verhindern, führen zu einer verstärkten Sekretion von löslichen APP-Fragmenten (Ikezu et al., 1998). Cholesterin nimmt eine essentielle Rolle im Prozess der clathrin-vermittelten Endozytose ein, was einen mechanistischen Erklärungsansatz für die veränderte APP-Prozessierung in Folge von Cholesterindepletion bietet (Subtil et al., 1999; Rodal et al., 1999). Die Arbeit von Kojro et al. zeigt, dass bereits eine moderate Cholesterinreduktion den Prozess inhibiert, infolgedessen es zu einer vermehrten Anreicherung von APP an der Zelloberfläche kommt. Die Reduktion an freiem Cholesterin stört so die Enzym-Substrat Zugänglichkeit der β -Sekretase und schafft gleichzeitig ein erhöhtes Substratangebot für die α -Sekretase (Kojro et al., 2001).

Obwohl nicht bekannt ist, ob Benzyl Alkohol und Pluronic F68 endozytotische Prozesse beeinflussen, scheint dieser Mechanismus als Erklärung für die veränderte APP-Prozessierung unwahrscheinlich, da in isolierten Zellmembranen keine veränderten APP-Spiegel detektiert werden konnten. Des Weiteren führt die spezifische Inhibition von clathrin-abhängiger und -unabhängiger Endozytose zwar zu einer signifikanten Reduktion der amyloidogenen Prozessierung, ohne jedoch Einfluss auf die Aktivität der α -Sekretase zu nehmen (Eehalt et al., 2003). Zusammengenommen deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die erzielte cholesterinunabhängige Modulation der APP-Prozessierung durch Benzyl Alkohol und Pluronic F68 nicht auf Veränderungen von endozytotischen Prozessen zurückzuführen ist, sondern auf eine Modulation der Enzym-Substrat Zugänglichkeit an der Zelloberfläche.

5.3. Die Rolle von Lipid Rafts in der Amyloidogenese

Zahlreiche Arbeiten sprechen für eine Lipid Raft-assoziierte amyloidogene Prozessierung (Simons und Ikonen, 1997; Eehalt et al., 2003; Kalvodova et al., 2005). Die Antikörper-induzierte Quervernetzung von BACE und APP führt zur Kolokalisation beider Proteine an der Zelloberfläche, gemeinsam mit der raftständigen Placenta alkalinen Phosphatase (PLAP) und resultiert in einer stark erhöhten amyloidogenen Prozessierung (Eehalt et al., 2003). Ebenso bewirkt die genetische Kopplung von BACE mit einem GPI-Anker eine verstärkte Rekrutierung des Enzyms in die Raft-Domänen und führt zu einem signifikanten Anstieg der Abeta-Produktion (Cordy et al., 2003). Das gleiche gilt für erhöhte Spiegel der Raftkomponenten Cholesterin und GM-1 Gangliosid. Nach der Beladung von Plasmamembranen mit Cholesterin konnte zudem eine verstärkte Raft-Rekrutierung von APP und BACE beobachtet werden (Gamerdinger et al., 2007). Der gleiche Effekt wird jedoch cholesterinunabhängig durch Celecoxib und Fenofibrate erreicht (Gamerdinger et al., 2007). In keiner der beschriebenen Arbeiten konnte eine veränderte Aktivität der β -Sekretase detektiert werden, was ebenfalls dafür spricht, dass die Kolokalisation von Enzym und Substrat das Prozessierungsmuster bestimmt.

Gemäß dem Modell der Raft-Assemblierung bringt der Zusammenschluss einzelner Lipid Rafts Interaktionspartner aus verschiedenen Domänen in enge Nachbarschaft und ermöglicht so deren kontrollierte Funktionalität (Simons et al., 1998). Etliche Daten bestätigen den vollständigen Integritätsverlust der Lipid Raft Strukturen in Folge von Cholesterindepletion (Simons und Toomre et al., 2000). Der Effekt konnte sowohl durch Statin-Behandlung, als auch durch den Entzug von Cholesterin via M β CD erzielt werden.

Cholesterin- und Raftfärbungen der vorliegenden Arbeit unterstützen diesen Befund. Die Behandlung mit Lovastatin führt konzentrationsabhängig zu einer Abschwächung der Filipin-Fluoreszenz und gleichzeitig zu einer zunehmend diffusen Verteilung von GM-1. Damit wird die Integrität der Lipid Rafts durch den Entzug von Cholesterin weitestgehend aufgelöst, was eine Reduktion der amyloidogenen Prozessierung bewirkt.

Die Färbungen zeigen zusätzlich, dass auch Benzyl Alkohol zu einer starken Störung der Raft-Integrität führt, was in einer weitläufigen Lokalisation von Cholesterin und GM-1 innerhalb der Membran resultiert. Die Menge der beiden Membranlipide bleibt dabei unverändert, lediglich die Verteilung wird durch die fluidisierende Wirkung von Benzyl Alkohol variiert. Die detektierte Zunahme der Membranfluidität kann daher partiell mit dem Verlust an geordneten, starren Lipid Raft Fraktionen begründet werden. Basierend auf diesem Befund lässt sich auch die verminderte amyloidogene Prozessierung auf die fehlende Integrität von Lipid Rafts zurückführen. Parallel dazu führt die Behandlung mit Benzyl Alkohol zu einem erhöhten Anteil an nicht-Raft Strukturen und damit zu einem Umfeld, das die Aktivität der α -Sekretase stimuliert. Zusätzlich kommt es eventuell zu einem erhöhten Substratangebot, da APP aus den beschädigten Rafts rausgelöst wird.

Pluronic F68 dagegen stabilisiert die Raftstrukturen und bewirkt eine kondensierte Lokalisierung von Cholesterin und GM-1. Vor allem die Färbung von GM-1 zeigt nach der Behandlung mit Pluronic F68 ein konzentriertes Fluoreszenzsignal. Die Filipin-Färbung bestätigt wiederum, dass die Behandlung zu keiner Reduktion von Cholesterin führt. Der resultierende Anstieg der amyloidogenen Prozessierung spricht dafür, dass die kondensierte Zusammenlagerung von Lipid Rafts unabhängig vom Cholesterin zu erhöhten APP-BACE Kontakten führt. Die hohe Ordnung der Membran infolge der Raft-Kondensation scheint die Aktivität der α -Sekretase zu behindern. Möglicherweise kommt es zu einer Fraktionierung der nicht-Raft Bereiche und so zu verminderten Kontakten zwischen APP und α -Sekretase. Es kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden, dass die APP-Verteilung durch die Behandlung mit Benzyl Alkohol und Pluronic F68 verändert wird.

Die Daten sprechen daher für eine Raft-gekoppelte amyloidogene APP-Prozessierung, bei der zum einen die Integrität und zum anderen die Assemblierung von Rafts die β -Sekretase Aktivität begünstigt.

Zusammengenommen ergibt sich hypothetisch folgendes Szenario: APP und BACE wechseln, möglicherweise in Folge von Dimerisierung, zwischen einer Raft-ständigen und einer Raft-unabhängigen Fraktion. Die Assoziation beider Proteine mit Lipid Rafts stellt den initiativ notwendigen, jedoch allein nicht hinreichenden Schritt zur amyloidogenen Prozessierung dar (Ehehalt et al., 2003). Die geringe Proteindichte einzelner Rafts macht es statistisch unwahrscheinlich, dass Enzym und Substrat innerhalb einer Domäne aufeinander treffen. Erst die Assemblierung mehrerer Rafts führt zum Kontakt von APP und BACE und ermöglicht die Prozessierung. Der Zusammenschluss einzelner Rafts kann durch externe Stimuli oder aber durch endozytotische Einschlüsse initiiert werden. Die vorliegenden Daten zeigen zudem, dass die Einlagerung von Pluronic F68 zur Kondensation von Lipid Rafts führt. Umgekehrt bewirkt die Störung der Raft-Integrität im Zuge von Cholesterinentzug oder Benzyl Alkohol-Einfluss eine verminderte amyloidogene Prozessierung. Einhergehend kommt es zu einer erhöhten Substratzugänglichkeit für die α -Sekretase, möglicherweise da APP verstärkt in der Raft-unabhängigen Fraktion vorliegt.

Das Modell steht im Gegensatz zu der Arbeit von Abad-Rodriguez (Abad-Rodriguez et al., 2004). Die Gruppe konnte zeigen, dass die γ -Sekretase und BACE in primären Hippocampus Neuronen in Assoziation mit Detergenz resistenten Membranfraktionen (DRMs) vorliegen, während APP ausschließlich außerhalb dieser Domänen lokalisiert ist. Die Arbeit postuliert ein Modell, in dem die Lipidzusammensetzung der Membran eine Barriere zwischen Enzym und Substrat bildet. Die unterschiedliche Lokalisation sorgt dafür, dass APP unter physiologischen Bedingungen nur reguliert mit den prozessierenden Sekretasen in Kontakt kommt. Im Zuge einer moderaten Cholesterinreduktion konnte ein signifikanter Anstieg der amyloidogenen Prozessierung detektiert werden, der durch ein partielles Auflösen der Barriere und der daraus resultierenden verstärkten Enzym-Substrat Zugänglichkeit erklärt wurde. Der Effekt konnte durch Wiederbeladung der Membran mit Cholesterin umgekehrt werden. Eine drastische Cholesterinreduktion hingegen führt auch in primären Hippocampus Neuronen zu einer verminderten Generierung von A β , was auf eine Inhibition der Sekretasen aufgrund der starken Störung der Integrität der DRMs zurückgeführt wurde.

Die Daten von Rodriguez et al. stehen im Widerspruch zu einer Vielzahl von Arbeiten, in denen APP in Assoziation mit Lipid Rafts detektiert werden konnte und die Reduktion von Cholesterin konzentrationsabhängig zu einer verminderten Abeta-Bildung führt (Simons et al., 1998; Bouillot et al., 1996; Riddell et al., 2001; Kojro et al., 2001; Eehalt et al., 2003; Fassbender et al., 2001; Chauhan et al., 2004). Erklärend führt die Gruppe an, dass in der Mehrzahl der Studien transfizierte Zell-Linien verwendet wurden und dass die resultierende Überexpression von APP zu einer unphysiologischen Mislokalisierung innerhalb von Lipid Rafts führt. Gleichzeitig entkräften die Ergebnisse der Arbeit selbst das Argument, da die transiente Transfektion mit APP zu keiner veränderten Lokalisation führt. Kojro et al. zeigen zudem in APP-untransfizierten HEK-Zellen eine Statin-induzierte Reduktion an Cholesterin und Abeta (Kojro et al., 2001). Insgesamt bergen Transfektionen stets das Risiko einer unphysiologischen Änderung im Gesamtsystem. Die Vielzahl der bisher publizierten Daten deutet aber darauf hin, dass die Überexpression von APP zu keinen grundlegenden Veränderungen in der Prozessierung führt.

	Freies Cholesterin	Membranfluidität	Raft-Integrität	Abeta / C99	APP α / C83
Lovastatin	↓	↑	↓	↓	↑
Benzyl Alkohol	↔	↑	↓	↓	↑
Pluronic F68	↔	↓	↑	↑	↓

Tabelle 7 Effekte von Lovastatin, Benzyl Alkohol und Pluronic F68

Die Behandlungen mit Benzyl Alkohol und Pluronic F68 bewirken starke Veränderungen in der Zellphysiologie, die sicherlich in eine Vielzahl anderer zellulärer Prozesse eingreifen. Beide Modulatoren haben daher primär Modellfunktion, um bestimmte Effekte selektiv untersuchen zu können. Das gleiche gilt für die vielfach publizierten unphysiologischen Konzentrationen an Statinen, die zu Cholesterinreduktionen von bis zu 70% führen. Im Zuge dieser Arbeit wurde daher mit einer physiologischen Maximalreduktion von 20% des Gesamtcholesterins gearbeitet. Zusammengenommen zeichnen die Effekte der eingesetzten Substanzen jedoch ein klares Bild, in dem die Assemblierung von Lipid Rafts die Amyloidogenese stimuliert (Tabelle 7).

5.4. Abeta als selbstverstärkendes Produkt der amyloidogenen APP-Prozessierung

Abeta selbst bindet in aggregierter Form an die Plasmamembran, was zu Störungen der Integrität und Funktionalität führt (Eckert et al., 2003). Etliche neurotoxische Induktionen konnten in Zusammenhang mit der membranären Interkalation von Abeta gebracht werden (reviewed in Hardy und Selkoe, 2002; Soto et al., 2003; Roberson et al., 2006). Vorhergehende Arbeiten zeigen auch, dass die Bindung von Abeta an die Membran zu einer Reduktion der Fluidität führt (Müller et al., 1994; Eckert et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt von fibrillärem und oligomerem Abeta auf die Membranfluidität in der lebenden Zelle untersucht. In Übereinstimmung mit den zuvor beschriebenen Ergebnissen führen beide Amyloid-Strukturen zu einer starrerem Membran. Weiterführend konnte im Zuge dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Abeta-induzierte Reduktion der Fluidität ebenfalls eine verstärkte amyloidogene Prozessierung von APP bewirkt. Damit verstärkt oder beschleunigt Abeta die eigene Produktion. Der Effekt war sowohl in Bezug auf die Membranfluidität, als auch auf die Abeta-Bildung mit oligomerem Abeta deutlich stärker ausgeprägt, als mit fibrillärem Abeta. Die Oligomere zeigen zudem ein höheres zytotoxisches Potential als die Fibrillen.

Der Befund bestätigt die Ergebnisse anderer Arbeiten, die darauf hindeuten, dass oligomere Abeta-Strukturen statt Fibrillen vornehmlich für die beobachtete Neurotoxizität verantwortlich sind (Hsia et al., 1999; Moechars et al., 1999; Walsh et al., 2002).

Abeta Oligomere sind im Vergleich zu Fibrillen klein und löslich genug, um durch das Parenchyma zu diffundieren und zu synaptische Strukturen zu gelangen (Lambert et al., 1998; Kamenetz et al., 2003). Eine Reihe von unabhängigen Arbeiten zeigt, dass Reduktionen des synaptischen Langzeit Potentials und veränderte Gedächtnisfunktionen direkt auf die Interaktion von definierten löslichen Abeta-Strukturen mit der Membran zurückzuführen sind, ohne Einfluss von Fibrillen, Protofibrillen oder Plaques (Hsia et al., 1999; Moechars et al., 1999; Walsh et al., 2002). Der biochemische Mechanismus über den Abeta Oligomere an synaptische Plasmamembranen binden und das komplexe Zusammenspiel von Rezeptoren, Kanalproteinen und Signaltransduktionswegen stören ist bislang nicht bekannt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten ebenfalls darauf hin, dass Abeta-Oligomere stärker mit der Membran interagieren als Abeta-Fibrillen. Die daraus resultierende Reduktion der Membranfluidität ist möglicherweise ein wichtiger Faktor für eine Vielzahl von Abeta-induzierten neurotoxischen Effekten.

Etliche Studien belegen, dass die Spiegel an löslichen (oligomeren) Abeta-Strukturen besser mit bestehenden kognitiven Defiziten korrelieren, als die Plaquedichte (Naslund et al., 2000; Lue et al., 1999; McLean et al., 1999; Wang et al., 1999). Fibrilläre Plaques mit einem Durchmesser von 20-120µm bieten weniger Abeta-Oberfläche für die Interaktion mit neuronalen Membranen als eine Vielzahl von kleineren Oligomeren, die beispielsweise in den synaptischen Spalt diffundieren können (reviewed in Haass und Selkoe, 2007). Dagegen spricht der initiale Befund, dass große Plaques aus fibrillärem Abeta im Gehirn von Alzheimer Patienten typischerweise von dystrophen Neuronen umgeben sind, was darauf hindeutet, dass die unlöslichen Aggregate Neurotoxizität induzieren (Haass und Selkoe, 2007). Fibrilläre Abeta Ablagerungen konnten auch mit lokalen synaptischen Störungen und dem Ausfall neuronaler Prozesse assoziiert werden (Tsai et al., 2004). Allerdings liegen große Protein-Aggregate zumeist eng umgeben von kleineren löslichen Assemblierungen wie beispielsweise Oligomere vor. Daher ist es schwierig, die beobachteten Effekte ausschließlich den fibrillären Aggregaten zuzuordnen (Haass und Selkoe, 2007).

Die vorliegende Arbeit bestätigt nicht nur, dass Abeta mit der Membran interagiert und deren physikalisch-chemische Eigenschaften beeinflusst, sondern zeigt auch, dass Abeta konzentrationsabhängig die amyloidogene Prozessierung stimuliert. Die Inkubation mit oligomerem Abeta bewirkt neben einer signifikanten Zunahme an endogenem Abeta, auch erhöhte Spiegel an membranständigem C99. Die löslichen APP-Fragmente der α -Sekretase werden durch die Inkubation mit Abeta nicht beeinflusst. Auch die Aktivität der β -Sekretase und die Spiegel an freiem und Gesamtcholesterin bleiben unverändert. In Übereinstimmung mit den zuvor beschriebenen Ergebnissen der Arbeit korreliert wiederum die cholesterinunabhängige Abnahme der Membranfluidität mit einer erhöhten amyloidogenen Prozessierung.

Die Beeinflussung der Membranfluidität durch Interaktionen mit Abeta konnte anhand von transfizierten und untransfizierten HEK293-Zellen bestätigt werden. Zunächst wurde die basale Sekretionsrate von untransfizierten (HEK-ut), Wildtyp-APP transfizierten (HEK-wt) und swedish-APP transfizierten (HEK-sw) Zellen verglichen. Aufgrund der schwedischen Mutation im APP produzieren HEK-sw Zellen mehr Abeta als HEK-wt Zellen. In den untransfizierten HEK-Zellen liegen die basalen Abeta-Spiegel nur knapp über der Nachweisgrenze der verwendeten ELISA-Kits. Der Vergleich der basalen Membranfluidität zeigt ebenfalls deutliche Unterschiede in den drei Zellmodellen. Analog zu den Abeta-Spiegeln weisen HEK-ut Zellen die höchste und HEK-sw Zellen die niedrigste Membranfluidität auf. Damit korrelieren in den verwendeten Modellen die basalen Spiegel an sezerniertem Abeta mit der Membranfluidität.

Die Daten unterstreichen die Konzentrationsabhängigkeit des Abeta-Effektes auf die Membranfluidität und zeigen, dass auch zellulär gebildetes, und nicht nur hohe Konzentrationen an extern zugegebenem Abeta, mit der Membran interagiert und deren Fluidität herabsetzt. Die Kapazität der Interaktion scheint limitiert zu sein, da die zusätzliche Inkubation mit aggregiertem Abeta nur in HEK-ut und HEK-wt Zellen, nicht aber in HEK-sw Zellen eine weitere Abnahme der Membranfluidität induziert.

Basierend auf diesem Befund wurde überprüft, ob der Abeta-Effekt auf die Membran reversibel ist und die Fluidität durch Entzug von Abeta regeneriert werden kann. Die Behandlung mit dem γ -Sekretase Inhibitor DAPT unterbindet die Freisetzung von Abeta, ohne die Prozessierung der β -Sekretase zu beeinflussen. Nach mehreren Passagen mit konstanter DAPT-Inkubation konnte eine HEK-wt Zellpopulation generiert werden, die trotz Überproduktion von APP nahezu keinen Abeta-Interaktionen ausgesetzt war. Die behandelten Zellen zeigen eine signifikant erhöhte Membranfluidität auf dem Niveau von HEK-ut Zellen, die mit einem starken Anstieg der nicht-amyloidogenen Prozessierung durch die α -Sekretase einherging. Damit konnte in proliferierenden Zellen die Membranfluidität durch verhinderte Sekretion von Abeta regeneriert werden. Die Aktivität der β -Sekretase wurde durch die Behandlung nicht beeinflusst. Es konnte jedoch keine Aussage über die Prozessierungsrate des Enzyms getroffen werden, da die Freisetzung von Abeta durch DAPT unterbunden wurde und C99 nicht detektiert werden konnte. Die verstärkte nicht-amyloidogene Prozessierung spricht wiederum dafür, dass eine erhöhte Membranfluidität die Aktivität der α -Sekretase stimuliert.

Die Behandlung mit DAPT zeigt, dass in proliferierenden Zellen der Abeta-Effekt auf die Membranfluidität umkehrbar ist. Dies gilt vorerst allerdings ausschließlich für Zellen, die einer hohen Proliferationsrate unterliegen, da nur die Freisetzung von zusätzlichem Abeta verhindert wird, ohne bereits gebundenes Abeta zu entfernen. Der Befund unterstützt die Relevanz von potentiellen Abeta-Immunisierungen durch entweder aktive Impfung oder passive Infusion von Abeta-Antikörpern. Aktive oder passive Immunisierung führt theoretisch zu einer erhöhten Abeta-Clearance via Phagozytose und / oder einem gesteigerten Efflux aus dem Gehirn (Gelinas et al., 2004). Die aktive Immunisierung mit aggregiertem Abeta₍₁₋₄₂₎ (AN1792; Elan Pharmaceuticals / Weyth Pharmaceuticals) führt in APP-transgenen Mäusen zu einer reduzierten Amyloid-Pathologie (Schenk et al., 1999; Janus et al., 2000; Morgan et al., 2000). Eine klinische Studie mit AN1792 musste jedoch abgebrochen werden, da 6% der Patienten eine Autoimmun-Meningoenzephalitis entwickelten (Gilman et al., 2005; Orgogozo et al., 2003; Robinson et al., 2004).

Ein alternativer immunotherapeutischer Ansatz ist die passive Infusion von monoklonalen Abeta-Antikörpern. Derzeit befindet sich dazu eine klinische Studie mit dem Antikörper AAB-001 (Elan Pharmaceuticals / Weyth Pharmaceuticals) in Phase 2 (reviewed in Haass und Selkoe, 2007). Insgesamt stellen Immuntherapien in der Alzheimer Demenz einen vielversprechenden Ansatz dar (Christiansen, 2007). Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen dazu, dass die Membranregeneration durch die Behandlung mit DAPT nicht nur die akute Störung der Membranintegrität aufhebt, sondern zusätzlich auch den selbstverstärkenden Mechanismus der Abeta-Produktion durchbricht.

Bislang konnten keine γ -Sekretase Inhibitoren zur medikamentösen Behandlung der Alzheimer Demenz zugelassen werden. Hauptgrund hierfür ist, dass die γ -Sekretase mehrere biologisch essentielle Substrate wie beispielsweise Notch aufweist (Pollack et al., 2005). Experimente an transgenen Mäusen zeigen, dass die Administration von γ -Sekretase Inhibitoren zwar zu einer dosisabhängigen Reduktion von Abeta führt, gleichzeitig aber auch die Differenzierung von Lymphozyten stört und Veränderungen in der Struktur von intestinalen Zellen bewirkt (Wong et al., 2004). Klinische Studien mit dem γ -Sekretase Inhibitor LY450139 (Eli Lilly) zeigten keine signifikanten Unterschiede in den CSF-Abeta Spiegeln im Vergleich zur Placebo-Gruppe (Siemers et al., 2006). Vielversprechend ist hingegen der Ansatz von SALAs (*selective Abeta₍₁₋₄₂₎ lowering agents*). Ähnlich der Substanzgruppe der NSAIDs führen SALAs zu einer Modulation der γ -Sekretase, die die amyloidogene Prozessierung weg von Abeta₍₁₋₄₂₎ und hin zu kürzeren, weniger toxischen Abeta-Fragmenten kanalisiert, ohne die Interaktion mit anderen Substraten wie Notch zu beeinträchtigen (reviewed in Christiansen, 2007).

Zusammengenommen demonstrieren die Ergebnisse, dass Abeta mit der Membran interagiert. Unabhängig vom Cholesteringehalt der Membran kommt es dabei zu einer Abnahme der Fluidität, die mit einer verstärkten amyloidogenen APP-Prozessierung einhergeht. Widerrum konnten nach der Inkubation keine Veränderungen in der Proteinmenge an APP und in der BACE-Aktivität detektiert werden. Die Interaktion von Abeta mit der Membran scheint daher auf bislang unbekanntem Weg zu einer verstärkten APP-BACE Substratzugänglichkeit zu führen.

5.5. Analyse der Interaktion zwischen Abeta und der Membran

Für eine mechanistische Erklärung rückt die Charakterisierung der Abeta-Membraninteraktion in den Vordergrund. Mit Hilfe von Fluoreszenz Korrelations-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass Abeta spezifisch an ein Zielmolekül in der Membran bindet (Hossain et al., 2007). Aufgrund der Tatsache, dass die Bindung kompetitiv ist, liegt die Vermutung nahe, dass es sich um eine Art Rezeptor handelt. Unabhängig davon konnte gezeigt werden, dass die Bindung durch Zugabe von Trypsin unterbunden werden kann, was darauf hindeutet, dass es sich bei dem Zielmolekül um ein Protein handelt (Bateman et al., 2007). Dagegen sprechen die Daten mehrere Gruppen, in denen gezeigt werden konnte, dass Abeta an die Membranlipide Cholesterin und GM-1 Gangliosid innerhalb von Lipid Rafts bindet (Yanagisawa und Ihara et al., 1998; Ariga et al., 2001; Kakio et al., 2001). Die Arbeit von Bateman et al., demonstriert außerdem, dass die Bindung vom Aggregationszustand der Abeta Peptide abhängt. Mutationen, die die Aggregation verhindern, inhibieren gleichzeitig die Anlagerung der Peptide an die Membran. Hohe Konzentrationen an membrangebundenem Abeta bewirken eine Verlagerung von der α -helikalen Struktur der Peptide hin zur β -Faltblattkonformation und erleichtern so die Fibrillenbildung (Kakio et al., 2001). Die Beobachtung, dass speziell Abeta-Dimere im transgenen Alzheimer-Mausmodell vorzugsweise mit Lipid Rafts assoziieren, spricht für eine Rolle der Raftdomänen im frühen Stadium der Abeta-Aggregation (Kawarabayashi et al., 2004). Weiterführende Arbeiten zeigen, dass speziell die Bindung von Abeta an GM-1 Gangliosid zu einer konformationellen Änderung der Peptidstruktur führt, die mit einer starken Aggregationstendenz einhergeht (Yanagisawa et al., 1997, Hayashi et al., 2004). Abeta bindet dabei nicht an einzelne GM-1-Moleküle, sondern an Gangliosidcluster (Kakio et al., 2001; Matsuzaki et al., 2004). Durch die erhöhte Aggregationstendenz des gebundenen Abetas wirkt der Komplex möglicherweise wie ein Aggregationskeim, der lösliche Abetastrukturen anzieht und bindet (Naiki et al., 1999).

Im Zuge dieser Arbeit wurde die Bindung mit Hilfe von Fluorescein-gekoppeltem Abeta untersucht. Gleichzeitig wurden Cholesterin und GM-1 über Fluoreszenzfärbung visualisiert. In Übereinstimmung mit den zuvor beschriebenen Arbeiten konnte eine ausgeprägte Kollokalisierung von Abeta mit beiden Membranlipiden detektiert werden. Das Ergebnis bestätigt die spezifische Bindung von Abeta an Lipid Raft Domänen. Die Kollokalisierung mit GM-1 liegt bei nahezu 100%, was ebenfalls auf das Gangliosid als hochaffinen Bindungspartner hinweist.

Der Komplex von GM-1 und Abeta (G-Abeta) konnte bereits mittels immunohistochemischen und -Präzipitationsmethoden im Gehirn nachgewiesen werden (Hayashi et al., 2004). Bislang konnte G-Abeta jedoch nur in Verbindung mit Abeta-Ablagerungen detektiert werden, während Hirnproben ohne Plaques und Fibrillen keine Gangliosid-Komplexe aufwiesen (Yanagisawa et al., 1997). G-Abeta zeigt neben der erhöhten Aggregationstendenz selbst auch schädigende Effekte. Zum einen wurde die Membran durch hohe Konzentrationen an G-Abeta in ihrer Struktur stark beschädigt (McLaurin und Chakrabartty, 1996), zum anderen führt der Komplex zu Veränderungen in der Transbilayer Organisation (Matsuzaki und Horikiri, 1999).

Die Befunde werfen die Frage auf, welche Faktoren zur Bildung von GM-1 Gangliosidclustern und damit zur Generierung einer hochaffinen Bindungsstelle von Abeta führen. Kakio et al. zeigen, dass die Formation von G-Abeta cholesterinabhängig stattfindet, da die Anreicherung mit Cholesterin in Modell-Membranen zur beschleunigten Bildung von GM-1 Clustern führt (Kakio et al., 2001). Auch die Arbeit von Matsuzaki et al. zeigt, dass in cerebralen Cortex-Membranliposomen die Formation der Cluster und damit der Abeta-Komplexe durch einen hohen Cholesteringehalt beschleunigt wird (Matsuzaki et al., 2004). Die Reduktion von Cholesterin führt außerdem zu einer deutlichen Abnahme von Abeta-Aggregaten (Schneider et al., 2007). Erhöhte Cholesterinspiegel hingegen beschleunigen die Fibrillenbildung (Yip et al., 2001).

In vitro Experimente zeigen zudem, dass besonders oxidierte Cholesterinmetabolite die Aggregation forcieren (Bieschke et al., 2005). Mehrere Arbeiten bestätigen eine unlösliche Abeta-Fraktion nach Solubilisierung der Zellen mit starken Lösungsmitteln, was die Assoziation der Peptide mit lipid Rafts bestätigt (Lee et al., 1998; Morishima-Kawashima und Ihara, 1998; Skovronsky et al., 1998). Auch diese Fraktion ist stark vom Cholesteringehalt abhängig und verschwindet bereits bei schwacher Cholesterinreduktion (Schneider et al., 2007). Zusammen deuten die Befunde auf eine essentielle Rolle von Cholesterin in Bezug auf die Cluster-Bildung von GM-1 hin und zeigen einen konkreten Aspekt für die Wirkungsweise von Lovastatin auf.

Die Daten der vorliegenden Arbeit belegen, dass die Behandlung mit Pluronic F68 zu einer massiven Kondensation von GM-1 führt. Damit bewirkt Pluronic F68 einerseits die Assemblierung von Lipid Rafts, was zu einer erhöhten Zugänglichkeit von BACE und APP führt, andererseits schafft die Zusammenlagerung von GM-1 vermehrt Bindungspartner für Abeta, was in einer zusätzlichen Stimulation der amyloidogenen Prozessierung resultiert. Umgekehrt bewirkt Benzyl Alkohol eine diffuse Verteilung des Gangliosids und verhindert so die Zusammenlagerung von Lipid Rafts und die Bildung von GM-1-Clustern (Abbildung 96). Beide Effekte sind unabhängig vom Cholesteringehalt, ahmen jedoch, bezogen auf die Membranfluidität, den Zustand einer cholesterinbeladenen (Pluronic F68) und einer cholesterinreduzierten (Benzyl Alkohol) Membran nach. Wie zuvor beschrieben scheint auch der Cholesteringehalt der Membran die Assemblierung von Lipid Rafts und die Bildung von GM-1 Clustern zu modulieren. Pluronic F68 und Benzyl Alkohol können daher als Modellsubstanzen betrachtet werden, die die physiologische Rolle des Cholesterins als funktionelles Strukturelement der Membran imitieren.

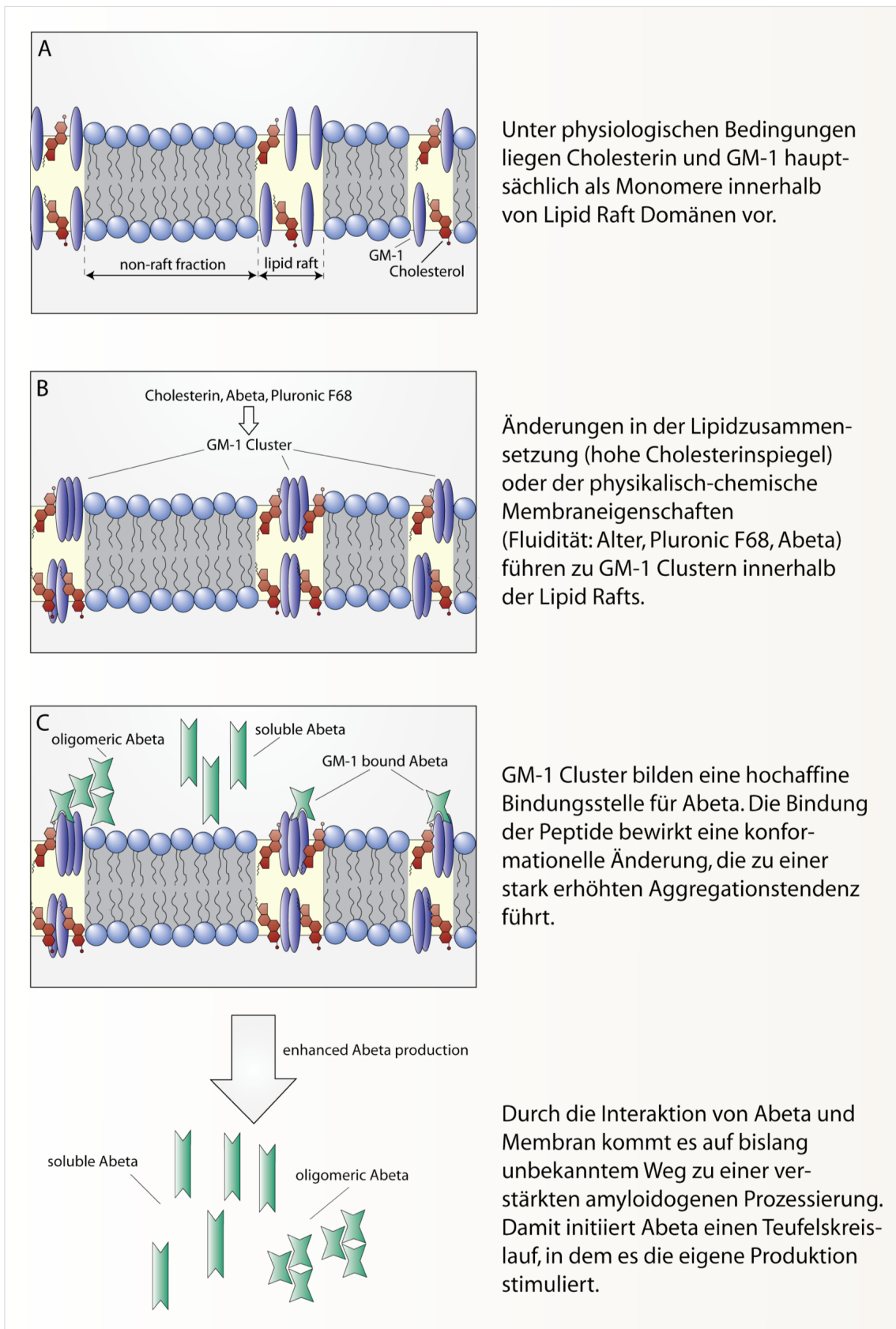
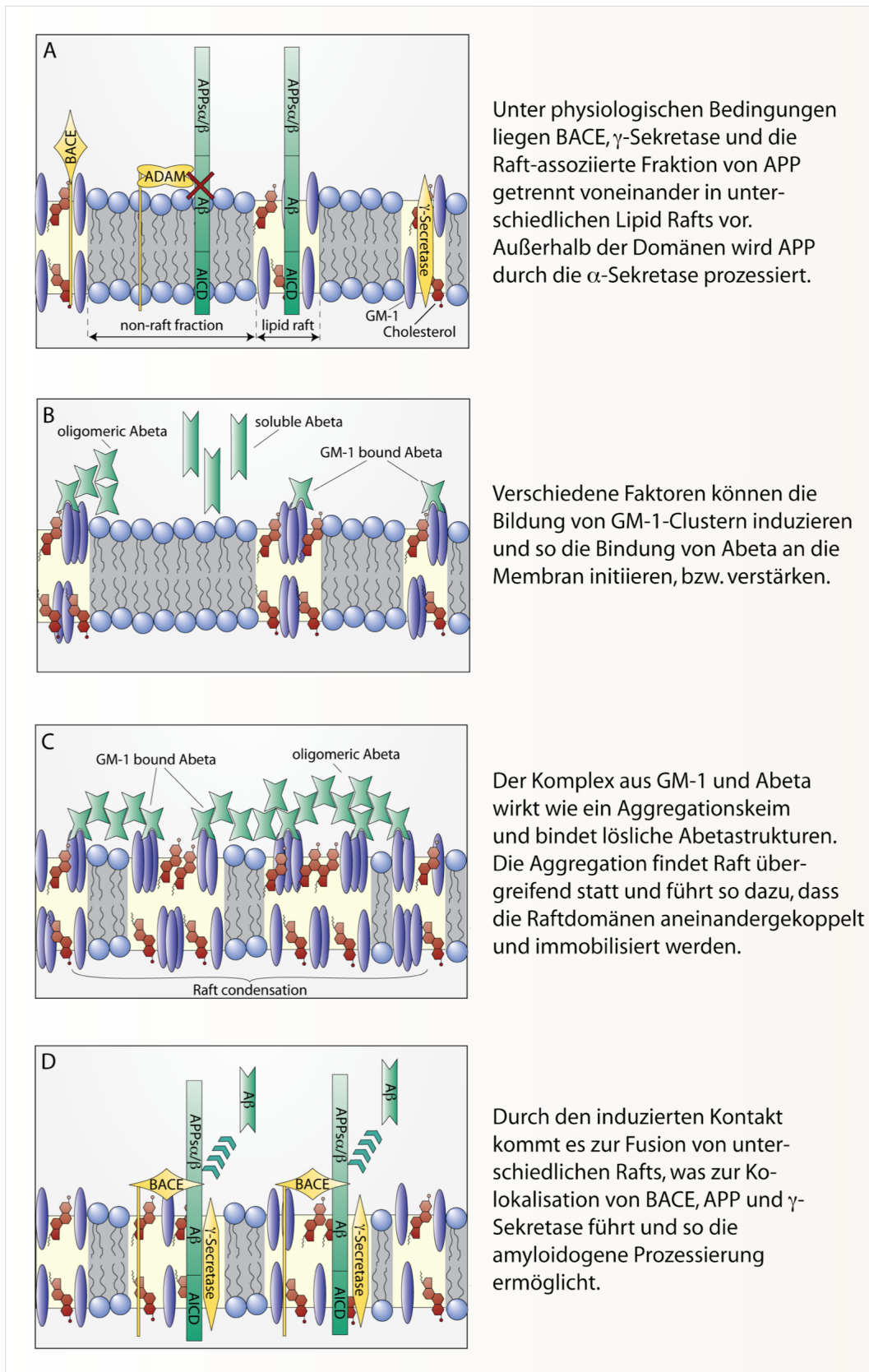


Abbildung 96 Modell der GM-1-Cluster Bildung

Unter physiologischen Bedingungen scheint Abeta in geringer Konzentration als normales Stoffwechselprodukt gebildet und von der Zelloberfläche sezerniert zu werden, um potentielle biologische Funktionen zu erfüllen. Prozesse im Zuge des Alterns, wie veränderte Membraneigenschaften oder verminderte Enzymaktivitäten, führen möglicherweise dazu, dass a) Abeta nicht mehr effizient sezerniert wird und daher an der Membran bindet oder b) dass der Abbau von Abeta gestört ist, so dass es zu Akkumulationen von löslichen Strukturen kommt. Die Daten der vorliegenden Arbeit postulieren, dass die Bindung von Abeta einem selbstverstärkenden Prozess und so den Beginn der AD-relevanten Amyloid-Kaskade initiieren könnte.

5.6. Abeta-Aggregation führt zur Assemblierung von Lipid Rafts

Offen bleibt bislang die Frage, wie ein erhöhtes Maß an Membranbindung und die daraus resultierende beschleunigte Aggregation zu einer verstärkten amyloidogenen Prozessierung führt. Basierend auf den beschriebenen Quervernetzungsexperimenten von Eehalt et al. ist folgender Mechanismus denkbar: lösliche Abeta Oligomere, Monomere oder Profibrillen binden mit hoher Affinität an GM-1 Gangliosidcluster in den Raft-Strukturen der Membran. Die Bindung ist an die Integrität der Rafts gekoppelt und somit indirekt vom Cholesterin abhängig, da die Depletion den Zusammenhalt der Domänen auflöst. Zusätzlich führt eine geringe Membranfluidität, beispielsweise aufgrund hoher Cholesterinspiegel zu einer verstärkten Gangliosidcluster-Bildung. GM-1 gebundenes Abeta weist eine signifikant stärkere Aggregationstendenz auf als ungebundenes Abeta und agiert wie ein membranständiger Aggregationskeim, der lösliche Abeta-Strukturen anzieht und bindet. Es bildet sich ein Netzwerk aus aggregiertem Abeta aus, das über einzelne Raft-Domänen hinausreicht. Durch den Zusammenschluss von Aggregaten unterschiedlicher Ausgangsrafts entsteht eine Quervernetzung, die die Rafts aneinander bindet und immobilisiert. Auf diesem Wege wird eine Assemblierung, ähnlich wie nach der Antikörper-induzierten Vernetzung (Eehalt et al., 2003) erreicht, die ebenfalls zu einer erhöhten Zugänglichkeit von APP und BACE führt und folglich in einer stärkeren amyloidogenen Prozessierung resultiert (Abbildung 97).



Unter physiologischen Bedingungen liegen BACE, γ -Sekretase und die Raft-assoziierte Fraktion von APP getrennt voneinander in unterschiedlichen Lipid Rafts vor. Außerhalb der Domänen wird APP durch die α -Sekretase prozessiert.

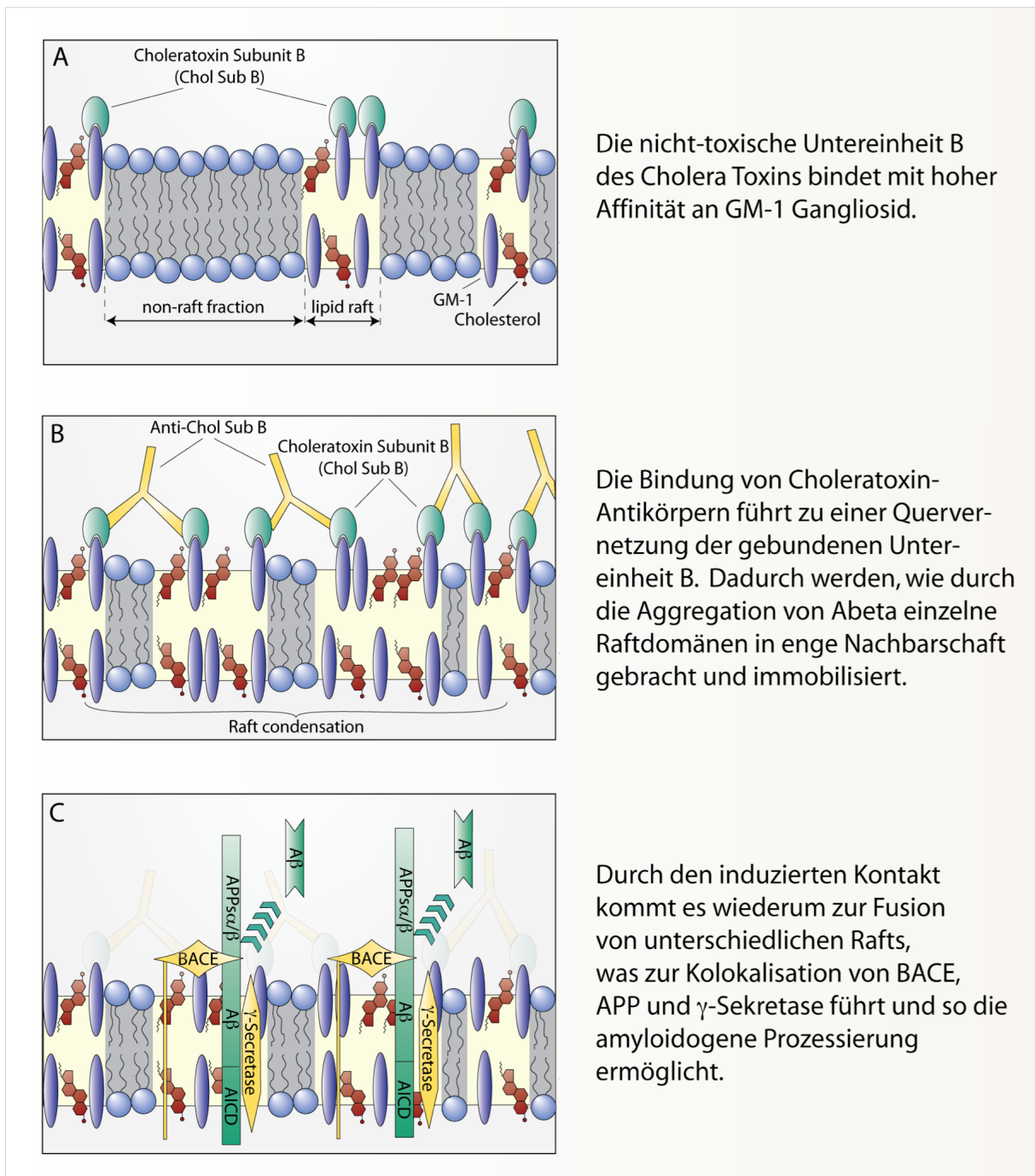
Verschiedene Faktoren können die Bildung von GM-1-Clustern induzieren und so die Bindung von Abeta an die Membran initiieren, bzw. verstärken.

Der Komplex aus GM-1 und Abeta wirkt wie ein Aggregationskeim und bindet lösliche Abetastrukturen. Die Aggregation findet Raft übergreifend statt und führt so dazu, dass die Raftdomänen aneinandergelockt und immobilisiert werden.

Durch den induzierten Kontakt kommt es zur Fusion von unterschiedlichen Rafts, was zur Koklokalisierung von BACE, APP und γ -Sekretase führt und so die amyloidogene Prozessierung ermöglicht.

Abbildung 97 Modell der Abeta-induzierten Quervernetzung von Lipid Rafts

Zur Überprüfung der Hypothese wurde die postulierte A β -induzierte Überbrückung einzelner Rafts durch die GM-1-spezifische Bindung von Cholera-toxin mit anschließender Antikörper Quervernetzung der Toxine simuliert (Abbildung 98). Das Experiment erbringt das gleiche Ergebnis wie die Behandlung mit oligomerem A β und resultiert ebenfalls in einem starken Anstieg der amyloidogenen Prozessierung. Anders als die Behandlung mit A β führt die Quervernetzung zusätzlich zu einer reduzierten nicht-amyloidogenen Spaltung. Der Befund deutet darauf hin, dass entweder APP vermehrt in die Raft-Regionen rekrutiert und somit der α -Sekretase als Substrat entzogen wird, oder aber, dass die Vernetzung der Rafts dazu führt, dass die nicht-Raft-Regionen der Membran fragmentiert werden und so die Zugänglichkeit von APP und α -Sekretase vermindert wird. In Übereinstimmung dazu zeigt die Arbeit von Zha et al., dass die direkte Zugabe von GM-1 im Zellmodell zu einer verstärkten Sekretion von A β und einer verminderten Sekretion von APP α führt (Zha et al., 2004).



Die nicht-toxische Untereinheit B des Cholera Toxins bindet mit hoher Affinität an GM-1 Gangliosid.

Die Bindung von Cholera-toxin-Antikörpern führt zu einer Quervernetzung der gebundenen Untereinheit B. Dadurch werden, wie durch die Aggregation von Abeta einzelne Raftdomänen in enge Nachbarschaft gebracht und immobilisiert.

Durch den induzierten Kontakt kommt es wiederum zur Fusion von unterschiedlichen Rafts, was zur Kolokalisation von BACE, APP und γ -Sekretase führt und so die amyloidogene Prozessierung ermöglicht.

Abbildung 98 Modell der GM-1 Quervernetzung via Cholera-Toxin Bindung

Gemäß dem Modell bindet Abeta einerseits cholesterinabhängig an GM-1, was die Daten von Yanagisawa, Ihara, Ariga und Kakio bestätigt (Yanagisawa und Ihara et al., 1998; Ariga et al., 2001; Kakio et al., 2001), andererseits aber auch kooperativ an bereits komplexiertes Abeta und somit an eine Peptidomäne, was die von Bateman beobachtete Sensitivität gegenüber Trypsin erklärt (Bateman et al., 2007).

Einen anderen Aspekt zur Selbstregulation der Abeta-Produktion liefern die Daten von Kamenetz et al. In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass neuronale elektrische Aktivität eine Stimulation der β -Sekretase bewirkt, was zu einem Anstieg der Abeta-Produktion führt (Kamenetz et al., 2003). Die erhöhten Abeta-Spiegel führen ihrerseits zu einer Abnahme der synaptischen Transmission und damit autoregulatorisch zu einer verminderten Produktion. Dieser Rückkopplungsmechanismus scheint im Zuge der Alzheimer Demenz außer Kraft gesetzt zu werden.

5.7. Neue Aspekte der Amyloid Kaskaden Hypothese

Die Amyloid Kaskaden Hypothese ist das weitläufig anerkannte Modell zur Entwicklung der Alzheimer Demenz (reviewed in Haass und Selkoe, 2007; Standrige, 2006). Die Theorie geht davon aus, dass die Formation von unlöslichen Abeta-Aggregaten den Beginn der Krankheit repräsentiert und im weiteren Verlauf die bekannten Symptome einer Demenz induziert. Auch wenn zunehmend mehr Daten darauf hindeuten, dass lösliche Abeta-Strukturen ein hohes Maß an Neurotoxizität aufweisen, bleibt der kritische Schritt in der Entwicklung der Alzheimer Demenz die beginnende Aggregation von Abeta Peptiden. Mutationen, die die familiäre Form der Erkrankung bedingen, initiieren die frühzeitige Assemblierung entweder über eine erhöhte Produktionsrate, oder aber über konformationelle Änderungen, die zu einer erhöhten Aggregationstendenz der Peptide führen.

Unklar ist, welche Faktoren im Zuge der sporadischen Verlaufsform der Demenz die Aggregation auslösen. *In vitro* erfolgt die Assemblierung der Peptide erst bei hohen mikromolaren Konzentrationen, die in keinem biologischen Milieu wie beispielsweise der Cerebrospinalflüssigkeit erreicht werden (Finder und Glockshuber, 2007). Daher wurde postuliert, dass die Aggregation durch einen Polymerisationskeim ausgelöst wird (reviewed in Haass und Selkoe, 2007). Die Entdeckung und Charakterisierung von GM-1 gebundenem Abeta bestätigte die Hypothese (Yanagisawa et al., 1997). Die vorliegende Arbeit unterstützt diesen Befund und zeigt neue Mechanismen zur Regulation der APP-Prozessierung auf. Sie liefert Hinweise dafür, dass die Bindung von Abeta nicht nur die Aggregation beschleunigt, sondern zusätzlich die Bildung neuer Abeta Peptide stimuliert. Damit wird analog zur Entstehung der FAD sowohl die Produktionsrate, als auch die Aggregationstendenz stimuliert. Der Befund, dass unterschiedliche Modulatoren der Membranfluidität Einfluss auf die Prozessierung haben, fokussiert die Rolle der Lipide als funktionelle Strukturelemente in der Membran und zeigt, dass die Fusion von Lipid Rafts im Zuge von veränderten Membraneigenschaften ein kritisches Ereignis darstellt. Die Ergebnisse bestärken zudem den kaskadenförmigen Verlauf der Demenz und unterstreichen die Wichtigkeit einer frühen Intervention, um den selbstverstärkenden Teufelskreislauf der Abeta-Produktion zu unterbrechen.

5.8. Membranalterung als Risikofaktor der Alzheimer Demenz

Wie zu Beginn dieser Arbeit beschrieben, stellt das Alter den dominantesten und unvermeidbarsten Risikofaktor der Alzheimer Demenz dar. Unvermeidbar vor allem deshalb, weil bislang nicht klar ist, welche Prozesse im Zuge des Alterns Auslöser für die Entwicklung der Demenz darstellen. Aufgrund der Lokalisation von APP und den prozessierenden Sekretasen kommt der Membranalterung besonderes Interesse zu. Im Laufe des Alterungsprozesses kommt es in neuronalen Membranen zu einer deutlichen Anreicherung von Cholesterin, was mit einer zunehmend verminderten Membranfluidität einhergeht (Nagy et al., 1983; Wood et al., 1984; Igbavboa et al., 1996; Eckert et al., 2001). Der Effekt wird durch eine alterungsbedingte Abnahme von ungesättigten Fettsäuren zusätzlich verstärkt (Yehuda et al., 2002).

Des Weiteren kommt es zu einer Umverteilung des Cholesteringehalts innerhalb der beiden Membranblätter, da das zusätzliche Cholesterin hauptsächlich in die exofaciale Seite der Membran eingebaut wird. In synaptosomalen Plasmamembran von alten Mäusen konnte entsprechend fast doppelt so viel Cholesterin detektiert werden, als in jungen Kontrolltieren (Igbavboa et al., 1996). Zusammen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit stellen diese Veränderungen im Zuge des Alterns mögliche Initiatoren der selbstverstärkenden Abeta-Bildung dar.

Neben Cholesterin rücken die Ganglioside immer mehr in den Fokus der experimentellen Untersuchungen der APP-Prozessierung. Tamboli et al. konnten zeigen, dass Ganglioside in den intrazellulären Transport von APP involviert sind und so die Menge des Proteins in der Plasmamembran regulieren (Tamboli et al., 2005). Einige Ganglioside konnten in erhöhtem Maße im Gehirn von Alzheimer Patienten detektiert werden (Cutler et al., 2004). In den Vordergrund tritt dabei vor allem GM-1. In Lipid Rafts aus dem frontalen und temporalen Cortex von AD-Gehirnen konnte ein signifikant höherer Spiegel an GM-1 nachgewiesen werden, als in altersgleichen Kontrollen (Molander-Melin et al., 2005). Aber auch in gesunden Individuen kommt es im Zuge des Alterns zu GM-1 Akkumulationen, die nicht auf eine erhöhte Anzahl oder Größe an Lipid Rafts zurückzuführen sind (Yamamoto et al., 2004). ApoE4 beeinflusst ebenfalls die Menge an GM-1. Interessanterweise führen das Altern zusammen mit ApoE4, und damit die beiden Hauptrisikofaktoren der sporadischen Alzheimer Demenz, kooperativ zu einer beschleunigten Aggregation von Abeta, die auf einen Anstieg der GM-1 Spiegel speziell in Mikrodomänen von neuronalen Membranen zurückzuführen ist (Yamamoto et al., 2004). Die Behandlung von APP-transgenen Mäusen mit GM-1 führte erstaunlicherweise zu einer effizienten Reduktion der Plaquedichte (Matsuoka et al., 2003). Möglicherweise entzieht GM-1 den vorhandenen Plaques Abeta-Moleküle und bindet sie an der Membran.

Die beschriebenen Befunde deuten übereinstimmend darauf hin, dass der physiologische Prozess des Alterns zu Veränderungen in der Lipidzusammensetzung der Membran führt, welche die Bindung von Abeta an die Membran begünstigen können. Gemäß den Daten der vorliegenden Arbeit initiiert die vermehrte Bindung von Abeta einen Teufelskreislauf, in dem die resultierende Aggregation der Peptide zu einer verstärkten amyloidogenen APP-Prozessierung führt und damit die Bildung von Abeta stimuliert (Abbildung 99).

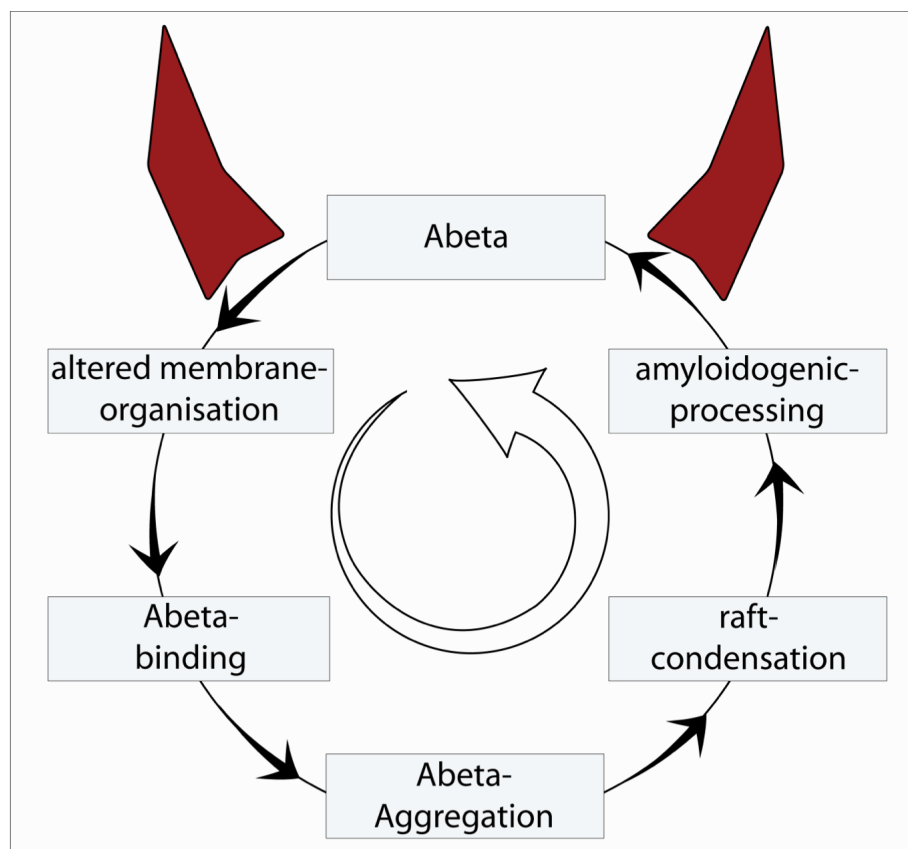


Abbildung 99 Teufelskreislauf der selbstverstärkenden Abeta-Bildung

6. Zusammenfassung

Extrazelluläre Ablagerungen aus aggregierten Abeta-Peptiden stellen das pathologische Hauptmerkmal der Alzheimer Demenz dar. Schrittweise Veränderungen der Gleichgewichtsspiegel an Abeta im Gehirn begründen den Beginn der Amyloid Kaskaden Hypothese, in deren Folge es zu einer vermehrten Bildung und Aggregation von Abeta kommt. Im Zuge dieser Arbeit wurde im Zellmodell untersucht, welche Faktoren die Aggregation und die Bildung von Abeta initiieren bzw. verstärken. Etliche Arbeiten deuten darauf hin, dass der Amyloid-Metabolismus eng mit dem zellulären Cholesteringehalt verknüpft ist. In den hier verwendeten Modellsystemen bestätigte sich dieser Befund, da die Reduktion von Cholesterin durch Lovastatin und selektive Inhibitoren der Cholesterinbiosynthese mit einer signifikanten Abnahme der Abeta-Produktion einherging. Der Statin-Effekt konnte dabei nachweislich auf die Cholesterinreduktion bezogen und gegenüber pleiotropen Isoprenoid-Effekten abgegrenzt werden, da die Inhibition der Isoprenoid-Transferasen FTase und GGTase zu keiner verminderten Abeta-Sekretion führte. Für eine mechanistische Analyse wurde die Rolle des freien Cholesterins als determinierender Faktor der Membranfluidität untersucht. Die APP-Prozessierung ist in der Membran lokalisiert und unterliegt daher dem Einfluss von Cholesterin als Modulator der physikalisch-chemischen Membraneigenschaften. Die Reduktion von Cholesterin bewirkt eine Zunahme der Membranfluidität, während hohe Cholesterinspiegel zu einer starren Membran führen. Beide Zustände wurden unabhängig vom Cholesteringehalt durch den Membranfluidizer Benzyl Alkohol und den Membranrigidizer Pluronic F68 simuliert. Die Zunahme der Membranfluidität nach der Behandlung mit Benzyl Alkohol resultierte in einer signifikant verminderten Abeta-Sekretion. Pluronic F68 hingegen führte cholesterinunabhängig zu einer Abnahme an Membranfluidität, die mit einer verstärkten amyloidogenen APP-Prozessierung einherging. Die Befunde weisen die Membranfluidität explizit als regulatorisches Element der Abeta-Produktion aus. Benzyl Alkohol und Pluronic F68 zeigten außerdem eine starke Beeinflussung der Membranorganisation in Bezug auf die Formation von Lipid Rafts als potentielle Domänen der amyloidogenen APP-Prozessierung. Benzyl Alkohol führte zu einer diffusen Lokalisation von GM-1 und Cholesterin, während Pluronic F68 eine Kondensation der Raftlipide bewirkte.

Abeta selbst interagiert mit der Plasmamembran und stört deren Integrität. Eine Reihe von Daten deutet darauf hin, dass Abeta spezifisch an Komponenten der Lipid Rafts bindet. Die vorliegende Arbeit bestätigt die Kolo-kalisation von GM-1 und Abeta und belegt, dass die Interaktion zu einer Abnahme der Membranfluidität führt. Weiterführend konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Abeta zu einer verstärkten amyloidogenen APP-Prozessierung führt und so einen selbstverstärkenden Mechanismus der Abeta-Produktion initiiert. Der Effekt konnte in proliferierenden Zellen durch langfristige Inhibition der Abeta-Sekretion rückgängig gemacht werden. Anhand der Ergebnisse wurde ein Modell entworfen, in dem die Aggregation von gebundenem Abeta zu einer Vernetzung von Lipid Rafts führt und so die amyloidogene APP-Prozessierung stimuliert. Die Hypothese wurde mit Hilfe von Antikörper-induzierter Quervernetzung von GM-1 überprüft und bestätigt.

Zusammengenommen zeigt die vorliegende Arbeit, dass

- 1.) die Lovastatin-induzierte Abnahme der Abeta-Sekretion in den verwendeten Zellmodellen auf die Reduktion von Cholesterin, bzw. die daraus resultierende Zunahme der Membranfluidität zurückzuführen ist,
- 2.) die Membranfluidität unabhängig vom Cholesteringehalt Einfluss auf die APP-Prozessierung nimmt, wobei eine fluide Membran die nicht-amyloidogene und eine starre Membran die amyloidogene APP-Prozessierung begünstigt,
- 3.) die Vernetzung bzw. Kondensation von Lipid Rafts zu einer verstärkten amyloidogenen Prozessierung führt und
- 4.) Abeta selbst durch Bindung an die Membran diesen Zustand bedingt und damit einen Teufelskreislauf initiiert, in dem es die eigene Produktion stimuliert.

Damit fügt die Arbeit dem Puzzle um die Genesis der sporadischen Form der Alzheimer Demenz einige Stücke hinzu und bietet neue Aspekte für die therapeutische Intervention der Erkrankung an.

7. Anhang

7.1. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1 Morphologie eines gesunden Gehirns (linke Seite) und eines AD-Gehirns (rechte Seite).....	9
Abbildung 2 AD-relevante Mutationen in der APP-Sequenz; die Kodonnummerierung bezieht sich auf das Gesamtgen	14
Abbildung 3 Neurofibrilläre Bündel (linke Seite) und senile Plaques (rechte Seite).....	15
Abbildung 4 Amyloid Kaskaden Hypothese (modifiziert nach Haass und Selkoe, 2006).....	18
Abbildung 5 Prozessierung des Amyloid Precursor Proteins	20
Abbildung 6 Domänenstruktur des Amyloid Precursor Proteins	21
Abbildung 7 Prozessierung durch die γ -Sekretase.....	29
Abbildung 8 Modell der Abeta-Aggregation.....	33
Abbildung 9 Cholesterinbiosynthese.....	37
Abbildung 10 Cholesterinmetabolismus in peripheren Zellen; fCh: freies Cholesterin; eCh: verestertes Cholesterin	41
Abbildung 11 Grundstruktur ausgewählter Statine; Lovastatin und Simvastatin liegen als lipophile <i>prodrugs</i> vor, Pravastatin als hydrophile Hydroxysäure.....	48
Abbildung 12 Angriffspunkte der beschriebenen Inhibitoren in der Cholesterinbiosynthese.....	50
Abbildung 13 Phasenzustände biologischer Membranen	53
Abbildung 14 Struktur von DHA, Benzyl Alkohol und Pluronic F68.....	56
Abbildung 15 Modell der Lipid Raft abhängigen APP-Prozessierung. A) basale Verteilung; B) Verteilung im Zuge der Endozytose	63
Abbildung 16 Angriffspunkte der verwendeten Inhibitoren in der Cholesterinbiosynthese	78
Abbildung 17 Struktur der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe.....	83
Abbildung 18 Prinzip des MTT-Assays.....	86
Abbildung 19 Struktur der verwendeten Fluoreszenzsonden	104
Abbildung 20 Einfluss von Lovastatin auf die Zell-Viabilität in SY5Y-APPwt Zellen. Die Zellen wurden für 48h in OptiMem Medium mit den angegebenen Konzentrationen inkubiert; A) MTT-Assay; B) ToxiLight-Assay. Die gemessenen Absorptionen wurden auf die eingesetzte Zellzahl normiert. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 12 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)	109
Abbildung 21 Einfluss von Lovastatin auf die Zell-Viabilität in HEK293-APPwt Zellen im ToxiLight-Assay. Die Zellen wurden für die Behandlung in UltrosorG-haltigem Medium ohne FCS kultiviert und für 48h mit den angegebenen Konzentrationen an Lovastatin inkubiert. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$).....	109
Abbildung 22 Einfluss von Lovastatin auf den Cholesteringehalt in SY5Y-APPwt (linke Seite) und HEK293-APPwt (rechts Seite) Zellen. Die Zellen wurden für 48h in FCS-freiem Medium mit den angegebenen Konzentrationen inkubiert; untersucht wurde sowohl das freie, unveresterte Cholesterin (A), als auch das Gesamtcholesterin (B) im Zellhomogenat. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6-18 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$).....	110
Abbildung 23 Einfluss von Lovastatin auf den Gehalt an Cholesterin in isolierten SY5Y-APPwt Zellmembranen. Die Zellen wurden für 48h in OptiMem Medium mit den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurden die Plasmamembranen isoliert und der Gehalt an freiem Cholesterin untersucht. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)	111
Abbildung 24 Einfluss von Lovastatin auf den Gehalt an sezerniertem Abeta ₍₁₋₄₀₎ (A, B) und Abeta ₍₁₋₄₂₎ (C) in SY5Y-APPwt (linke Seite) und HEK293-APPwt (rechte Seite) Zellen. Die Zellen wurden für 48h in FCS-freiem Medium mit den angegebenen Konzentrationen an Lovastatin inkubiert. Anschließend wurde das Medium gesammelt und mit PMSF versetzt; die Analyse erfolgte mittels ELISA. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 12 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)	112
Abbildung 25 Einfluss von Lovastatin auf die <i>in vitro</i> Aktivität der β -Sekretase BACE in SY5Y-APPwt und HEK293-APPwt Zellen. Die membranständige β -Sekretase wurde aus den behandelten Zellen extrahiert und die Aktivität gegenüber einem zugegebenen Substrat bestimmt; A) SY5Y-APPwt Zellen; B) HEK293-APPwt Zellen. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$).....	113
Abbildung 26 Angriffspunkte von GGTi 286 und FTi 277. Beide Inhibitoren haben keinen Einfluss auf die Squalen-Synthese, so dass die Bildung von Cholesterin nicht behindert wird.	115
Abbildung 27 Einfluss von GGTi 286 und FTi 277 auf die Zell-Viabilität in SY5Y-APPwt Zellen. Je 100 000 Zellen wurden in einer 96well	

- Platte ausgesät und für 24h mit den angegebenen Konzentrationen inkubiert; A) GGTi 286; B) FTi 277. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 12 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$) 116
- Abbildung 28 Aktivitätsnachweis von GGTi 286 (A) und FTi 277 (B). Die Zellen wurden für 24h mit 1 μ M des jeweiligen Inhibitors inkubiert. Im Anschluss wurden Kontrollen und behandelte Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen versetzt, deren Fluoreszenzsignal durch Prenylierungen verändert wird (Dansyl-GCVLL (A) bzw. Dansyl-GCVLS (B)); der graue Verlauf stellt die Kontrollzellen und der schwarze Verlauf die behandelten Zellen dar..... 118
- Abbildung 29 Einfluss von GGTi 286 und FTi 277 auf den Cholesteringehalt in SY5Y-APPwt Zellen. Die Zellen wurden für 24h mit den angegebenen Konzentrationen inkubiert; untersucht wurde sowohl das freie, unveresterte Cholesterin (A, C), als auch das Gesamtcholesterin (B, D) im Zellhomogenat. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)..... 119
- Abbildung 30 Einfluss von GGTi 286 und FTi 277 auf die Menge an sezerniertem Abeta₍₁₋₄₀₎ in SY5Y-APPwt Zellen. Die Zellen wurden für 24h mit den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Nach der Behandlung wurde das Kulturmedium mittels ELISA analysiert. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$) 120
- Abbildung 31 Einfluss von GGTi 286 und FTi 277 auf die *in vitro* Aktivität der β -Sekretase BACE in SY5Y-APPwt Zellen. Die membranständige β -Sekretase wurde aus den behandelten Zellen extrahiert und die Aktivität gegenüber einem zugegebenen Substrat bestimmt; A) GGTi 286; B) FTi 277. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$) 121
- Abbildung 32 Angriffspunkte von RPR 107393A, BM 15.766 und U 18666A in der Cholesterinbiosynthese. Keiner der verwendeten Inhibitoren beeinflusst die Bildung von Isoprenoid-Vorstufen..... 122
- Abbildung 33 Einfluss von RPR 107393A (A), BM 15.766 (B) und U 18666A (C) auf die MTT-Reduktionsrate in SY5Y-APPwt Zellen. Je 100 000 Zellen wurden in einer 96well Platte ausgesät und für 24h mit den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Die detektierten Werte wurden auf den Proteingehalt der Probe normiert. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)..... 123
- Abbildung 34 Einfluss von RPR 107393A (A), BM 15.766 (B) und U 18666A (C) auf den Cholesteringehalt in SY5Y-APPwt Zellen. Die Zellen wurden für 24h mit den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Untersucht wurde sowohl das freie, unveresterte Cholesterin (linke Seite), als auch das Gesamtcholesterin (rechte Seite) im Zellhomogenat. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$) 125
- Abbildung 35 Einfluss von RPR 107393A (A), BM 15.766 (B) und U 18666A (C) auf die Menge an sezerniertem Abeta₍₁₋₄₀₎ in SY5Y-APPwt Zellen. Die Zellen wurden für 24h mit den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Nach der Behandlung wurde das Kulturmedium mittels ELISA analysiert. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)..... 126
- Abbildung 36 Zusammenfassende Darstellung der Effekte von Lovastatin (A), RPR 107393A (B), BM 15.766 (C) und U18666A (D) auf den Gehalt an freiem Cholesterin, Gesamtcholesterin und sezerniertem Abeta. 127
- Abbildung 37 Einfluss von RPR 107393A (A), BM 15.766 (B) und U 18666A (C) auf die *in vitro* Aktivität der β -Sekretase BACE in SY5Y-APPwt Zellen. Das Enzym wurde aus den behandelten Zellen extrahiert und die Aktivität gegenüber einem zugegebenen Substrat bestimmt. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$) 128
- Abbildung 38 Einfluss von Lovastatin auf die Anisotropie der Plasmamembran von intakten SY5Y-APPwt (A) und HEK293-APPwt (B) Zellen. Nach der Behandlung wurden 700 000 Zellen in HBSS plus TMA-DPH [2 μ M] mittels Fluoreszenz Polarisationspektroskopie vermessen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 9 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$) 130
- Abbildung 39 Korrelation von Membranfluidität und Abeta Produktion. A) SY5Y-APPwt Zellen; B und C) HEK-APPwt Zellen. Die dargestellten Punkte entsprechen den eingesetzten Konzentrationen von 0; 0,1; 1 und 5 μ M Lovastatin..... 131
- Abbildung 40 Einfluss von Lovastatin auf die Menge an APP in SY5Y-APPwt (linke Seite) und HEK293-APPwt (rechte Seite) Zellen. Die Zellen wurden 48h mit Lovastatin inkubiert. Die Analyse erfolgte im Zellhomogenat mit Hilfe des Antikörpers C1/6.1. Die Bandenstärke wurde auf GAPDH als Ladungskontrolle normiert. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit ImageJ und PrismGraph Pad 4.0. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 12 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)..... 132
- Abbildung 41 Einfluss von Lovastatin auf die Sekretion von APP α in SY5Y-APPwt (linke Seite) und HEK293-APPwt (rechte Seite) Zellen. Nach 48stündiger Inkubation wurde das Kulturmedium gesammelt und mit Hilfe des Antikörpers 6E10 analysiert. Die Bandenstärke wurde densitometrisch ausgewertet und auf den zellulären Proteingehalt normiert. Die densitometrische und statistische Analyse erfolgte mit ImageJ und PrismGraph Pad 4.0. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 12 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$) 133
- Abbildung 42 Einfluss von Lovastatin auf den Gehalt an C99 und C83 in SY5Y-APPwt (linke Seite) und HEK293-APPwt (rechte Seite) Zellen. Nach 48 stündiger Inkubation mit Lovastatin wurden die Zellen geerntet und lysiert. Die Analyse des Zellhomogenats erfolgte mit Hilfe des Antikörpers C1/6.1. Zur Normierung wurde die Bandenstärke auf GAPDH als Ladungskontrolle bezogen. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit ImageJ und PrismGraph Pad 4.0. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 12 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$) 134
- Abbildung 43 Einfluss von Benzyl Alkohol auf die Zell-Viabilität in SY5Y-APPwt (links) und HEK293-APPwt (rechts) Zellen; die Zellen wurden 24h lang mit den angegebenen Konzentrationen behandelt; A) MTT-Assay; B) ToxiLight-Assay. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 12 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$) 136

- Abbildung 44 Einfluss von Benzyl Alkohol auf die Anisotropie von isolierten HEK293-APPwt Zellmembranen. Die isolierten Membranen wurden für 20 Minuten mit 10mM Benzyl Alkohol inkubiert und die Anisotropie mittels Fluoreszenz Polarisationspektroskopie bestimmt; A) DPH; B) TMA-DPH. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)..... 137
- Abbildung 45 Einfluss von Benzyl Alkohol auf die Pyren-Fluoreszenz in isolierten HEK293-APPwt Zellmembranen. Die Membranen wurden 20 Minuten mit 10mM Benzyl Alkohol inkubiert. Im Anschluss wurde mittels Fluoreszenz Polarisationspektroskopie die Annular (A) und die Bulk (B) -Fluoreszenz von Pyren bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)..... 138
- Abbildung 46 Einfluss von Benzyl Alkohol auf die Anisotropie der Plasmamembran von intakten SY5Y-APPwt (A) und HEK293-APPwt (B) Zellen. Die Zellen wurden 24h mit 5 bzw. 10mM Benzyl Alkohol behandelt. Im Anschluss wurde die Anisotropie der Membranen mittels TMA-DPH als Fluoreszenz-Sonde bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 9 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)..... 139
- Abbildung 47 Einfluss von Benzyl Alkohol auf den Gehalt an sezerniertem Abeta in SY5Y-APPwt (A) und HEK293-APPwt (B und C) Zellen. Die Zellen wurden 24h mit 1-10mM Benzyl Alkohol behandelt; im Anschluss wurde das Medium mittels ELISA analysiert. Im Kulturmedium von SY5Y-APPwt Zellen konnte kein Abeta₍₁₋₄₂₎ nachgewiesen werden. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 9 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)..... 140
- Abbildung 48 Korrelation von Membranfluidität und Abeta Produktion; A) SY5Y-APPwt Zellen; B und C) HEK293-APPwt Zellen. Dargestellt sind die eingesetzten Konzentrationen von 0; (1); 5 und 10mM Benzyl Alkohol..... 141
- Abbildung 49 Einfluss von Benzyl Alkohol auf die Menge an APP in SY5Y-APPwt (linke Seite) und HEK293-APPwt (rechte Seite) Zellen. Die Zellen wurden 24h mit Benzyl Alkohol inkubiert. Die Analyse erfolgte im Zellhomogenat mit Hilfe des Antikörpers C1/6.1. Die Bandenstärke wurde auf GAPDH als Ladungskontrolle normiert. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit ImageJ und PrismGraph Pad 4.0. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)..... 142
- Abbildung 50 Einfluss von Benzyl Alkohol auf die Sekretion von APPs α in SY5Y-APPwt (linke Seite) und HEK293-APPwt (rechte Seite) Zellen. Nach 24stündiger Behandlung mit Benzyl Alkohol wurde das Kulturmedium gesammelt und mit Hilfe des Antikörpers 6E10 auf den Gehalt an APPs α untersucht. Die Bandenstärke wurde auf den Proteingehalt im Zellhomogenat normiert. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit ImageJ und PrismGraph Pad 4.0. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)..... 143
- Abbildung 51 Einfluss von Benzyl Alkohol auf die Menge an C99 und C83 in SY5Y-APPwt (linke Seite) und HEK293-APPwt (rechte Seite) Zellen. Die Zellen wurden 24h mit Benzyl Alkohol inkubiert. Die Analyse erfolgte im Zellhomogenat mit Hilfe des Antikörpers C1/6.1. Die Bandenstärke wurde auf GAPDH als Ladungskontrolle normiert. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit ImageJ und PrismGraph Pad 4.0. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)..... 144
- Abbildung 52 Einfluss von Benzyl Alkohol auf den Cholesteringehalt in SY5Y-APPwt (linke Seite) und HEK293-APPwt (rechte Seite) Zellen. Die Zellen wurden für 24h mit den angegebenen Konzentrationen an Benzyl Alkohol inkubiert. Untersucht wurde sowohl das freie, unveresterte Cholesterin (A), als auch das Gesamtcholesterin (B) im Zellhomogenat. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)..... 145
- Abbildung 53 Einfluss von Benzyl Alkohol auf die *in vitro* Aktivität der β -Sekretase BACE in SY5Y-APPwt und HEK293-APPwt Zellen. Die membranständige β -Sekretase wurde aus den behandelten Zellen extrahiert und die Aktivität gegenüber einem zugegebenen Substrat bestimmt; A) SY5Y-APPwt Zellen; B) HEK293-APPwt Zellen. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)..... 146
- Abbildung 54 Einfluss von Pluronic F68 auf die Zell-Viabilität in SY5Y-APPwt (linke Seite) und HEK293-APPwt (rechte Seite) Zellen. Die Zellen wurden 24h lang mit den angegebenen Konzentrationen behandelt; A) MTT-Assay; B) ToxiLight-Assay. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)..... 148
- Abbildung 55 Einfluss von Pluronic F68 auf die Anisotropie von isolierten HEK293-APPwt Zellmembranen. Die isolierten Membranen wurden 20 Minuten mit Pluronic F68 inkubiert und die Anisotropie mittels Fluoreszenz Polarisationspektroskopie bestimmt. Mit der Fluoreszenzsonde DPH konnten keine aussagekräftigen Messungen gemacht werden, da die Emission des Farbstoffs durch Pluronic F68 gestört wurde; A) TMA-DPH; B) Kontrollversuche mit beiden Farbstoffen ohne Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)..... 149
- Abbildung 56 Einfluss von Pluronic F68 auf die Pyren-Fluoreszenz in isolierten HEK293-APPwt Zellmembranen. Die Membranen wurden für 20 Minuten mit 7,5 μ M Pluronic F68 inkubiert und anschließend mittels Fluoreszenz Polarisationspektroskopie die Annulare (A) und die Bulk (B) -Fluoreszenz von Pyren bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)..... 150
- Abbildung 57 Einfluss von Pluronic F68 auf die Anisotropie der Plasmamembran von intakten SY5Y-APPwt (A) und HEK293-APPwt (B) Zellen. Die Zellen wurden 24h mit 7,5 μ M Pluronic F68 behandelt. Im Anschluss wurde die Anisotropie der Membranen mittels TMA-DPH als Fluoreszenz-Sonde bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 9 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)..... 151
- Abbildung 58 Einfluss von Pluronic F68 auf den Gehalt an sezerniertem Abeta in SY5Y-APPwt (A) und HEK293-APPwt (B und C) Zellen. Die Zellen wurden 24h mit 7,5 μ M Pluronic F68 behandelt. Im Anschluss wurde das Medium mittels ELISA analysiert. Im Kulturmedium der SY5Y-APPwt Zellen konnte kein Abeta₍₁₋₄₂₎ nachgewiesen werden. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 9 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$)..... 152
- Abbildung 59 Korrelation von Membranfluidität und Abeta Produktion; A) SY5Y-APPwt Zellen; B und C) HEK293-APPwt Zellen. Dargestellt sind die eingesetzten Konzentrationen von 0; 4,5 und 7,5 μ M Pluronic F68..... 153

- Abbildung 60 Einfluss von Pluronic F68 auf die APP Prozessierung in SY5Y-APPwt (linke Seite) und HEK293-APPwt (rechte Seite) Zellen. APP wurde nach 24stündiger Inkubation im Zellhomogenat mit Hilfe des Antikörpers C1/6.1 detektiert und auf GAPDH normiert. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit ImageJ und PrismGraph Pad 4.0. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 6-9 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** p < 0,0001)..... 154
- Abbildung 61 Einfluss von Pluronic F68 auf die Sekretion von APPs α in SY5Y-APPwt (linke Seite) und HEK293-APPwt (rechte Seite) Zellen. APPs α wurde nach 24stündiger Inkubation im Medium mit Hilfe des Antikörpers 6E10 detektiert und auf den Proteingehalt im Zellhomogenat normiert. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit ImageJ und PrismGraph Pad 4.0. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 6-9 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** p < 0,0001)..... 155
- Abbildung 62 Einfluss von Pluronic F68 auf C99 und C83 in SY5Y-APPwt (linke Seite) und HEK293-APPwt (rechte Seite) Zellen. Die C-terminalen Fragmente wurden nach 24stündiger Inkubation im Zellhomogenat mit Hilfe des Antikörpers C1/6.1 detektiert und auf GAPDH normiert. In SY5Y-APPwt Zellen konnte kein C99 detektiert werden. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit ImageJ und PrismGraph Pad 4.0. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 6-9 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** p < 0,0001)..... 156
- Abbildung 63 Einfluss von Pluronic F68 auf den Cholesteringehalt in SY5Y-APPwt (linke Seite) und HEK293-APPwt (rechte Seite) Zellen. Die Zellen wurden für 24h mit den angegebenen Konzentrationen an Pluronic F68 inkubiert. Untersucht wurde sowohl das freie, unveresterte Cholesterin (A), als auch das Gesamtcholesterin (B) im Homogenat. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** p < 0,0001)..... 157
- Abbildung 64 Einfluss von Pluronic F68 auf die *in vitro* Aktivität der β -Sekretase BACE in SY5Y-APPwt und HEK293-APPwt Zellen. Die membranständige β -Sekretase wurde aus den behandelten Zellen extrahiert und die Aktivität gegenüber einem zugegebenen Substrat bestimmt; A) SY5Y-APPwt Zellen; B) HEK293-APPwt Zellen. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** p < 0,0001)..... 158
- Abbildung 65 Zusammenfassende Darstellung der Effekte von Lovastatin, Benzyl Alkohol und Pluronic F68 auf die Membranfluidität und die Abeta₍₁₋₄₀₎-Sekretion in SY5Y-APPwt (linke Seite) und HEK293-APPwt (rechte Seite) Zellen. 159
- Abbildung 66 Fluoreszenzmikroskopische Detektion von Cholesterin und GM-1 in SY5Y-APPwt (A) und HEK293-APPwt (B) Zellen nach der Behandlung mit Lovastatin (Spalte b), Benzyl Alkohol (Spalte c) und Pluronic F68 (Spalte d). Spalte a zeigt jeweils eine unbehandelte Kontrollzelle. Dargestellt ist die Durchsicht der Zelle (Zeile 1a-d), die Cholesterinfärbung mit Filipin (Reihe 2a-d), die GM-1 Färbung mittels Alexa 555-gekoppeltem Choleratoxin (Reihe 3a-d) und die Übereinanderlagerung von Cholesterin- und GM-1 Färbung (Reihe 4a-d). 162
- Abbildung 67 Einfluss von fibrillärem Abeta₍₁₋₄₂₎ auf die Zell-Viabilität in HEK293-APPwt Zellen. Die Zellen wurden 24h lang mit den angegebenen Konzentrationen behandelt; A) MTT-Assay; B) ToxiLight-Assay. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** p < 0,0001)..... 164
- Abbildung 68 Einfluss von fibrillärem Abeta₍₁₋₄₂₎ auf die Anisotropie der Plasmamembran von intakten HEK293-APPwt Zellen. Die Zellen wurden 24h mit den angegebenen Konzentrationen von fibrillärem Abeta₍₁₋₄₂₎ behandelt. Im Anschluss wurde die Anisotropie der Membranen mittels TMA-DPH als Fluoreszenz-Sonde bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 3 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** p < 0,0001)..... 164
- Abbildung 69 Einfluss von fibrillärem Abeta₍₁₋₄₂₎ auf den Gehalt an sezerniertem Abeta in HEK293-APPwt Zellen. Die Zellen wurden 24h mit den angegebenen Konzentrationen an fibrillärem Abeta₍₁₋₄₂₎ behandelt; im Anschluss wurde das Medium mittels ELISA analysiert. Wie die Kontrolle an reinem fibrillärem Abeta₍₁₋₄₂₎ zeigt, wurde das 1-42er Fragment von dem 1-40er-ELISA detektiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 3 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** p < 0,0001)..... 165
- Abbildung 70 Einfluss von fibrillärem Abeta₍₁₋₄₀₎ auf die Zell-Viabilität in HEK293-APPwt Zellen. Die Zellen wurden 24h lang unter Standardbedingungen mit den angegebenen Konzentrationen inkubiert; A) MTT-Assay; B) ToxiLight-Assay. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** p < 0,0001)..... 166
- Abbildung 71 Einfluss von fibrillärem Abeta₍₁₋₄₀₎ auf die Anisotropie der Plasmamembran von intakten HEK293-APPwt Zellen. Die Zellen wurden 24h mit 2 μ M fibrillärem Abeta₍₁₋₄₀₎ behandelt. Im Anschluss wurde die Anisotropie der Membranen mittels TMA-DPH als Fluoreszenz-Sonde bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 9 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** p < 0,0001)..... 167
- Abbildung 72 Einfluss von fibrillärem Abeta₍₁₋₄₀₎ auf den Gehalt an sezerniertem Abeta₍₁₋₄₂₎ (A) und endogenem Abeta₍₁₋₄₂₎ (B) in HEK293-APPwt Zellen. Die Zellen wurden 24h mit 2 μ M fibrillärem Abeta₍₁₋₄₀₎ behandelt; im Anschluss wurde das Medium mittels ELISA analysiert. Wie die Kontrollen an reinem fibrillärem Abeta₍₁₋₄₀₎ und dem Puffer, in dem das Abeta gelöst wurde zeigen, stört bereits die geringe Konzentration an Puffer im Medium den ELISA, so dass kein Signal detektiert werden konnte. Endogenes Abeta₍₁₋₄₂₎ konnte nach der Aufarbeitung der Zellen detektiert werden. Das reine 1-40er Fragment zeigte im 1-42er ELISA kein Signal. Dargestellt sind die (prozentualen) Mittelwerte \pm SEM von 3-6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** p < 0,0001)..... 168
- Abbildung 73 Einfluss von oligomerem Abeta₍₁₋₄₀₎ auf die MTT-Reduktionsrate in HEK293-APPwt Zellen. Die Zellen wurden 24h lang mit den angegebenen Konzentrationen Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte \pm SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** p < 0,0001)..... 169
- Abbildung 74 Einfluss von oligomerem Abeta₍₁₋₄₀₎ auf die Anisotropie der Plasmamembran von intakten HEK293-APPwt Zellen. Die Zellen wurden 24h mit den angegebenen Konzentrationen von oligomerem Abeta₍₁₋₄₀₎ behandelt. Im Anschluss wurde die Anisotropie der Membranen mittels TMA-DPH als Fluoreszenz-Sonde bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 9 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** p < 0,0001)..... 170
- Abbildung 75 Einfluss von oligomerem Abeta₍₁₋₄₀₎ auf den Gehalt an endogenem Abeta in HEK293-APPwt Zellen. Die Zellen wurden 24h mit den angegebenen Konzentrationen an oligomerem Abeta₍₁₋₄₀₎ behandelt; im Anschluss wurden die Zellen mittels ELISA analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 9 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** p < 0,0001)..... 171

Abbildung 76	Korrelation von Membranfluidität und Abeta-Produktion in HEK293-APPwt Zellen nach der Behandlung mit oligomerem Abeta ₍₁₋₄₀₎ . Dargestellt sind die eingesetzten Konzentrationen von 0; 1 und 2µM.....	172
Abbildung 77	Einfluss von oligomerem Abeta ₍₁₋₄₀₎ auf die APP Prozessierung in HEK293-APPwt Zellen. A) APP; B) C83/C99. APP, C83 und C99 wurden im Zellhomogenat mit Hilfe des Antikörpers C1/6.1 detektiert und auf GAPDH normiert. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit ImageJ und PrismGraph Pad 4.0. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von 6-9 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** p < 0,0001).....	173
Abbildung 78	Einfluss von oligomerem Abeta ₍₁₋₄₀₎ auf die Sekretion von APPsα in HEK293-APPwt Zellen. APPsα wurde nach 24stündiger Inkubation im Medium mit Hilfe des Antikörpers 6E10 detektiert und auf den Proteingehalt im Zellhomogenat normiert. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit ImageJ und PrismGraph Pad 4.0. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von 6-9 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** p < 0,0001).....	174
Abbildung 79	Einfluss von oligomerem Abeta ₍₁₋₄₀₎ auf den Cholesteringehalt in HEK293-APPwt Zellen. Die Zellen wurden für 24h mit den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Untersucht wurde sowohl das freie, unveresterte Cholesterin (A), als auch das Gesamtcholesterin (B) im Zellhomogenat. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte ± SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** p < 0,0001).....	175
Abbildung 80	Fluoreszenzmikroskopische Detektion von oligomerem Abeta ₍₁₋₄₀₎ , Cholesterin und GM-1 in SY5Y-APPwt Zellen. Die Zellen wurden 24 Stunden lang mit 1µM oligomerem Abeta ₍₁₋₄₀₎ plus 25nM Fluorescein-gekoppeltem Abeta inkubiert. (A) Durchsicht; (B) Cholesterin; (C) GM-1 Färbung; (D) Abeta ₍₁₋₄₀₎ ; (E und F) Übereinanderlagerung von Abeta- und GM-1 bzw. Cholesterin-Färbung.....	176
Abbildung 81	Fluoreszenzmikroskopische Detektion von oligomerem Abeta ₍₁₋₄₀₎ , Cholesterin und GM-1 in HEK293-APPwt Zellen. Die Zellen wurden 24 Stunden lang mit 1µM oligomerem Abeta ₍₁₋₄₀₎ plus 25nM Fluorescein-gekoppeltem Abeta inkubiert. (A) Durchsicht; (B) Cholesterin; (C) GM-1 Färbung; (D) Fluorescein-gekoppeltes Abeta ₍₁₋₄₀₎ ; (E und F) Übereinanderlagerung von Abeta- und GM-1 bzw. Cholesterin-Färbung.....	177
Abbildung 82	Einfluss der Lipid Raft Quervernetzung auf die Membranfluidität in HEK293-APPwt Zellen. Die Anisotropie wurde in den behandelten Zellen mit Hilfe von TMA-DPH bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von 12 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** p < 0,0001).....	179
Abbildung 83	Einfluss der Lipid Raft Quervernetzung auf die Sekretion von Abeta ₍₁₋₄₀₎ (linke Seite) und Abeta ₍₁₋₄₂₎ (rechte Seite) in HEK293-APPwt Zellen. Die Zellen wurden 30 Minuten mit Cholera toxin und 24h mit anti-Cholera toxin-Antikörper behandelt. Im Anschluss wurde das Kulturmedium mittels ELISA analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** p < 0,0001).....	180
Abbildung 84	Einfluss der Lipid Raft Quervernetzung auf die Sekretion von APPsα in HEK293-APPwt Zellen. APPsα wurde nach 24stündiger Inkubation im Medium mit Hilfe des Antikörpers 6E10 detektiert und auf den Proteingehalt im Zellhomogenat normiert. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit ImageJ und PrismGraph Pad 4.0. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** p < 0,0001).....	181
Abbildung 85	Unterschiede in der basalen Abeta-Sekretion zwischen untransfizierten HEK293 (HEK-ut), APP-Wildtyp transfizierten (HEK-wt) und APP-swedish transfizierten (HEK-sw) HEK293 Zellen; A) basale Sekretion von Abeta ₍₁₋₄₀₎ ; B) basale Sekretion von Abeta ₍₁₋₄₂₎	182
Abbildung 86	Unterschiede in der basalen Membranfluidität zwischen untransfizierten HEK293 (HEK-ut), APP-Wildtyp transfizierten (HEK-wt) und APP-swedish transfizierten (HEK-sw) HEK293 Zellen.....	183
Abbildung 87	Korrelation von Membranfluidität und Abeta-Sekretion in HEK-ut, HEK-wt und HEK-sw Zellen; A) Abeta ₍₁₋₄₀₎ ; B) Abeta ₍₁₋₄₂₎	184
Abbildung 88	Einfluss von fibrillärem Abeta ₍₁₋₄₂₎ auf die Membranfluidität von HEK-ut, HEK-wt und HEK-sw Zellen. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit Abeta inkubiert und anschließend mittels TMA-DPH als Fluoreszenzsonde analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von 4 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** p < 0,0001).....	185
Abbildung 89	Einfluss von DAPT auf die Zell-Viabilität in HEK293-APPwt Zellen. Die Zellen wurden über 10 Passagen mit 1µM DAPT behandelt; A) MTT-Assay; B) ToxiLight-Assay. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte ± SEM von 6 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** p < 0,0001).....	186
Abbildung 90	Einfluss von DAPT auf den Gehalt an sezerniertem Abeta ₍₁₋₄₀₎ (A) und Abeta ₍₁₋₄₂₎ (B) HEK293-APPwt Zellen. Die Zellen wurden über 10 Passagen mit 1µM DAPT behandelt; im Anschluss wurde das Medium mittels ELISA analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von 9 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** p < 0,0001).....	187
Abbildung 91	Einfluss von DAPT auf die Anisotropie der Plasmamembran von intakten HEK293-APPwt Zellen. Die Zellen wurden für 24h mit 1µM DAPT behandelt; die Anisotropie der Membranen wurde mittels TMA-DPH als Fluoreszenz-Sonde bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von 3 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** p < 0,0001).....	188
Abbildung 92	Einfluss von DAPT auf die Anisotropie der Plasmamembran von intakten HEK293-APPwt Zellen. Die Zellen wurden über 10 Passagen mit 1µM DAPT behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von 9 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** p < 0,0001).....	188
Abbildung 93	Einfluss von DAPT auf untransfizierte HEK293 Zellen im Vergleich zu APP-wt transfizierten HEK293 Zellen; A) sezerniertes Abeta ₍₁₋₄₂₎ ; B) Anisotropie/Membranfluidität in intakten Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von 6-9 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** p < 0,0001).....	189
Abbildung 94	Einfluss von DAPT auf die APP Prozessierung in HEK293-APPwt Zellen. A) APP; B) C83/C99. APP, C83 und C99 wurden im Zellhomogenat mit Hilfe des Antikörpers C1/6.1 detektiert und auf GAPDH normiert. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit ImageJ und PrismGraph Pad 4.0. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von 6-9 Einzelexperimenten (One-way	

ANOVA: *** p < 0,0001)	190
Abbildung 95 Einfluss von DAPT auf die Sekretion von APPs α in HEK293-APPwt Zellen. APPs α wurde am Ende der Inkubationszeit im Medium mit Hilfe des Antikörpers 6E10 detektiert und auf den Proteingehalt im Zellhomogenat normiert. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit ImageJ und PrismGraph Pad 4.0. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 6-9 Einzelexperimenten (One-way ANOVA: *** p < 0,0001)	191
Abbildung 96 Modell der GM-1-Cluster Bildung.....	215
Abbildung 97 Modell der Abeta-induzierten Quervernetzung von Lipid Rafts	217
Abbildung 98 Modell der GM-1 Quervernetzung via Cholera-Toxin Bindung.....	219
Abbildung 99 Teufelskreislauf der selbstverstärkenden Abeta-Bildung	223
Tabelle 1 Identifizierte Abeta Strukturen sowie deren Eigenschaften und Vorkommen (modifiziert aus Finder und Glockshuber, 2007 und Haass et al., 2007)	32
Tabelle 2 Eigenschaften von Plasmalipoproteinen.....	39
Tabelle 3 Schrittweise Gewöhnung der HEK-Zellen an UltrosorG als serumfreier FCS-Ersatz	76
Tabelle 4 Ziel-Enzyme und eingesetzte Konzentrationen der verwendeten Inhibitoren	77
Tabelle 5 Zusammenfassung der Effekte der eingesetzten Substanzen auf Cholesterin, Isoprenoide und Abeta	129
Tabelle 6 Zusammenfassung der Effekte der verwendeten Substanzen auf Cholesterin, Isoprenylierungen und Abeta-Sekretion.....	198
Tabelle 7 Effekte von Lovastatin, Benzyl Alkohol und Pluronic F68	206

7.2. Literaturverzeichnis

1. Abad-Rodriguez, J., M. D. Ledesma, et al. (2004). "Neuronal membrane cholesterol loss enhances amyloid peptide generation." *J Cell Biol* **167**(5): 953-60.
2. Allinson, T. M., E. T. Parkin, et al. (2003). "ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases." *J Neurosci Res* **74**(3): 342-52.
3. Amin, D., R. Z. Rutledge, et al. (1997). "RPR 107393, a potent squalene synthase inhibitor and orally effective cholesterol-lowering agent: comparison with inhibitors of HMG-CoA reductase." *J Pharmacol Exp Ther* **281**(2): 746-52.
4. Anandatheerthavarada, H. K., G. Biswas, et al. (2003). "Mitochondrial targeting and a novel transmembrane arrest of Alzheimer's amyloid precursor protein impairs mitochondrial function in neuronal cells." *J Cell Biol* **161**(1): 41-54.
5. Andreasen, N., M. Sjogren, et al. (2003). "CSF markers for Alzheimer's disease: total tau, phospho-tau and Abeta42." *World J Biol Psychiatry* **4**(4): 147-55.
6. Andreasen, N., E. Vanmechelen, et al. (2003). "Cerebrospinal fluid levels of total-tau, phospho-tau and A beta 42 predicts development of Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment." *Acta Neurol Scand Suppl* **179**: 47-51.
7. Ariga, T., M. Kiso, et al. (2001). "Gangliosides inhibit the release of interleukin-1beta in amyloid beta-protein-treated human monocytic cells." *J Mol Neurosci* **17**(3): 371-7.
8. Ariga, T., K. Kobayashi, et al. (2001). "Characterization of high-affinity binding between gangliosides and amyloid beta-protein." *Arch Biochem Biophys* **388**(2): 225-30.
9. Arimon, M., I. Diez-Perez, et al. (2005). "Fine structure study of Abeta1-42 fibrillogenesis with atomic force microscopy." *Faseb J* **19**(10): 1344-6.
10. Asai, M., C. Hattori, et al. (2003). "Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP alpha-secretase." *Biochem Biophys Res Commun* **301**(1): 231-5.
11. Austen, B., G. Christodoulou, et al. (2002). "Relation between cholesterol levels, statins and Alzheimer's disease in the human population." *J Nutr Health Aging* **6**(6): 377-82.
12. Avdulov, N. A., S. V. Chochina, et al. (1997). "Amyloid beta-peptides increase annular and bulk fluidity and induce lipid peroxidation in brain synaptic plasma membranes." *J Neurochem* **68**(5): 2086-91.
13. Avdulov, N. A., S. V. Chochina, et al. (1997). "Lipid binding to amyloid beta-peptide aggregates: preferential binding of cholesterol as compared with phosphatidylcholine and fatty acids." *J Neurochem* **69**(4): 1746-52.
14. Bales, K. R., T. Verina, et al. (1997). "Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid beta-peptide deposition." *Nat Genet* **17**(3): 263-4.
15. Barrow, C. J. and M. G. Zagorski (1991). "Solution structures of beta peptide and its constituent fragments: relation to amyloid deposition." *Science* **253**(5016): 179-82.
16. Bateman, D. A., J. McLaurin, et al. (2007). "Requirement of aggregation propensity of Alzheimer amyloid peptides for neuronal cell surface binding." *BMC Neurosci* **8**: 29.
17. Bellosta, S., F. Bernini, et al. (1998). "Direct vascular effects of HMG-CoA reductase inhibitors." *Atherosclerosis* **137 Suppl**: S101-9.
18. Bellosta, S., N. Ferri, et al. (2000). "Pleiotropic effects of statins in atherosclerosis and diabetes." *Diabetes Care* **23 Suppl 2**: B72-8.
19. Bellosta, S., N. Ferri, et al. (2000). "Non-lipid-related effects of statins." *Ann Med* **32**(3): 164-76.
20. Bennett, B. D., S. Babu-Khan, et al. (2000). "Expression analysis of BACE2 in brain and peripheral tissues." *J Biol Chem* **275**(27): 20647-51.
21. Bennett, B. D., P. Denis, et al. (2000). "A furin-like convertase mediates propeptide cleavage of BACE, the Alzheimer's beta -secretase." *J Biol Chem* **275**(48): 37712-7.

22. Binkova, B., A. N. Erin, et al. (1990). "Lipid peroxidation-induced changes in physical properties of annular lipids in rat brain synaptosomal membranes." Gen Physiol Biophys **9**(3): 311-8.
23. Bjorkhem, I., M. Heverin, et al. (2006). "Oxysterols and Alzheimer's disease." Acta Neurol Scand Suppl **185**: 43-9.
24. Bjorkhem, I., D. Lutjohann, et al. (1998). "Cholesterol homeostasis in human brain: turnover of 24S-hydroxycholesterol and evidence for a cerebral origin of most of this oxysterol in the circulation." J Lipid Res **39**(8): 1594-600.
25. Blennow, K. and E. Vanmechelen (1998). "Combination of the different biological markers for increasing specificity of in vivo Alzheimer's testing." J Neural Transm Suppl **53**: 223-35.
26. Bouillot, C., A. Prochiantz, et al. (1996). "Axonal amyloid precursor protein expressed by neurons in vitro is present in a membrane fraction with caveolae-like properties." J Biol Chem **271**(13): 7640-4.
27. Bowman, A. B., A. Kamal, et al. (2000). "Kinesin-dependent axonal transport is mediated by the sunday driver (SYD) protein." Cell **103**(4): 583-94.
28. Braak, H. and E. Braak (1996). "Evolution of the neuropathology of Alzheimer's disease." Acta Neurol Scand Suppl **165**: 3-12.
29. Braak, H., E. Braak, et al. (1996). "Age, neurofibrillary changes, A beta-amyloid and the onset of Alzheimer's disease." Neurosci Lett **210**(2): 87-90.
30. Braak, H., E. Braak, et al. (1996). "New aspects of pathology in Parkinson's disease with concomitant incipient Alzheimer's disease." J Neural Transm Suppl **48**: 1-6.
31. Bracco, L., R. Gallato, et al. (1994). "Factors affecting course and survival in Alzheimer's disease. A 9-year longitudinal study." Arch Neurol **51**(12): 1213-9.
32. Bretillon, L., D. Lutjohann, et al. (2000). "Plasma levels of 24S-hydroxycholesterol reflect the balance between cerebral production and hepatic metabolism and are inversely related to body surface." J Lipid Res **41**(5): 840-5.
33. Brown, C. M., E. Wright, et al. (2002). "Apolipoprotein E isoform mediated regulation of nitric oxide release." Free Radic Biol Med **32**(11): 1071-5.
34. Brown, D. A. and E. London (1998). "Functions of lipid rafts in biological membranes." Annu Rev Cell Dev Biol **14**: 111-36.
35. Brown, D. A. and E. London (1998). "Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes." J Membr Biol **164**(2): 103-14.
36. Brown, D. A. and E. London (2000). "Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts." J Biol Chem **275**(23): 17221-4.
37. Brown, D. A. and J. K. Rose (1992). "Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface." Cell **68**(3): 533-44.
38. Brown, M. S. and J. L. Goldstein (1997). "The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor." Cell **89**(3): 331-40.
39. Brown, M. S., J. Herz, et al. (1997). "LDL-receptor structure. Calcium cages, acid baths and recycling receptors." Nature **388**(6643): 629-30.
40. Brown, W. V. (1992). "Lipoproteins: what, when, and how often to measure." Heart Dis Stroke **1**(1): 20-6.
41. Brugger, B., R. Sandhoff, et al. (2000). "Evidence for segregation of sphingomyelin and cholesterol during formation of COPI-coated vesicles." J Cell Biol **151**(3): 507-18.
42. Burns, M. P., U. Igbavboa, et al. (2006). "Cholesterol distribution, not total levels, correlate with altered amyloid precursor protein processing in statin-treated mice." Neuromolecular Med **8**(3): 319-28.
43. Burns, M. P., L. Vardanian, et al. (2006). "The effects of ABCA1 on cholesterol efflux and Abeta levels in vitro and in vivo." J Neurochem **98**(3): 792-800.
44. Buxbaum, J. D., E. I. Cullen, et al. (2002). "Pharmacological concentrations of the HMG-CoA reductase inhibitor lovastatin decrease the formation of the Alzheimer beta-amyloid peptide in vitro and in patients." Front Biosci **7**: a50-9.

45. Buxbaum, J. D., K. N. Liu, et al. (1998). "Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor." *J Biol Chem* **273**(43): 27765-7.
46. Buxbaum, J. N. and C. E. Tagoe (2000). "The genetics of the amyloidoses." *Annu Rev Med* **51**: 543-69.
47. Caccamo, A., S. Oddo, et al. (2005). "Age- and region-dependent alterations in Abeta-degrading enzymes: implications for Abeta-induced disorders." *Neurobiol Aging* **26**(5): 645-54.
48. Cai, H., Y. Wang, et al. (2001). "BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons." *Nat Neurosci* **4**(3): 233-4.
49. Cai, X. D., T. E. Golde, et al. (1993). "Release of excess amyloid beta protein from a mutant amyloid beta protein precursor." *Science* **259**(5094): 514-6.
50. Caille, I., B. Allinquant, et al. (2004). "Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone." *Development* **131**(9): 2173-81.
51. Cao, G., K. R. Bales, et al. (2007). "Liver X receptor-mediated gene regulation and cholesterol homeostasis in brain: relevance to Alzheimer's disease therapeutics." *Curr Alzheimer Res* **4**(2): 179-84.
52. Cao, X. and T. C. Sudhof (2001). "A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60." *Science* **293**(5527): 115-20.
53. Capell, A., D. Beher, et al. (2005). "Gamma-secretase complex assembly within the early secretory pathway." *J Biol Chem* **280**(8): 6471-8.
54. Capell, A., C. Kaether, et al. (2003). "Nicastrin interacts with gamma-secretase complex components via the N-terminal part of its transmembrane domain." *J Biol Chem* **278**(52): 52519-23.
55. Chandu, D., S. S. Huppert, et al. (2006). "Analysis of transmembrane domain mutants is consistent with sequential cleavage of Notch by gamma-secretase." *J Neurochem* **96**(1): 228-35.
56. Chang, K. A. and Y. H. Suh (2005). "Pathophysiological roles of amyloidogenic carboxy-terminal fragments of the beta-amyloid precursor protein in Alzheimer's disease." *J Pharmacol Sci* **97**(4): 461-71.
57. Chang, S., T. ran Ma, et al. (2005). "Lipid- and receptor-binding regions of apolipoprotein E4 fragments act in concert to cause mitochondrial dysfunction and neurotoxicity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(51): 18694-9.
58. Chauhan, N., K. C. Wang, et al. (2004). "Walnut extract inhibits the fibrillization of amyloid beta-protein, and also defibrillizes its preformed fibrils." *Curr Alzheimer Res* **1**(3): 183-8.
59. Chauhan, N. B. (2003). "Membrane dynamics, cholesterol homeostasis, and Alzheimer's disease." *J Lipid Res* **44**(11): 2019-29.
60. Chauhan, N. B., G. J. Siegel, et al. (2004). "Effects of lovastatin and pravastatin on amyloid processing and inflammatory response in TgCRND8 brain." *Neurochem Res* **29**(10): 1897-911.
61. Chauhan, N. B., G. J. Siegel, et al. (2004). "Effect of age on the duration and extent of amyloid plaque reduction and microglial activation after injection of anti-Abeta antibody into the third ventricle of TgCRND8 mice." *J Neurosci Res* **78**(5): 732-41.
62. Chin, J. H. and D. B. Goldstein (1977). "Effects of low concentrations of ethanol on the fluidity of spin-labeled erythrocyte and brain membranes." *Mol Pharmacol* **13**(3): 435-41.
63. Chin, J. H. and D. B. Goldstein (1984). "Cholesterol blocks the disordering effects of ethanol in biomembranes." *Lipids* **19**(12): 929-35.
64. Chin, J. H., L. M. Parsons, et al. (1978). "Increased cholesterol content of erythrocyte and brain membranes in ethanol-tolerant mice." *Biochim Biophys Acta* **513**(3): 358-63.
65. Chochina, S. V., N. A. Avdulov, et al. (2001). "Amyloid beta-peptide1-40 increases neuronal membrane fluidity: role of cholesterol and brain region." *J Lipid Res* **42**(8): 1292-7.
66. Christensen, D. D. (2007). "Alzheimer's disease: progress in the development of anti-amyloid disease-modifying therapies." *CNS Spectr* **12**(2): 113-6, 119-23.
67. Citron, M., T. Oltersdorf, et al. (1992). "Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production." *Nature* **360**(6405): 672-4.

-
68. Clarke, M. S., R. W. Caldwell, et al. (1995). "Contraction-induced cell wounding and release of fibroblast growth factor in heart." *Circ Res* **76**(6): 927-34.
 69. Clarke, M. S., M. A. Prendergast, et al. (1999). "Plasma membrane ordering agent pluronic F-68 (PF-68) reduces neurotransmitter uptake and release and produces learning and memory deficits in rats." *Learn Mem* **6**(6): 634-49.
 70. Clayton, D. A., D. R. Grosshans, et al. (2002). "Aging and surface expression of hippocampal NMDA receptors." *J Biol Chem* **277**(17): 14367-9.
 71. Cole, G. M., E. Masliah, et al. (1991). "Accumulation of amyloid precursor fragment in Alzheimer plaques." *Neurobiol Aging* **12**(2): 85-91.
 72. Coles, M., W. Bicknell, et al. (1998). "Solution structure of amyloid beta-peptide(1-40) in a water-micelle environment. Is the membrane-spanning domain where we think it is?" *Biochemistry* **37**(31): 11064-77.
 73. Cooper, B. and H. Bickel (1989). "[Prevalence and incidence of dementia diseases in the elderly population. Results of a population-related longitudinal study in Mannheim]." *Nervenarzt* **60**(8): 472-82.
 74. Corder, E. H., A. M. Saunders, et al. (1993). "Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families." *Science* **261**(5123): 921-3.
 75. Corder, E. H. and M. A. Woodbury (1993). "Genetic heterogeneity in Alzheimer's disease: a grade of membership analysis." *Genet Epidemiol* **10**(6): 495-9.
 76. Cordle, A., J. Koenigsnecht-Talboo, et al. (2005). "Mechanisms of statin-mediated inhibition of small G-protein function." *J Biol Chem* **280**(40): 34202-9.
 77. Cordle, A. and G. Landreth (2005). "3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors attenuate beta-amyloid-induced microglial inflammatory responses." *J Neurosci* **25**(2): 299-307.
 78. Cordy, J. M., N. M. Hooper, et al. (2006). "The involvement of lipid rafts in Alzheimer's disease." *Mol Membr Biol* **23**(1): 111-22.
 79. Cordy, J. M., I. Hussain, et al. (2003). "Exclusively targeting beta-secretase to lipid rafts by GPI-anchor addition up-regulates beta-site processing of the amyloid precursor protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(20): 11735-40.
 80. Crescenzi, O., S. Tomaselli, et al. (2002). "Solution structure of the Alzheimer amyloid beta-peptide (1-42) in an apolar microenvironment. Similarity with a virus fusion domain." *Eur J Biochem* **269**(22): 5642-8.
 81. Crutcher, K. A. (2004). "Apolipoprotein E is a prime suspect, not just an accomplice, in Alzheimer's disease." *J Mol Neurosci* **23**(3): 181-8.
 82. Dahlgren, K. N., A. M. Manelli, et al. (2002). "Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability." *J Biol Chem* **277**(35): 32046-53.
 83. de Foresta, B., M. Rogard, et al. (1987). "Effects of temperature and benzyl alcohol on the structure and adenylate cyclase activity of plasma membranes from bovine adrenal cortex." *Biochim Biophys Acta* **905**(2): 240-56.
 84. De Strooper, B. (2003). "Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex." *Neuron* **38**(1): 9-12.
 85. Dickson, D. W. (1997). "Neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease: a perspective from longitudinal clinicopathological studies." *Neurobiol Aging* **18**(4 Suppl): S21-6.
 86. Dickson, T. C., H. L. Saunders, et al. (1997). "Relationship between apolipoprotein E and the amyloid deposits and dystrophic neurites of Alzheimer's disease." *Neuropathol Appl Neurobiol* **23**(6): 483-91.
 87. Dietschy, J. M. (1997). "Theoretical considerations of what regulates low-density-lipoprotein and high-density-lipoprotein cholesterol." *Am J Clin Nutr* **65**(5 Suppl): 1581S-1589S.
 88. Dietschy, J. M. and S. D. Turley (2001). "Cholesterol metabolism in the brain." *Curr Opin Lipidol* **12**(2): 105-12.
 89. Dietschy, J. M. and S. D. Turley (2002). "Control of cholesterol turnover in the mouse." *J Biol Chem* **277**(6): 3801-4.

90. Dosunmu, R., J. Wu, et al. (2007). "Environmental and dietary risk factors in Alzheimer's disease." Expert Rev Neurother **7**(7): 887-900.
91. Drubin, D. and M. Kirschner (1986). "Purification of tau protein from brain." Methods Enzymol **134**: 156-60.
92. Drubin, D., S. Kobayashi, et al. (1986). "Association of tau protein with microtubules in living cells." Ann N Y Acad Sci **466**: 257-68.
93. Drubin, D. G. and M. W. Kirschner (1986). "Tau protein function in living cells." J Cell Biol **103**(6 Pt 2): 2739-46.
94. Eckert, A., M. Oster, et al. (2001). "Elevated levels of fragmented DNA nucleosomes in native and activated lymphocytes indicate an enhanced sensitivity to apoptosis in sporadic Alzheimer's disease. Specific differences to vascular dementia." Dement Geriatr Cogn Disord **12**(2): 98-105.
95. Eckert, A., K. Schindowski, et al. (2001). "Alzheimer's disease-like alterations in peripheral cells from presenilin-1 transgenic mice." Neurobiol Dis **8**(2): 331-42.
96. Eckert, A., B. Steiner, et al. (2001). "Elevated vulnerability to oxidative stress-induced cell death and activation of caspase-3 by the Swedish amyloid precursor protein mutation." J Neurosci Res **64**(2): 183-92.
97. Eckert, G. P., C. Kirsch, et al. (2003). "Cholesterol modulates amyloid beta-peptide's membrane interactions." Pharmacopsychiatry **36 Suppl 2**: S136-43.
98. Eckert, G. P., C. Kirsch, et al. (2003). "Brain-membrane cholesterol in Alzheimer's disease." J Nutr Health Aging **7**(1): 18-23.
99. Eckert, G. P., L. Vardanian, et al. (2007). "Regulation of central nervous system cholesterol homeostasis by the liver X receptor agonist TO-901317." Neurosci Lett **423**(1): 47-52.
100. Eckert, G. P., W. G. Wood, et al. (2001). "Effects of aging and beta-amyloid on the properties of brain synaptic and mitochondrial membranes." J Neural Transm **108**(8-9): 1051-64.
101. Eckert, G. P., W. G. Wood, et al. (2005). "Membrane disordering effects of beta-amyloid peptides." Subcell Biochem **38**: 319-37.
102. Eehalt, R., P. Keller, et al. (2003). "Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts." J Cell Biol **160**(1): 113-23.
103. Evenhuis, H. M. (1990). "The natural history of dementia in Down's syndrome." Arch Neurol **47**(3): 263-7.
104. Evin, G. and A. Weidemann (2002). "Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease Abeta amyloid peptides." Peptides **23**(7): 1285-97.
105. Evin, G., A. Zhu, et al. (2003). "Proteolytic processing of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein in brain and platelets." J Neurosci Res **74**(3): 386-92.
106. Fahrenholz, F., S. Gilbert, et al. (2000). "Alpha-secretase activity of the disintegrin metalloprotease ADAM 10. Influences of domain structure." Ann N Y Acad Sci **920**: 215-22.
107. Famer, D. and M. Crisby (2007). "Rosuvastatin reduces gliosis and the accelerated weight gain observed in WT and ApoE^{-/-} mice exposed to a high cholesterol diet." Neurosci Lett **419**(1): 68-73.
108. Famer, D., S. Meaney, et al. (2007). "Regulation of alpha- and beta-secretase activity by oxysterols: cerebrosterol stimulates processing of APP via the alpha-secretase pathway." Biochem Biophys Res Commun **359**(1): 46-50.
109. Farzan, M., C. E. Schnitzler, et al. (2000). "BACE2, a beta -secretase homolog, cleaves at the beta site and within the amyloid-beta region of the amyloid-beta precursor protein." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(17): 9712-7.
110. Fassbender, K., C. Masters, et al. (2001). "Alzheimer's disease: molecular concepts and therapeutic targets." Naturwissenschaften **88**(6): 261-7.
111. Fassbender, K., M. Simons, et al. (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**(10): 5856-61.
112. Finder, V. H. and R. Glockshuber (2007). "Amyloid-beta aggregation." Neurodegener Dis **4**(1): 13-27.

113. Fraser, P. E., J. T. Nguyen, et al. (1991). "pH-dependent structural transitions of Alzheimer amyloid peptides." Biophys J **60**(5): 1190-201.
114. Friedland, R. P. (2002). "Lipid metabolism, epidemiology, and the mechanisms of Alzheimer's disease." Ann N Y Acad Sci **977**: 387-90.
115. Fukumoto, H., B. S. Cheung, et al. (2002). "Beta-secretase protein and activity are increased in the neocortex in Alzheimer disease." Arch Neurol **59**(9): 1381-9.
116. Fukumoto, H., M. Tennis, et al. (2003). "Age but not diagnosis is the main predictor of plasma amyloid beta-protein levels." Arch Neurol **60**(7): 958-64.
117. Furukawa, K., S. W. Barger, et al. (1996). "Activation of K⁺ channels and suppression of neuronal activity by secreted beta-amyloid-precursor protein." Nature **379**(6560): 74-8.
118. Furukawa, K., B. L. Sopher, et al. (1996). "Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain." J Neurochem **67**(5): 1882-96.
119. Galbete, J. L., T. R. Martin, et al. (2000). "Cholesterol decreases secretion of the secreted form of amyloid precursor protein by interfering with glycosylation in the protein secretory pathway." Biochem J **348 Pt 2**: 307-13.
120. Gamberdinger, M., A. B. Clement, et al. (2007). "Cholesterol-like effects of selective cyclooxygenase inhibitors and fibrates on cellular membranes and amyloid-beta production." Mol Pharmacol **72**(1): 141-51.
121. Gao, S., H. C. Hendrie, et al. (1998). "The relationships between age, sex, and the incidence of dementia and Alzheimer disease: a meta-analysis." Arch Gen Psychiatry **55**(9): 809-15.
122. Garcia, M. L. and D. W. Cleveland (2001). "Going new places using an old MAP: tau, microtubules and human neurodegenerative disease." Curr Opin Cell Biol **13**(1): 41-8.
123. Gelinas, D. S., K. DaSilva, et al. (2004). "Immunotherapy for Alzheimer's disease." Proc Natl Acad Sci U S A **101 Suppl 2**: 14657-62.
124. Gibson, G. E., V. Haroutunian, et al. (2000). "Mitochondrial damage in Alzheimer's disease varies with apolipoprotein E genotype." Ann Neurol **48**(3): 297-303.
125. Gibson, G. E., H. Zhang, et al. (2000). "Differential alterations in antioxidant capacity in cells from Alzheimer patients." Biochim Biophys Acta **1502**(3): 319-29.
126. Gibson Wood, W., G. P. Eckert, et al. (2003). "Amyloid beta-protein interactions with membranes and cholesterol: causes or casualties of Alzheimer's disease." Biochim Biophys Acta **1610**(2): 281-90.
127. Gilman, S., M. Koller, et al. (2005). "Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial." Neurology **64**(9): 1553-62.
128. Gimpl, G., K. Burger, et al. (1997). "Cholesterol as modulator of receptor function." Biochemistry **36**(36): 10959-74.
129. Glenner, G. G. and C. W. Wong (1984). "Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein." Biochem Biophys Res Commun **122**(3): 1131-5.
130. Glenner, G. G. and C. W. Wong (1984). "Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein." Biochem Biophys Res Commun **120**(3): 885-90.
131. Glenner, G. G., C. W. Wong, et al. (1984). "The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis." Appl Pathol **2**(6): 357-69.
132. Goo, J. H. and W. J. Park (2004). "Elucidation of the interactions between C99, presenilin, and nicastrin by the split-ubiquitin assay." DNA Cell Biol **23**(1): 59-65.
133. Graham, J. M., J. A. Higgins, et al. (1968). "The isolation of rat liver plasma membrane fragments." Biochim Biophys Acta **150**(2): 303-5.
134. Gralle, M. and S. T. Ferreira (2007). "Structure and functions of the human amyloid precursor protein: the whole is more than the sum of its parts." Prog Neurobiol **82**(1): 11-32.

135. Grange-Midroit, M., J. A. Garcia-Sevilla, et al. (2002). "G protein-coupled receptor kinases, beta-arrestin-2 and associated regulatory proteins in the human brain: postmortem changes, effect of age and subcellular distribution." *Brain Res Mol Brain Res* **101**(1-2): 39-51.
136. Haass, C. (1996). "Presenile because of presenilin: the presenilin genes and early onset Alzheimer's disease." *Curr Opin Neurol* **9**(4): 254-9.
137. Haass, C. (1996). "The molecular significance of amyloid beta-peptide for Alzheimer's disease." *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **246**(3): 118-23.
138. Haass, C., A. Y. Hung, et al. (1994). "Mutations associated with a locus for familial Alzheimer's disease result in alternative processing of amyloid beta-protein precursor." *J Biol Chem* **269**(26): 17741-8.
139. Haass, C., E. H. Koo, et al. (1992). "Targeting of cell-surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments." *Nature* **357**(6378): 500-3.
140. Haass, C., E. H. Koo, et al. (1994). "Polarized secretion of beta-amyloid precursor protein and amyloid beta-peptide in MDCK cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(4): 1564-8.
141. Haass, C., C. A. Lemere, et al. (1995). "The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway." *Nat Med* **1**(12): 1291-6.
142. Haass, C. and D. J. Selkoe (2007). "Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(2): 101-12.
143. Hamelin, B. A. and J. Turgeon (1998). "Hydrophilicity/lipophilicity: relevance for the pharmacology and clinical effects of HMG-CoA reductase inhibitors." *Trends Pharmacol Sci* **19**(1): 26-37.
144. Haniu, M., P. Denis, et al. (2000). "Characterization of Alzheimer's beta -secretase protein BACE. A pepsin family member with unusual properties." *J Biol Chem* **275**(28): 21099-106.
145. Harder, T., P. Scheiffele, et al. (1998). "Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components." *J Cell Biol* **141**(4): 929-42.
146. Hardy, J. (1992). "An 'anatomical cascade hypothesis' for Alzheimer's disease." *Trends Neurosci* **15**(6): 200-1.
147. Hardy, J. (1992). "Framing beta-amyloid." *Nat Genet* **1**(4): 233-4.
148. Hardy, J., M. C. Chartier-Harlin, et al. (1992). "Alzheimer disease: the new agenda." *Am J Hum Genet* **50**(3): 648-51.
149. Hardy, J. and M. Mullan (1992). "Alzheimer's disease. In search of the soluble." *Nature* **359**(6393): 268-9.
150. Hardy, J. and D. J. Selkoe (2002). "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics." *Science* **297**(5580): 353-6.
151. Hardy, J. A. and G. A. Higgins (1992). "Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis." *Science* **256**(5054): 184-5.
152. Harper, J. D. and P. T. Lansbury, Jr. (1997). "Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins." *Annu Rev Biochem* **66**: 385-407.
153. Harper, J. D., C. M. Lieber, et al. (1997). "Atomic force microscopic imaging of seeded fibril formation and fibril branching by the Alzheimer's disease amyloid-beta protein." *Chem Biol* **4**(12): 951-9.
154. Harper, J. D., S. S. Wong, et al. (1997). "Observation of metastable Abeta amyloid protofibrils by atomic force microscopy." *Chem Biol* **4**(2): 119-25.
155. Harper, J. D., S. S. Wong, et al. (1999). "Assembly of A beta amyloid protofibrils: an in vitro model for a possible early event in Alzheimer's disease." *Biochemistry* **38**(28): 8972-80.
156. Hartmann, T. (2001). "Cholesterol, A beta and Alzheimer's disease." *Trends Neurosci* **24**(11 Suppl): S45-8.
157. Hartmann, T., S. C. Bieger, et al. (1997). "Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A beta40/42 amyloid peptides." *Nat Med* **3**(9): 1016-20.
158. Hayashi, H., N. Kimura, et al. (2004). "A seed for Alzheimer amyloid in the brain." *J Neurosci* **24**(20): 4894-902.

-
159. Hayashi, H., T. Mizuno, et al. (2000). "Amyloid precursor protein in unique cholesterol-rich microdomains different from caveolae-like domains." *Biochim Biophys Acta* **1483**(1): 81-90.
160. Herholz, K. (1995). "FDG PET and differential diagnosis of dementia." *Alzheimer Dis Assoc Disord* **9**(1): 6-16.
161. Heverin, M., N. Bogdanovic, et al. (2004). "Changes in the levels of cerebral and extracerebral sterols in the brain of patients with Alzheimer's disease." *J Lipid Res* **45**(1): 186-93.
162. Heverin, M., S. Meaney, et al. (2005). "Crossing the barrier: net flux of 27-hydroxycholesterol into the human brain." *J Lipid Res* **46**(5): 1047-52.
163. Heyn, M. P. (1979). "Determination of lipid order parameters and rotational correlation times from fluorescence depolarization experiments." *FEBS Lett* **108**(2): 359-64.
164. Holsinger, R. M., C. A. McLean, et al. (2002). "Increased expression of the amyloid precursor beta-secretase in Alzheimer's disease." *Ann Neurol* **51**(6): 783-6.
165. Holsinger, R. M., C. A. McLean, et al. (2004). "Increased beta-Secretase activity in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease subjects." *Ann Neurol* **55**(6): 898-9.
166. Holsinger, T., D. C. Steffens, et al. (2002). "Head injury in early adulthood and the lifetime risk of depression." *Arch Gen Psychiatry* **59**(1): 17-22.
167. Hooper, N. M. (1999). "Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains, lipid rafts and caveolae (review)." *Mol Membr Biol* **16**(2): 145-56.
168. Hooper, N. M. (2005). "Roles of proteolysis and lipid rafts in the processing of the amyloid precursor protein and prion protein." *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 2): 335-8.
169. Horrocks, L. A. and A. A. Farooqui (2004). "Docosahexaenoic acid in the diet: its importance in maintenance and restoration of neural membrane function." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **70**(4): 361-72.
170. Horvath, P. J., H. H. Shuhaiber, et al. (1997). "Type of dietary fiber, not fat, alters phospholipase D and ornithine decarboxylase activities in the rat large intestine." *Nutr Cancer* **27**(2): 143-9.
171. Hossain, S., M. Grande, et al. (2007). "Binding of the Alzheimer amyloid beta-peptide to neuronal cell membranes by fluorescence correlation spectroscopy." *Exp Mol Pathol* **82**(2): 169-74.
172. Howland, D. S., S. P. Trusko, et al. (1998). "Modulation of secreted beta-amyloid precursor protein and amyloid beta-peptide in brain by cholesterol." *J Biol Chem* **273**(26): 16576-82.
173. Hsia, A. Y., E. Masliah, et al. (1999). "Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(6): 3228-33.
174. Huse, J. T. and R. W. Doms (2000). "Closing in on the amyloid cascade: recent insights into the cell biology of Alzheimer's disease." *Mol Neurobiol* **22**(1-3): 81-98.
175. Huse, J. T., D. S. Pijak, et al. (2000). "Maturation and endosomal targeting of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. The Alzheimer's disease beta-secretase." *J Biol Chem* **275**(43): 33729-37.
176. Igbavboa, U., N. A. Avdulov, et al. (1996). "Increasing age alters transbilayer fluidity and cholesterol asymmetry in synaptic plasma membranes of mice." *J Neurochem* **66**(4): 1717-25.
177. Ikezu, T., B. D. Trapp, et al. (1998). "Caveolae, plasma membrane microdomains for alpha-secretase-mediated processing of the amyloid precursor protein." *J Biol Chem* **273**(17): 10485-95.
178. Ikonen, E. (1997). "Molecular mechanisms of intracellular cholesterol transport." *Curr Opin Lipidol* **8**(2): 60-4.
179. Ioannou, Y. A. (2000). "The structure and function of the Niemann-Pick C1 protein." *Mol Genet Metab* **71**(1-2): 175-81.
180. Jacobson, K., E. D. Sheets, et al. (1995). "Revisiting the fluid mosaic model of membranes." *Science* **268**(5216): 1441-2.
181. Janes, P. W., S. C. Ley, et al. (2000). "The role of lipid rafts in T cell antigen receptor (TCR) signalling." *Semin Immunol* **12**(1): 23-34.

-
182. Janowski, B. A., M. J. Grogan, et al. (1999). "Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRbeta." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(1): 266-71.
183. Janus, C., J. Pearson, et al. (2000). "A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease." Nature **408**(6815): 979-82.
184. Jarrett, J. T., E. P. Berger, et al. (1993). "The C-terminus of the beta protein is critical in amyloidogenesis." Ann N Y Acad Sci **695**: 144-8.
185. Jarrett, J. T., E. P. Berger, et al. (1993). "The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease." Biochemistry **32**(18): 4693-7.
186. Jarrett, J. T. and P. T. Lansbury, Jr. (1993). "Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie?" Cell **73**(6): 1055-8.
187. Ji, D., R. Lape, et al. (2001). "Timing and location of nicotinic activity enhances or depresses hippocampal synaptic plasticity." Neuron **31**(1): 131-41.
188. Jick, H., G. L. Zornberg, et al. (2000). "Statins and the risk of dementia." Lancet **356**(9242): 1627-31.
189. Johnson, W. J., F. H. Mahlberg, et al. (1991). "Cholesterol transport between cells and high-density lipoproteins." Biochim Biophys Acta **1085**(3): 273-98.
190. Johnson, W. J., M. C. Phillips, et al. (1997). "Lipoproteins and cellular cholesterol homeostasis." Subcell Biochem **28**: 235-76.
191. Jorm, A. F. and D. Jolley (1998). "The incidence of dementia: a meta-analysis." Neurology **51**(3): 728-33.
192. Jurevics, H. A., F. Z. Kidwai, et al. (1997). "Sources of cholesterol during development of the rat fetus and fetal organs." J Lipid Res **38**(4): 723-33.
193. Kabanov, A. V. and V. Y. Alakhov (2002). "Pluronic block copolymers in drug delivery: from micellar nanocontainers to biological response modifiers." Crit Rev Ther Drug Carrier Syst **19**(1): 1-72.
194. Kabanov, A. V., E. V. Batrakova, et al. (2002). "Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery." J Control Release **82**(2-3): 189-212.
195. Kabanov, A. V., E. V. Batrakova, et al. (2002). "Pluronic block copolymers for overcoming drug resistance in cancer." Adv Drug Deliv Rev **54**(5): 759-79.
196. Kabanov, A. V., E. V. Batrakova, et al. (2003). "Pluronic block copolymers as modulators of drug efflux transporter activity in the blood-brain barrier." Adv Drug Deliv Rev **55**(1): 151-64.
197. Kabanov, A. V., P. Lemieux, et al. (2002). "Pluronic block copolymers: novel functional molecules for gene therapy." Adv Drug Deliv Rev **54**(2): 223-33.
198. Kaether, C., A. Capell, et al. (2004). "The presenilin C-terminus is required for ER-retention, nicastrin-binding and gamma-secretase activity." Embo J **23**(24): 4738-48.
199. Kaether, C. and C. Haass (2004). "A lipid boundary separates APP and secretases and limits amyloid beta-peptide generation." J Cell Biol **167**(5): 809-12.
200. Kaiser, R. D. and E. London (1998). "Location of diphenylhexatriene (DPH) and its derivatives within membranes: comparison of different fluorescence quenching analyses of membrane depth." Biochemistry **37**(22): 8180-90.
201. Kakio, A., S. I. Nishimoto, et al. (2001). "Cholesterol-dependent formation of GM1 ganglioside-bound amyloid beta-protein, an endogenous seed for Alzheimer amyloid." J Biol Chem **276**(27): 24985-90.
202. Kalmijn, S., E. J. Feskens, et al. (1997). "Polyunsaturated fatty acids, antioxidants, and cognitive function in very old men." Am J Epidemiol **145**(1): 33-41.
203. Kalmijn, S., L. J. Launer, et al. (1997). "Dietary fat intake and the risk of incident dementia in the Rotterdam Study." Ann Neurol **42**(5): 776-82.
204. Kalvodova, L., N. Kahya, et al. (2005). "Lipids as modulators of proteolytic activity of BACE: involvement of cholesterol, glycosphingolipids, and anionic phospholipids in vitro." J Biol Chem **280**(44): 36815-23.

-
205. Kamal, A., G. B. Stokin, et al. (2000). "Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-I." *Neuron* **28**(2): 449-59.
206. Kamenetz, F., T. Tomita, et al. (2003). "APP processing and synaptic function." *Neuron* **37**(6): 925-37.
207. Kang, J., H. G. Lemaire, et al. (1987). "The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor." *Nature* **325**(6106): 733-6.
208. Kawarabayashi, T., M. Shoji, et al. (2004). "Dimeric amyloid beta protein rapidly accumulates in lipid rafts followed by apolipoprotein E and phosphorylated tau accumulation in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease." *J Neurosci* **24**(15): 3801-9.
209. Keller, J. N., K. B. Hanni, et al. (2000). "Impaired proteasome function in Alzheimer's disease." *J Neurochem* **75**(1): 436-9.
210. Keller, J. N., F. F. Huang, et al. (2000). "Decreased levels of proteasome activity and proteasome expression in aging spinal cord." *Neuroscience* **98**(1): 149-56.
211. Kim, H. J., S. C. Chae, et al. (2003). "Selective neuronal degeneration induced by soluble oligomeric amyloid beta protein." *Faseb J* **17**(1): 118-20.
212. Kim, S. H., T. Ikeuchi, et al. (2003). "Regulated hyperaccumulation of presenilin-1 and the "gamma-secretase" complex. Evidence for differential intramembranous processing of transmembrane substrates." *J Biol Chem* **278**(36): 33992-4002.
213. Kirsch, C., G. P. Eckert, et al. (2003). "Brain cholesterol, statins and Alzheimer's Disease." *Pharmacopsychiatry* **36 Suppl 2**: S113-9.
214. Kirsch, C., G. P. Eckert, et al. (2002). "Cholesterol attenuates the membrane perturbing properties of beta-amyloid peptides." *Amyloid* **9**(3): 149-59.
215. Kirsch, C., G. P. Eckert, et al. (2003). "Statin effects on cholesterol micro-domains in brain plasma membranes." *Biochem Pharmacol* **65**(5): 843-56.
216. Kivipelto, M., E. L. Helkala, et al. (2002). "Apolipoprotein E epsilon4 allele, elevated midlife total cholesterol level, and high midlife systolic blood pressure are independent risk factors for late-life Alzheimer disease." *Ann Intern Med* **137**(3): 149-55.
217. Kivipelto, M., M. P. Laakso, et al. (2002). "Hypertension and hypercholesterolaemia as risk factors for Alzheimer's disease: potential for pharmacological intervention." *CNS Drugs* **16**(7): 435-44.
218. Knittweis, J. W. and W. A. McMullen (2000). "The effect of apoE on dementia is not through atherosclerosis: the Rotterdam study." *Neurology* **54**(12): 2356-8.
219. Kojro, E., G. Gimpl, et al. (2001). "Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha-secretase ADAM 10." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(10): 5815-20.
220. Koo, E. H. and S. L. Squazzo (1994). "Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway." *J Biol Chem* **269**(26): 17386-9.
221. Koudinov, A. R. and T. T. Berezov (2005). "Cholesterol, statins, and Alzheimer disease." *PLoS Med* **2**(3): e81; author reply e85.
222. Koudinov, A. R., T. T. Berezov, et al. (2001). "The levels of soluble amyloid beta in different high density lipoprotein subfractions distinguish Alzheimer's and normal aging cerebrospinal fluid: implication for brain cholesterol pathology?" *Neurosci Lett* **314**(3): 115-8.
223. Koudinov, A. R. and N. V. Koudinova (2001). "Essential role for cholesterol in synaptic plasticity and neuronal degeneration." *Faseb J* **15**(10): 1858-60.
224. Kounnas, M. Z., R. D. Moir, et al. (1995). "LDL receptor-related protein, a multifunctional ApoE receptor, binds secreted beta-amyloid precursor protein and mediates its degradation." *Cell* **82**(2): 331-40.
225. Kuo, Y. M., M. R. Emmerling, et al. (1998). "Elevated low-density lipoprotein in Alzheimer's disease correlates with brain abeta 1-42 levels." *Biochem Biophys Res Commun* **252**(3): 711-5.
226. Kuo, Y. M., M. R. Emmerling, et al. (1996). "Water-soluble Abeta (N-40, N-42) oligomers in normal and Alzheimer disease brains." *J Biol Chem* **271**(8): 4077-81.

-
227. Kurz, A., R. Egensperger, et al. (1995). "[The apolipoprotein E gene and Alzheimer disease phenotype]." Z Gerontol Geriatr **28**(3): 195-9.
228. Lammich, S., E. Kojro, et al. (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**(7): 3922-7.
229. Lansbury, P. T., Jr. (1999). "Evolution of amyloid: what normal protein folding may tell us about fibrillogenesis and disease." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(7): 3342-4.
230. Laude, A. J. and I. A. Prior (2004). "Plasma membrane microdomains: organization, function and trafficking." Mol Membr Biol **21**(3): 193-205.
231. Laufs, U., M. Endres, et al. (2000). "Suppression of endothelial nitric oxide production after withdrawal of statin treatment is mediated by negative feedback regulation of rho GTPase gene transcription." Circulation **102**(25): 3104-10.
232. Laufs, U. and E. Erdmann (1998). "[Nitric oxide as a signal molecule in the cardiovascular system. Nobel Prize for Medicine in 1998]." Dtsch Med Wochenschr **123**(51-52): 1562-5.
233. Laufs, U., K. Gertz, et al. (2000). "Atorvastatin upregulates type III nitric oxide synthase in thrombocytes, decreases platelet activation, and protects from cerebral ischemia in normocholesterolemic mice." Stroke **31**(10): 2442-9.
234. Laufs, U., V. La Fata, et al. (1998). "Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors." Circulation **97**(12): 1129-35.
235. Laufs, U. and J. K. Liao (2000). "Direct vascular effects of HMG-CoA reductase inhibitors." Trends Cardiovasc Med **10**(4): 143-8.
236. Lazarov, O., G. A. Morfini, et al. (2005). "Axonal transport, amyloid precursor protein, kinesin-1, and the processing apparatus: revisited." J Neurosci **25**(9): 2386-95.
237. Lee, S. J., U. Liyanage, et al. (1998). "A detergent-insoluble membrane compartment contains A beta in vivo." Nat Med **4**(6): 730-4.
238. Leissring, M. A., M. P. Murphy, et al. (2002). "A physiologic signaling role for the gamma -secretase-derived intracellular fragment of APP." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(7): 4697-702.
239. Li, G., R. Higdon, et al. (2004). "Statin therapy and risk of dementia in the elderly: a community-based prospective cohort study." Neurology **63**(9): 1624-8.
240. Li, G., J. B. Shofer, et al. (2005). "Serum cholesterol and risk of Alzheimer disease: a community-based cohort study." Neurology **65**(7): 1045-50.
241. Li, H. L., J. M. Roch, et al. (1997). "Defective neurite extension is caused by a mutation in amyloid beta/A4 (A beta) protein precursor found in familial Alzheimer's disease." J Neurobiol **32**(5): 469-80.
242. Li, S., M. Mallory, et al. (1997). "Glutamate transporter alterations in Alzheimer disease are possibly associated with abnormal APP expression." J Neuropathol Exp Neurol **56**(8): 901-11.
243. Li, Y. M., M. T. Lai, et al. (2000). "Presenilin 1 is linked with gamma-secretase activity in the detergent solubilized state." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(11): 6138-43.
244. Liang, Y., S. Lin, et al. (2004). "A liver X receptor and retinoid X receptor heterodimer mediates apolipoprotein E expression, secretion and cholesterol homeostasis in astrocytes." J Neurochem **88**(3): 623-34.
245. Liscum, L. and N. J. Munn (1999). "Intracellular cholesterol transport." Biochim Biophys Acta **1438**(1): 19-37.
246. Lousberg, T. R., A. M. Denham, et al. (2001). "A comparison of clinical outcome studies among cholesterol-lowering agents." Ann Pharmacother **35**(12): 1599-607.
247. Lue, L. F., Y. M. Kuo, et al. (1999). "Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease." Am J Pathol **155**(3): 853-62.
248. Lund, E. G., J. M. Guileyardo, et al. (1999). "cDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(13): 7238-43.

-
249. Luo, J. J., M. S. Wallace, et al. (2001). "Characterization of the neurotrophic interaction between nerve growth factor and secreted alpha-amyloid precursor protein." *J Neurosci Res* **63**(5): 410-20.
250. Luo, Y., B. Bolon, et al. (2001). "Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation." *Nat Neurosci* **4**(3): 231-2.
251. Lutjohann, D., I. Bjorkhem, et al. (2001). "Cholesterol dynamics in the foetal and neonatal brain as reflected by circulatory levels of 24S-hydroxycholesterol." *Acta Paediatr* **90**(6): 652-7.
252. Lutjohann, D., O. Breuer, et al. (1996). "Cholesterol homeostasis in human brain: evidence for an age-dependent flux of 24S-hydroxycholesterol from the brain into the circulation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(18): 9799-804.
253. Lutjohann, D., A. Papassotiropoulos, et al. (2000). "Plasma 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) is increased in Alzheimer and vascular demented patients." *J Lipid Res* **41**(2): 195-8.
254. Lutjohann, D. and K. von Bergmann (2003). "24S-hydroxycholesterol: a marker of brain cholesterol metabolism." *Pharmacopsychiatry* **36 Suppl 2**: S102-6.
255. Lyckman, A. W., A. M. Confaloni, et al. (1998). "Post-translational processing and turnover kinetics of presynaptically targeted amyloid precursor superfamily proteins in the central nervous system." *J Biol Chem* **273**(18): 11100-6.
256. Ma, H., S. Lesne, et al. (2007). "Involvement of beta-site APP cleaving enzyme 1 (BACE1) in amyloid precursor protein-mediated enhancement of memory and activity-dependent synaptic plasticity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(19): 8167-72.
257. Macdonald, A. G., K. W. Wahle, et al. (1988). "Temperature, pressure and cholesterol effects on bilayer fluidity; a comparison of pyrene excimer/monomer ratios with the steady-state fluorescence polarization of diphenylhexatriene in liposomes and microsomes." *Biochim Biophys Acta* **938**(2): 231-42.
258. Mahley, R. W. and Y. Huang (2006). "Apolipoprotein (apo) E4 and Alzheimer's disease: unique conformational and biophysical properties of apoE4 can modulate neuropathology." *Acta Neurol Scand Suppl* **185**: 8-14.
259. Mahley, R. W., K. H. Weisgraber, et al. (2006). "Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(15): 5644-51.
260. Marguet, D., P. F. Lenne, et al. (2006). "Dynamics in the plasma membrane: how to combine fluidity and order." *Embo J* **25**(15): 3446-57.
261. Mason, J. C. (2003). "Statins and their role in vascular protection." *Clin Sci (Lond)* **105**(3): 251-66.
262. Masters, C. L. and K. Beyreuther (2006). "Pathways to the discovery of the Abeta amyloid of Alzheimer's disease." *J Alzheimers Dis* **9**(3 Suppl): 155-61.
263. Masters, C. L., G. Simms, et al. (1985). "Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome." *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(12): 4245-9.
264. Matko, J., A. Bodnar, et al. (2002). "GPI-microdomains (membrane rafts) and signaling of the multi-chain interleukin-2 receptor in human lymphoma/leukemia T cell lines." *Eur J Biochem* **269**(4): 1199-208.
265. Matsuda, K., M. Fletcher, et al. (2003). "Specific assembly with the NMDA receptor 3B subunit controls surface expression and calcium permeability of NMDA receptors." *J Neurosci* **23**(31): 10064-73.
266. Matsuoka, Y., M. Saito, et al. (2003). "Novel therapeutic approach for the treatment of Alzheimer's disease by peripheral administration of agents with an affinity to beta-amyloid." *J Neurosci* **23**(1): 29-33.
267. Matsuzaki, K. and C. Horikiri (1999). "Interactions of amyloid beta-peptide (1-40) with ganglioside-containing membranes." *Biochemistry* **38**(13): 4137-42.
268. Matsuzaki, K. and K. Yanagisawa (2004). "[Pivotal role of ganglioside in aggregation of amyloid beta-protein]." *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **49**(15 Suppl): 2463-7.
269. Mattson, M. P. (1997). "Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives." *Physiol Rev* **77**(4): 1081-132.
270. Mattson, M. P., R. G. Cutler, et al. (2005). "Alzheimer peptides perturb lipid-regulating enzymes." *Nat Cell Biol* **7**(11): 1045-7.
-

-
271. Mattson, M. P. and K. Furukawa (1997). "Alzheimer's disease. Short precursor shortens memory." Nature **387**(6632): 457-8.
272. Maxfield, F. R. and I. Tabas (2005). "Role of cholesterol and lipid organization in disease." Nature **438**(7068): 612-21.
273. McKhann, G., D. Drachman, et al. (1984). "Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease." Neurology **34**(7): 939-44.
274. McLaurin, J. and A. Chakrabartty (1996). "Membrane disruption by Alzheimer beta-amyloid peptides mediated through specific binding to either phospholipids or gangliosides. Implications for neurotoxicity." J Biol Chem **271**(43): 26482-9.
275. McLean, C. A., R. A. Cherny, et al. (1999). "Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease." Ann Neurol **46**(6): 860-6.
276. Meaney, S., M. Heverin, et al. (2007). "Novel route for elimination of brain oxysterols across the blood-brain barrier: conversion into 7alpha-hydroxy-3-oxo-4-cholestenoic acid." J Lipid Res **48**(4): 944-51.
277. Meaney, S., D. Lutjohann, et al. (2000). "Formation of oxysterols from different pools of cholesterol as studied by stable isotope technique: cerebral origin of most circulating 24S-hydroxycholesterol in rats, but not in mice." Biochim Biophys Acta **1486**(2-3): 293-8.
278. Menge, T., H. P. Hartung, et al. (2005). "Statins--a cure-all for the brain?" Nat Rev Neurosci **6**(4): 325-31.
279. Meziane, H., J. C. Dodart, et al. (1998). "Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(21): 12683-8.
280. Michikawa, M. (2003). "Cholesterol paradox: is high total or low HDL cholesterol level a risk for Alzheimer's disease?" J Neurosci Res **72**(2): 141-6.
281. Michikawa, M. (2004). "Neurodegenerative disorders and cholesterol." Curr Alzheimer Res **1**(4): 271-5.
282. Michikawa, M., Q. W. Fan, et al. (2000). "Apolipoprotein E exhibits isoform-specific promotion of lipid efflux from astrocytes and neurons in culture." J Neurochem **74**(3): 1008-16.
283. Miller, L. J. and R. Chacko (2004). "The role of cholesterol and statins in Alzheimer's disease." Ann Pharmacother **38**(1): 91-8.
284. Milward, E. A., R. Papadopoulos, et al. (1992). "The amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is a mediator of the effects of nerve growth factor on neurite outgrowth." Neuron **9**(1): 129-37.
285. Moechars, D., I. Dewachter, et al. (1999). "Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain." J Biol Chem **274**(10): 6483-92.
286. Moghimi, S. M. and A. C. Hunter (2000). "Poloxamers and poloxamines in nanoparticle engineering and experimental medicine." Trends Biotechnol **18**(10): 412-20.
287. Moghimi, S. M. and A. R. Rajabi-Siahboomi (2000). "Recent advances in cellular, sub-cellular and molecular targeting." Adv Drug Deliv Rev **41**(2): 129-33.
288. Morgan, D., D. M. Diamond, et al. (2000). "A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease." Nature **408**(6815): 982-5.
289. Mori, T., D. Paris, et al. (2001). "Cholesterol accumulates in senile plaques of Alzheimer disease patients and in transgenic APP(SW) mice." J Neuropathol Exp Neurol **60**(8): 778-85.
290. Morishima-Kawashima, M. and Y. Ihara (1998). "The presence of amyloid beta-protein in the detergent-insoluble membrane compartment of human neuroblastoma cells." Biochemistry **37**(44): 15247-53.
291. Morita, I., I. Sato, et al. (1997). "Enhancement of membrane fluidity in cholesterol-poor endothelial cells pre-treated with simvastatin." Endothelium **5**(2): 107-13.
292. Motter, R., C. Vigo-Pelfrey, et al. (1995). "Reduction of beta-amyloid peptide42 in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease." Ann Neurol **38**(4): 643-8.
293. Moya, K. L., L. I. Benowitz, et al. (1994). "The amyloid precursor protein is developmentally regulated and correlated with synaptogenesis." Dev Biol **161**(2): 597-603.

-
294. Moya, K. L., A. M. Confaloni, et al. (1994). "In vivo neuronal synthesis and axonal transport of Kunitz protease inhibitor (KPI)-containing forms of the amyloid precursor protein." *J Neurochem* **63**(5): 1971-4.
295. Mukherjee, S. and F. R. Maxfield (2000). "Role of membrane organization and membrane domains in endocytic lipid trafficking." *Traffic* **1**(3): 203-11.
296. Muller, W. E., C. Kirsch, et al. (2001). "Membrane-disordering effects of beta-amyloid peptides." *Biochem Soc Trans* **29**(Pt 4): 617-23.
297. Muller, W. E. and N. W. Pedigo, Jr. (1994). "Brain aging: a risk factor of neurodegenerative disorders and a target for therapeutic intervention." *Life Sci* **55**(25-26): 1975-6.
298. Multhaup, G. (2006). "Amyloid precursor protein and BACE function as oligomers." *Neurodegener Dis* **3**(4-5): 270-4.
299. Nagy, K., V. Nagy, et al. (1983). "Alterations of the synaptosomal membrane 'microviscosity' in the brain cortex of rats during aging and centrophenoxine treatment." *Arch Gerontol Geriatr* **2**(1-2): 23-39.
300. Naiki, H. and F. Gejyo (1999). "Kinetic analysis of amyloid fibril formation." *Methods Enzymol* **309**: 305-18.
301. Nakagawa, T., H. Zhu, et al. (2000). "Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta." *Nature* **403**(6765): 98-103.
302. Naslund, J., V. Haroutunian, et al. (2000). "Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline." *Jama* **283**(12): 1571-7.
303. Neve, R. L., E. A. Finch, et al. (1988). "Expression of the Alzheimer amyloid precursor gene transcripts in the human brain." *Neuron* **1**(8): 669-77.
304. Newman, E. A. and K. R. Zahs (1998). "Modulation of neuronal activity by glial cells in the retina." *J Neurosci* **18**(11): 4022-8.
305. Newman, P. E. (1998). "Could diet be used to reduce the risk of developing Alzheimer's disease?" *Med Hypotheses* **50**(4): 335-7.
306. Nicoll, J. A., D. Wilkinson, et al. (2003). "Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report." *Nat Med* **9**(4): 448-52.
307. Nordstedt, C., G. L. Caporaso, et al. (1993). "Identification of the Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein in clathrin-coated vesicles purified from PC12 cells." *J Biol Chem* **268**(1): 608-12.
308. Nunan, J., M. S. Shearman, et al. (2001). "The C-terminal fragment of the Alzheimer's disease amyloid protein precursor is degraded by a proteasome-dependent mechanism distinct from gamma-secretase." *Eur J Biochem* **268**(20): 5329-36.
309. Ohvo-Rekila, H., B. Ramstedt, et al. (2002). "Cholesterol interactions with phospholipids in membranes." *Prog Lipid Res* **41**(1): 66-97.
310. Orgogozo, J. M., S. Gilman, et al. (2003). "Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization." *Neurology* **61**(1): 46-54.
311. Papassotiropoulos, A., D. Lutjohann, et al. (2002). "24S-hydroxycholesterol in cerebrospinal fluid is elevated in early stages of dementia." *J Psychiatr Res* **36**(1): 27-32.
312. Papassotiropoulos, A., D. Lutjohann, et al. (2000). "Plasma 24S-hydroxycholesterol: a peripheral indicator of neuronal degeneration and potential state marker for Alzheimer's disease." *Neuroreport* **11**(9): 1959-62.
313. Parsons, R. B., G. C. Price, et al. (2006). "Statins inhibit the dimerization of beta-secretase via both isoprenoid- and cholesterol-mediated mechanisms." *Biochem J* **399**(2): 205-14.
314. Parvathy, S., I. Hussain, et al. (1999). "Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by alpha-secretase occurs at the surface of neuronal cells." *Biochemistry* **38**(30): 9728-34.
315. Patton, R. L., W. M. Kalback, et al. (2006). "Amyloid-beta peptide remnants in AN-1792-immunized Alzheimer's disease patients: a biochemical analysis." *Am J Pathol* **169**(3): 1048-63.
316. Perez, R. G., S. Soriano, et al. (1999). "Mutagenesis identifies new signals for beta-amyloid precursor protein endocytosis, turnover, and the generation of secreted fragments, including Abeta42." *J Biol Chem* **274**(27): 18851-6.

-
317. Pietrzik, C. U., J. Hoffmann, et al. (1998). "From differentiation to proliferation: the secretory amyloid precursor protein as a local mediator of growth in thyroid epithelial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(4): 1770-5.
318. Pike, C. J., R. Balazs, et al. (1996). "Attenuation of beta-amyloid neurotoxicity in vitro by potassium-induced depolarization." *J Neurochem* **67**(4): 1774-7.
319. Pike, C. J., B. J. Cummings, et al. (1992). "beta-Amyloid induces neuritic dystrophy in vitro: similarities with Alzheimer pathology." *Neuroreport* **3**(9): 769-72.
320. Pike, C. J., B. J. Cummings, et al. (1994). "Beta-amyloid-induced changes in cultured astrocytes parallel reactive astrocytosis associated with senile plaques in Alzheimer's disease." *Neuroscience* **63**(2): 517-31.
321. Pike, C. J., A. J. Walencewicz-Wasserman, et al. (1995). "Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: contributions of the beta 25-35 region to aggregation and neurotoxicity." *J Neurochem* **64**(1): 253-65.
322. Pike, L. J. (2004). "Lipid rafts: heterogeneity on the high seas." *Biochem J* **378**(Pt 2): 281-92.
323. Pollack, S. J. and H. Lewis (2005). "Secretase inhibitors for Alzheimer's disease: challenges of a promiscuous protease." *Curr Opin Investig Drugs* **6**(1): 35-47.
324. Postina, R., A. Schroeder, et al. (2004). "A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model." *J Clin Invest* **113**(10): 1456-64.
325. Puglielli, L., G. Konopka, et al. (2001). "Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase modulates the generation of the amyloid beta-peptide." *Nat Cell Biol* **3**(10): 905-12.
326. Puglielli, L., R. E. Tanzi, et al. (2003). "Alzheimer's disease: the cholesterol connection." *Nat Neurosci* **6**(4): 345-51.
327. Qi-Takahara, Y., M. Morishima-Kawashima, et al. (2005). "Longer forms of amyloid beta protein: implications for the mechanism of intramembrane cleavage by gamma-secretase." *J Neurosci* **25**(2): 436-45.
328. Racchi, M., R. Baetta, et al. (1997). "Secretory processing of amyloid precursor protein is inhibited by increase in cellular cholesterol content." *Biochem J* **322** (Pt 3): 893-8.
329. Rajanikant, G. K., D. Zemke, et al. (2007). "The therapeutic potential of statins in neurological disorders." *Curr Med Chem* **14**(1): 103-12.
330. Ramirez, O. T. and R. Mutharasan (1992). "Effect of serum on the plasma membrane fluidity of hybridomas: an insight into its shear protective mechanism." *Biotechnol Prog* **8**(1): 40-50.
331. Ramsden, M., Z. Henderson, et al. (2002). "Modulation of Ca²⁺ channel currents in primary cultures of rat cortical neurones by amyloid beta protein (1-40) is dependent on solubility status." *Brain Res* **956**(2): 254-61.
332. Ramsden, M., L. D. Plant, et al. (2001). "Differential effects of unaggregated and aggregated amyloid beta protein (1-40) on K(+) channel currents in primary cultures of rat cerebellar granule and cortical neurones." *J Neurochem* **79**(3): 699-712.
333. Rapp, M. A., M. Schnaider-Beeri, et al. (2006). "Increased hippocampal plaques and tangles in patients with Alzheimer disease with a lifetime history of major depression." *Arch Gen Psychiatry* **63**(2): 161-7.
334. Refolo, L. M., B. Malester, et al. (2000). "Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model." *Neurobiol Dis* **7**(4): 321-31.
335. Refolo, L. M., M. A. Pappolla, et al. (2001). "A cholesterol-lowering drug reduces beta-amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease." *Neurobiol Dis* **8**(5): 890-9.
336. Reinhard, C., S. S. Hebert, et al. (2005). "The amyloid-beta precursor protein: integrating structure with biological function." *Embo J* **24**(23): 3996-4006.
337. Riddell, D. R., G. Christie, et al. (2001). "Compartmentalization of beta-secretase (Asp2) into low-buoyant density, noncaveolar lipid rafts." *Curr Biol* **11**(16): 1288-93.
338. Riddell, D. R., X. M. Sun, et al. (2001). "Localization of apolipoprotein E receptor 2 to caveolae in the plasma membrane." *J Lipid Res* **42**(6): 998-1002.

-
339. Roberson, E. D. and L. Mucke (2006). "100 years and counting: prospects for defeating Alzheimer's disease." *Science* **314**(5800): 781-4.
340. Robinson, S. R., G. M. Bishop, et al. (2004). "Lessons from the AN 1792 Alzheimer vaccine: lest we forget." *Neurobiol Aging* **25**(5): 609-15.
341. Rocchi, A., S. Pellegrini, et al. (2003). "Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease: a review." *Brain Res Bull* **61**(1): 1-24.
342. Rodal, S. K., G. Skretting, et al. (1999). "Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles." *Mol Biol Cell* **10**(4): 961-74.
343. Runz, H., J. Rietdorf, et al. (2002). "Inhibition of intracellular cholesterol transport alters presenilin localization and amyloid precursor protein processing in neuronal cells." *J Neurosci* **22**(5): 1679-89.
344. Saito, F., A. Tani, et al. (1995). "N-linked oligosaccharide of beta-amyloid precursor protein (beta APP) of C6 glioma cells: putative regulatory role in beta APP processing." *Biochem Biophys Res Commun* **210**(3): 703-10.
345. Saitoh, T., M. Sundsmo, et al. (1989). "Secreted form of amyloid beta protein precursor is involved in the growth regulation of fibroblasts." *Cell* **58**(4): 615-22.
346. Salem, N., Jr. and C. D. Niebylski (1995). "The nervous system has an absolute molecular species requirement for proper function." *Mol Membr Biol* **12**(1): 131-4.
347. Sandhu, S. K. and G. Kaur (2002). "Alterations in oxidative stress scavenger system in aging rat brain and lymphocytes." *Biogerontology* **3**(3): 161-73.
348. Sastre, M., H. Steiner, et al. (2001). "Presenilin-dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch." *EMBO Rep* **2**(9): 835-41.
349. Saunders, A. M., W. J. Strittmatter, et al. (1993). "Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease." *Neurology* **43**(8): 1467-72.
350. Schachter, M. (2005). "Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update." *Fundam Clin Pharmacol* **19**(1): 117-25.
351. Schachter, M. (2005). "Strategies for modifying high-density lipoprotein cholesterol: a role for nicotinic acid." *Cardiovasc Drugs Ther* **19**(6): 415-22.
352. Scheltens, P. (1999). "Early diagnosis of dementia: neuroimaging." *J Neurol* **246**(1): 16-20.
353. Schenk, D., R. Barbour, et al. (1999). "Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse." *Nature* **400**(6740): 173-7.
354. Scheuermann, S., B. Hamsch, et al. (2001). "Homodimerization of amyloid precursor protein and its implication in the amyloidogenic pathway of Alzheimer's disease." *J Biol Chem* **276**(36): 33923-9.
355. Schmechel, D. E., A. M. Saunders, et al. (1993). "Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(20): 9649-53.
356. Schmitz, G. and W. E. Kaminski (2001). "ABC transporters and cholesterol metabolism." *Front Biosci* **6**: D505-14.
357. Schmitz, G. and E. Orso (2001). "Intracellular cholesterol and phospholipid trafficking: comparable mechanisms in macrophages and neuronal cells." *Neurochem Res* **26**(8-9): 1045-68.
358. Schneider, A., W. Schulz-Schaeffer, et al. (2006). "Cholesterol depletion reduces aggregation of amyloid-beta peptide in hippocampal neurons." *Neurobiol Dis* **23**(3): 573-7.
359. Schonknecht, P., D. Lutjohann, et al. (2002). "Cerebrospinal fluid 24S-hydroxycholesterol is increased in patients with Alzheimer's disease compared to healthy controls." *Neurosci Lett* **324**(1): 83-5.
360. Schroeder, F., W. J. Morrison, et al. (1988). "Transbilayer effects of ethanol on fluidity of brain membrane leaflets." *Biochim Biophys Acta* **946**(1): 85-94.
361. Schupf, N., B. Patel, et al. (2001). "Elevated plasma amyloid beta-peptide 1-42 and onset of dementia in adults with Down syndrome." *Neurosci Lett* **301**(3): 199-203.

-
362. Selkoe, D. J. (1994). "Alzheimer's disease beyond 1994: the path to therapeutics." *Neurobiol Aging* **15 Suppl 2**: S131-3.
363. Selkoe, D. J. (1994). "Alzheimer's disease: a central role for amyloid." *J Neuropathol Exp Neurol* **53**(5): 438-47.
364. Selkoe, D. J. (1994). "Amyloid beta-protein precursor: new clues to the genesis of Alzheimer's disease." *Curr Opin Neurobiol* **4**(5): 708-16.
365. Selkoe, D. J. (1994). "Cell biology of the amyloid beta-protein precursor and the mechanism of Alzheimer's disease." *Annu Rev Cell Biol* **10**: 373-403.
366. Selkoe, D. J. (1994). "Normal and abnormal biology of the beta-amyloid precursor protein." *Annu Rev Neurosci* **17**: 489-517.
367. Selkoe, D. J. (1996). "Cell biology of the beta-amyloid precursor protein and the genetics of Alzheimer's disease." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **61**: 587-96.
368. Selkoe, D. J. (2001). "Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy." *Physiol Rev* **81**(2): 741-66.
369. Selkoe, D. J., T. Yamazaki, et al. (1996). "The role of APP processing and trafficking pathways in the formation of amyloid beta-protein." *Ann N Y Acad Sci* **777**: 57-64.
370. Shivers, B. D., C. Hilbich, et al. (1988). "Alzheimer's disease amyloidogenic glycoprotein: expression pattern in rat brain suggests a role in cell contact." *Embo J* **7**(5): 1365-70.
371. Sidera, C., C. Liu, et al. (2002). "Pro-domain removal in ASP-2 and the cleavage of the amyloid precursor are influenced by pH." *BMC Biochem* **3**: 25.
372. Sidera, C., R. Parsons, et al. (2004). "Proteolytic cascade in the amyloidogenesis of Alzheimer's disease." *Biochem Soc Trans* **32**(Pt 1): 33-6.
373. Sidera, C., R. Parsons, et al. (2005). "Post-translational processing of beta-secretase in Alzheimer's disease." *Proteomics* **5**(6): 1533-43.
374. Sidera, C., R. Parsons, et al. (2005). "The regulation of beta-secretase by cholesterol and statins in Alzheimer's disease." *J Neurol Sci* **229-230**: 269-73.
375. Siemers, E., M. Skinner, et al. (2005). "Safety, tolerability, and changes in amyloid beta concentrations after administration of a gamma-secretase inhibitor in volunteers." *Clin Neuropharmacol* **28**(3): 126-32.
376. Siemers, E. R., J. F. Quinn, et al. (2006). "Effects of a gamma-secretase inhibitor in a randomized study of patients with Alzheimer disease." *Neurology* **66**(4): 602-4.
377. Simes, J., C. D. Furberg, et al. (2002). "Effects of pravastatin on mortality in patients with and without coronary heart disease across a broad range of cholesterol levels. The Prospective Pravastatin Pooling project." *Eur Heart J* **23**(3): 207-15.
378. Simes, R. J., I. C. Marschner, et al. (2002). "Relationship between lipid levels and clinical outcomes in the Long-term Intervention with Pravastatin in Ischemic Disease (LIPID) Trial: to what extent is the reduction in coronary events with pravastatin explained by on-study lipid levels?" *Circulation* **105**(10): 1162-9.
379. Simons, K. and R. Ehehalt (2002). "Cholesterol, lipid rafts, and disease." *J Clin Invest* **110**(5): 597-603.
380. Simons, K. and E. Ikonen (1997). "Functional rafts in cell membranes." *Nature* **387**(6633): 569-72.
381. Simons, K. and E. Ikonen (2000). "How cells handle cholesterol." *Science* **290**(5497): 1721-6.
382. Simons, K. and D. Toomre (2000). "Lipid rafts and signal transduction." *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**(1): 31-9.
383. Simons, L. A. (1998). "Comparison of atorvastatin alone versus simvastatin +/- cholestyramine in the management of severe primary hypercholesterolaemia (the six cities study)." *Aust N Z J Med* **28**(3): 327-33.
384. Simons, M., P. Keller, et al. (1998). "Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(11): 6460-4.
385. Simons, M., E. M. Kramer, et al. (2000). "Assembly of myelin by association of proteolipid protein with cholesterol- and galactosylceramide-rich membrane domains." *J Cell Biol* **151**(1): 143-54.

-
386. Simons, M., F. Schwarzler, et al. (2002). "Treatment with simvastatin in normocholesterolemic patients with Alzheimer's disease: A 26-week randomized, placebo-controlled, double-blind trial." Ann Neurol **52**(3): 346-50.
387. Sing, C. F. and J. Davignon (1985). "Role of the apolipoprotein E polymorphism in determining normal plasma lipid and lipoprotein variation." Am J Hum Genet **37**(2): 268-85.
388. Singer, S. J. (1972). "A fluid lipid-globular protein mosaic model of membrane structure." Ann N Y Acad Sci **195**: 16-23.
389. Skovronsky, D. M., R. W. Doms, et al. (1998). "Detection of a novel intraneuronal pool of insoluble amyloid beta protein that accumulates with time in culture." J Cell Biol **141**(4): 1031-9.
390. Slotte, J. P. (1997). "Cholesterol-sphingomyelin interactions in cells--effects on lipid metabolism." Subcell Biochem **28**: 277-93.
391. Small, D. H. (2005). "Acetylcholinesterase inhibitors for the treatment of dementia in Alzheimer's disease: do we need new inhibitors?" Expert Opin Emerg Drugs **10**(4): 817-25.
392. Small, D. H., D. Losic, et al. (2004). "Alzheimer's disease therapeutics: new approaches to an ageing problem." IUBMB Life **56**(4): 203-8.
393. Small, D. H., V. Nurcombe, et al. (1994). "A heparin-binding domain in the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is involved in the regulation of neurite outgrowth." J Neurosci **14**(4): 2117-27.
394. Soba, P., S. Eggert, et al. (2005). "Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion." Embo J **24**(20): 3624-34.
395. Soto, P., R. P. Natzke, et al. (2003). "Actions of tumor necrosis factor-alpha on oocyte maturation and embryonic development in cattle." Am J Reprod Immunol **50**(5): 380-8.
396. Sparks, D. L., S. W. Scheff, et al. (1994). "Induction of Alzheimer-like beta-amyloid immunoreactivity in the brains of rabbits with dietary cholesterol." Exp Neurol **126**(1): 88-94.
397. Standridge, J. B. (2004). "Pharmacotherapeutic approaches to the prevention of Alzheimer's disease." Am J Geriatr Pharmacother **2**(2): 119-32.
398. Standridge, J. B. (2006). "Vicious cycles within the neuropathophysiologic mechanisms of Alzheimer's disease." Curr Alzheimer Res **3**(2): 95-108.
399. Struhl, G. and A. Adachi (2000). "Requirements for presenilin-dependent cleavage of notch and other transmembrane proteins." Mol Cell **6**(3): 625-36.
400. Subtil, A., I. Gaidarov, et al. (1999). "Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(12): 6775-80.
401. Svennerholm, L., K. Bostrom, et al. (1994). "Membrane lipids of adult human brain: lipid composition of frontal and temporal lobe in subjects of age 20 to 100 years." J Neurochem **63**(5): 1802-11.
402. Tan, Z. S., S. Seshadri, et al. (2003). "Plasma total cholesterol level as a risk factor for Alzheimer disease: the Framingham Study." Arch Intern Med **163**(9): 1053-7.
403. Tanaka, S., S. Nakamura, et al. (1988). "Three types of amyloid protein precursor mRNA in human brain: their differential expression in Alzheimer's disease." Biochem Biophys Res Commun **157**(2): 472-9.
404. Tang, B. L. (2005). "Alzheimer's disease: channeling APP to non-amyloidogenic processing." Biochem Biophys Res Commun **331**(2): 375-8.
405. Tanzi, R. E., A. I. McClatchey, et al. (1988). "Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease." Nature **331**(6156): 528-30.
406. Terry, R. D., E. Masliah, et al. (1991). "Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment." Ann Neurol **30**(4): 572-80.
407. Tsai, L. H., M. S. Lee, et al. (2004). "Cdk5, a therapeutic target for Alzheimer's disease?" Biochim Biophys Acta **1697**(1-2): 137-42.
408. Tun, H., L. Marlow, et al. (2002). "Lipid rafts play an important role in A beta biogenesis by regulating the beta-secretase pathway." J Mol Neurosci **19**(1-2): 31-5.

-
409. Turley, S. D., D. K. Burns, et al. (1998). "Preferential utilization of newly synthesized cholesterol for brain growth in neonatal lambs." *Am J Physiol* **274**(6 Pt 1): E1099-105.
410. Turner, C. (2001). "Advances in therapeutic neurology." *Practitioner* **245**(1623): 551-5.
411. Turner, C. and A. H. Schapira (2001). "Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disorders and ageing." *Adv Exp Med Biol* **487**: 229-51.
412. Turner, P. R., K. O'Connor, et al. (2003). "Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory." *Prog Neurobiol* **70**(1): 1-32.
413. Turner, R. S. (2001). "Alzheimer's disease in man and transgenic mice: females at higher risk." *Am J Pathol* **158**(3): 797-801.
414. Turner, R. S. (2006). "Alzheimer's disease." *Semin Neurol* **26**(5): 499-506.
415. Uittenbogaard, A., Y. Ying, et al. (1998). "Characterization of a cytosolic heat-shock protein-caveolin chaperone complex. Involvement in cholesterol trafficking." *J Biol Chem* **273**(11): 6525-32.
416. Van Blitterswijk, W. J., R. P. Van Hoeven, et al. (1981). "Lipid structural order parameters (reciprocal of fluidity) in biomembranes derived from steady-state fluorescence polarization measurements." *Biochim Biophys Acta* **644**(2): 323-32.
417. Vassar, R. (2004). "BACE1: the beta-secretase enzyme in Alzheimer's disease." *J Mol Neurosci* **23**(1-2): 105-14.
418. Vassar, R., B. D. Bennett, et al. (1999). "Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE." *Science* **286**(5440): 735-41.
419. Wahrle, S., P. Das, et al. (2002). "Cholesterol-dependent gamma-secretase activity in buoyant cholesterol-rich membrane microdomains." *Neurobiol Dis* **9**(1): 11-23.
420. Walsh, D. M., I. Klyubin, et al. (2002). "Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo." *Nature* **416**(6880): 535-9.
421. Walsh, D. M., I. Klyubin, et al. (2002). "Amyloid-beta oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition." *Biochem Soc Trans* **30**(4): 552-7.
422. Walsh, D. M., A. Lomakin, et al. (1997). "Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate." *J Biol Chem* **272**(35): 22364-72.
423. Walsh, D. M., B. P. Tseng, et al. (2000). "The oligomerization of amyloid beta-protein begins intracellularly in cells derived from human brain." *Biochemistry* **39**(35): 10831-9.
424. Walsh, D. T., R. M. Montero, et al. (2002). "Amyloid-beta peptide is toxic to neurons in vivo via indirect mechanisms." *Neurobiol Dis* **10**(1): 20-7.
425. Walsh, E. and J. Dourish (2002). "Prolonged QT interval with rivastigmine." *Br J Psychiatry* **180**: 466.
426. Walsh, M. T. (1999). "A novel amyloidogenic variant of apolipoprotein AI: implications for a conformational change leading to cardiomyopathy." *Am J Pathol* **154**(1): 11-4.
427. Walter, J., R. Fluhner, et al. (2001). "Phosphorylation regulates intracellular trafficking of beta-secretase." *J Biol Chem* **276**(18): 14634-41.
428. Walter, J., C. Kaether, et al. (2001). "The cell biology of Alzheimer's disease: uncovering the secrets of secretases." *Curr Opin Neurobiol* **11**(5): 585-90.
429. Wang, J., D. W. Dickson, et al. (1999). "The levels of soluble versus insoluble brain A β distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging." *Exp Neurol* **158**(2): 328-37.
430. Weidemann, A., S. Eggert, et al. (2002). "A novel epsilon-cleavage within the transmembrane domain of the Alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with Notch processing." *Biochemistry* **41**(8): 2825-35.
431. Weidemann, A., G. Konig, et al. (1989). "Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein." *Cell* **57**(1): 115-26.
432. Weidemann, A., K. Paliga, et al. (1997). "Formation of stable complexes between two Alzheimer's disease gene products: presenilin-2 and beta-amyloid precursor protein." *Nat Med* **3**(3): 328-32.

-
433. Westmeyer, G. G., M. Willem, et al. (2004). "Dimerization of beta-site beta-amyloid precursor protein-cleaving enzyme." *J Biol Chem* **279**(51): 53205-12.
434. Wolozin, B., W. Kellman, et al. (2000). "Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors." *Arch Neurol* **57**(10): 1439-43.
435. Wolozin, B., J. Manger, et al. (2006). "Re-assessing the relationship between cholesterol, statins and Alzheimer's disease." *Acta Neurol Scand Suppl* **185**: 63-70.
436. Wong, G. T., D. Manfra, et al. (2004). "Chronic treatment with the gamma-secretase inhibitor LY-411,575 inhibits beta-amyloid peptide production and alters lymphopoiesis and intestinal cell differentiation." *J Biol Chem* **279**(13): 12876-82.
437. Wood, S. J., W. Chan, et al. (1996). "Seeding of A beta fibril formation is inhibited by all three isoforms of apolipoprotein E." *Biochemistry* **35**(38): 12623-8.
438. Wood, S. J., L. MacKenzie, et al. (1996). "Selective inhibition of A beta fibril formation." *J Biol Chem* **271**(8): 4086-92.
439. Wood, W. G., N. A. Avdulov, et al. (2001). "Lipid carrier proteins and ethanol." *J Biomed Sci* **8**(1): 114-8.
440. Wood, W. G. and U. Igbavboa (2003). "Cholesterol trafficking and amyloid beta peptides." *Pharmacopsychiatry* **36 Suppl 2**: S144-8.
441. Wood, W. G., U. Igbavboa, et al. (2005). "Is hypercholesterolemia a risk factor for Alzheimer's disease?" *Mol Neurobiol* **31**(1-3): 185-92.
442. Wood, W. G., R. Strong, et al. (1984). "Changes in lipid composition of cortical synaptosomes from different age groups of mice." *Life Sci* **35**(19): 1947-52.
443. Xia, W. (2000). "Role of presenilin in gamma-secretase cleavage of amyloid precursor protein." *Exp Gerontol* **35**(4): 453-60.
444. Xia, W. (2001). "Amyloid metabolism and secretases in Alzheimer's disease." *Curr Neurol Neurosci Rep* **1**(5): 422-7.
445. Xia, W., B. L. Ostaszewski, et al. (2000). "FAD mutations in presenilin-1 or amyloid precursor protein decrease the efficacy of a gamma-secretase inhibitor: evidence for direct involvement of PS1 in the gamma-secretase cleavage complex." *Neurobiol Dis* **7**(6 Pt B): 673-81.
446. Xia, W., W. J. Ray, et al. (2000). "Presenilin complexes with the C-terminal fragments of amyloid precursor protein at the sites of amyloid beta-protein generation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(16): 9299-304.
447. Xia, W. and M. S. Wolfe (2003). "Intramembrane proteolysis by presenilin and presenilin-like proteases." *J Cell Sci* **116**(Pt 14): 2839-44.
448. Yaari, R. and J. Corey-Bloom (2007). "Alzheimer's disease." *Semin Neurol* **27**(1): 32-41.
449. Yamada, K. and N. Toshitaka (2002). "Therapeutic approaches to the treatment of Alzheimer's disease." *Drugs Today (Barc)* **38**(9): 631-7.
450. Yamada, M. (2002). "Risk factors for cerebral amyloid angiopathy in the elderly." *Ann N Y Acad Sci* **977**: 37-44.
451. Yamada, M., N. Sodeyama, et al. (2002). "No association of paraoxonase genotype or atherosclerosis with cerebral amyloid angiopathy." *Stroke* **33**(4): 896-900.
452. Yamada, T., H. Kadekaru, et al. (2002). "Prevalence of dementia in the older Japanese-Brazilian population." *Psychiatry Clin Neurosci* **56**(1): 71-5.
453. Yamamoto, N., K. Hasegawa, et al. (2004). "Environment- and mutation-dependent aggregation behavior of Alzheimer amyloid beta-protein." *J Neurochem* **90**(1): 62-9.
454. Yamamoto, Y. and S. Sakoda (2004). "[Presenile dementia with motor neuron disease]." *Nippon Rinsho* **62 Suppl**: 158-61.
455. Yamazaki, T., T. Y. Chang, et al. (2001). "Accumulation and aggregation of amyloid beta-protein in late endosomes of Niemann-pick type C cells." *J Biol Chem* **276**(6): 4454-60.

-
456. Yamazaki, T., E. H. Koo, et al. (1996). "Trafficking of cell-surface amyloid beta-protein precursor. II. Endocytosis, recycling and lysosomal targeting detected by immunolocalization." *J Cell Sci* **109** (Pt 5): 999-1008.
457. Yan, R., M. J. Bienkowski, et al. (1999). "Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity." *Nature* **402**(6761): 533-7.
458. Yanagisawa, K. (2005). "Cholesterol and amyloid beta fibrillogenesis." *Subcell Biochem* **38**: 179-202.
459. Yanagisawa, K. and Y. Ihara (1998). "GM1 ganglioside-bound amyloid beta-protein in Alzheimer's disease brain." *Neurobiol Aging* **19**(1 Suppl): S65-7.
460. Yanagisawa, K., J. McLaurin, et al. (1997). "Amyloid beta-protein (A beta) associated with lipid molecules: immunoreactivity distinct from that of soluble A beta." *FEBS Lett* **420**(1): 43-6.
461. Yanagisawa, K., A. Odaka, et al. (1995). "GM1 ganglioside-bound amyloid beta-protein (A beta): a possible form of preamyloid in Alzheimer's disease." *Nat Med* **1**(10): 1062-6.
462. Yang, M., B. Liu, et al. (2003). "Crystallization and preliminary crystallographic analysis of a partial extracellular fragment of a sperm membrane protein YWK-II/APPH related to the Alzheimer betaA4-amyloid precursor protein." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **59**(Pt 1): 146-9.
463. Yeagle, P. L. (1985). "Cholesterol and the cell membrane." *Biochim Biophys Acta* **822**(3-4): 267-87.
464. Yeagle, P. L. (1985). "Lanosterol and cholesterol have different effects on phospholipid acyl chain ordering." *Biochim Biophys Acta* **815**(1): 33-6.
465. Yeagle, P. L. (1991). "Modulation of membrane function by cholesterol." *Biochimie* **73**(10): 1303-10.
466. Yehuda, S., S. Rabinovitz, et al. (2002). "The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neuronal membrane." *Neurobiol Aging* **23**(5): 843-53.
467. Yip, C. M., E. A. Elton, et al. (2001). "Cholesterol, a modulator of membrane-associated Abeta-fibrillogenesis and neurotoxicity." *J Mol Biol* **311**(4): 723-34.
468. Yu, W., K. Zou, et al. (2005). "Oligomerization of amyloid beta-protein occurs during the isolation of lipid rafts." *J Neurosci Res* **80**(1): 114-9.
469. Zacharias, D. A., J. D. Violin, et al. (2002). "Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells." *Science* **296**(5569): 913-6.
470. Zajchowski, L. D. and S. M. Robbins (2002). "Lipid rafts and little caves. Compartmentalized signalling in membrane microdomains." *Eur J Biochem* **269**(3): 737-52.
471. Zha, Q., Y. Ruan, et al. (2004). "GM1 ganglioside regulates the proteolysis of amyloid precursor protein." *Mol Psychiatry* **9**(10): 946-52.
472. Zhang, Y., E. L. Appelkvist, et al. (1996). "The lipid compositions of different regions of rat brain during development and aging." *Neurobiol Aging* **17**(6): 869-75.
473. Zhao, F. G., Y. H. Wang, et al. (2005). "Association between acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase gene and risk for Alzheimer's disease in Chinese." *Neurosci Lett* **388**(1): 17-20.
474. Zhao, G., M. Z. Cui, et al. (2005). "gamma-Cleavage is dependent on zeta-cleavage during the proteolytic processing of amyloid precursor protein within its transmembrane domain." *J Biol Chem* **280**(45): 37689-97.
475. Zhao, G., G. Mao, et al. (2004). "Identification of a new presenilin-dependent zeta-cleavage site within the transmembrane domain of amyloid precursor protein." *J Biol Chem* **279**(49): 50647-50.
476. Zimmermann, M., F. Gardoni, et al. (2005). "Molecular rationale for the pharmacological treatment of Alzheimer's disease." *Drugs Aging* **22** Suppl 1: 27-37.

7.3. Abkürzungen

Abkürzung	Ausformulierung
Ab, Abeta	Amyloid Beta Peptid
AD	Alzheimer's disease
AICD	APP intracellular domain
ANOVA	Analysis of variance
APO E	Apolipoprotein E
APP	amyloid precursor protein
APP ^{sw}	Schwedische mutation von APP
APP ^{wt}	Wildtyp-APP
BSA	bovine serum albumin
°C	Grad Celsius
DAPT	N- {N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl} S-phenylglycine t-butyl ester
DMFA	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPH	Diphenylhexatrien
ECL	enhanced chemiluminescence
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FAD	familial Alzheimer's disease
FCS	fetal calf serum
g	Gramm
HBSS	Hanks balanced salt solution
HMG-CoA	Hydroxymethylglutaryl-CoA
KPI	Kunitz-Typ Protease Inhibitor
l	Liter
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
NAD	Nikotin Adenin Di-nukleotid
NADH	Nikotin Adenin Di-nukleotid, reduziert
PBS	phosphate buffered saline
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
P/S	Presenilin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
APPs	Soluble APP fragment
SDS	sodium dodecyl sulfate
SEM	standard error of mean
TMA-DPH	Trimethylamonium-diphenylhexatrien
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ut	untransfiziert
vs	versus
ZNS	Zentralnervensystem

7.4. Curriculum Vitae

PERSÖNLICHE ANGABEN:

Vor- und Zuname: Imke Peters
Geburtsdatum: 14.01.1979
Geburtsort: Bad Schwalbach
Staatsangehörigkeit: deutsch

AUSBILDUNG:

Promotion **01/2004 – 08/2007**

Doktorarbeit an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main unter der Leitung von Herrn Professor Dr. W.E. Müller

Dissertations-Thema: *„Untersuchungen zur Membranfluidität als regulatorisches Element der APP-Prozessierung“*

Studium **10/1998 – 05/2003**

Studium der Biochemie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main

06/2000 Vordiplom mit Note 1,0
10/2002 Diplom mit Note 1,0

Diplomarbeit: *„Klonierung, Expression, Reinigung und biophysikalische Charakterisierung der Subdomäne des humanen Typ I Interferonrezeptors Ifnar 1“*

Schulausbildung **1985 - 1998**

1985-1989 Grundschule
1989-1998 Pestalozzi-Gymnasium Idstein
19.06.1998 Abitur

MITGLIEDSCHAFTEN

Stipendiatin der Studienstiftung des deutschen Volkes
Mitglied der *Society for Neuroscience SfN*

7.5. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt:

Herrn Professor Dr. Walter Müller, unter dessen Leitung die vorliegende Dissertation entstanden ist

Herrn Priv. Doz. Dr. Donat Kögel für die Begutachtung der Arbeit

Herrn Dr. Gunter Eckert für die direkte Betreuung der Labortätigkeit, die vielen Freiräume, die er mir dabei gelassen hat und die freundschaftliche Atmosphäre

den bezaubernden Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Pharmakologischen Instituts, die die vergangenen dreieinhalb Jahre zu einer unvergesslichen Zeit gemacht haben

und meinen Freunden, die soviel Lebensfreude, Vertrauen und Musik in mein Leben bringen.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei der Alzheimer Forschungs Initiative AFI für die Finanzierung meiner Experimentierkünste.

Gewidmet ist diese Arbeit den vier wichtigsten Menschen in meinem Leben: Beate, Hans-Jürgen, Jan und Peter. Meine Dankbarkeit und Liebe für euch lässt sich nicht in Worten ausdrücken.