

**„Bedeutung post-translationaler Veränderungen kleiner  
Rho-GTPasen für Prozesse der Gehirnalterung und  
Neurodegeneration“**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

vorgelegt beim

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

von

Sarah Setareh Özkan, geborene Afshordel  
aus Kaiserslautern

Wiesbaden (2018)

(D30)

vom Fachbereich 14 der

Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. C. Glaubitz

Gutachter: Prof. Dr. G. P. Eckert  
Prof. Dr. J. Klein

Datum der Disputation: 09. Mai 2019



## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
1 Einleitung	7
1.1 <i>Cholesterol</i>	7
1.1.1 Cholesterinmetabolismus in der Peripherie des Körpers	8
1.1.2 Cholesterinmetabolismus im zentralen Nervensystem	9
1.1.3 Mevalonatweg	13
1.1.4 Regulation des Mevalonatweges im Zusammenhang mit der Gehirnalterung und der Alzheimer Demenz	16
1.2 <i>Isoprenoide</i>	19
1.3 <i>Kleine GTPasen</i>	21
1.3.1 Subfamilie der Ras-GTPasen	21
1.3.2 Subfamilie der Rho-GTPasen	22
1.3.3 Subfamilie der Rab-GTPasen	23
1.3.4 Subfamilie der Ran-GTPasen	24
1.3.5 Subfamilie der Arf-GTPasen	24
1.4 <i>Regulation kleiner GTPasen</i>	25
1.4.1 Posttranslationale Modifikation kleiner GTPasen	26
1.4.2 Prenyltransferasen	29
1.4.3 GDIs	32
1.4.4 GEFs	33
1.4.5 GAPs	35
1.5 <i>Neurotrophine</i>	37
1.5.1 NGF (nerve growth factor)	38
1.5.2 BDNF (brain derived neurotrophic factor)	39
1.5.3 Tyrosinkinase B (TrkB)-Rezeptor	40
1.6 <i>Alzheimer Demenz</i>	42
1.6.1 Epidemiologie der Alzheimer Demenz	42
1.6.2 Ätiologie der Morbus Alzheimer	42
1.6.3 APP Prozessierung	47
1.6.4 Sekretasen	50
1.6.5 Beta-Amyloid (A $\beta$ )	53
1.6.6 Neurotoxizität von Beta-Amyloid (A $\beta$ )	57
1.6.7 Cholesterol-Metabolismus und Alzheimer Demenz	59
1.6.8 Statine und Alzheimer Demenz	61
1.6.9 Isoprenoide, Rho-GTPasen und Alzheimer Demenz	63

1.7	<i>Gehirnalterung</i>	66
1.7.1	Demographische Alterung der deutschen Bevölkerung	66
1.7.2	Isoprenoide, Rho-GTPasen und und Gehirnalterung	67
1.7.3	7,8-Dihydroxyflavon	69
1.8	<i>Glioblastom (Glioblastoma multiforme)</i>	70
1.8.1	Isoprenoide, GTPasen und GBM	71
1.8.2	Perillylalkohol	72
1.8.3	Satine und Glioblastoma multiforme	73
1.9	<i>Zielsetzung der Arbeit</i>	77
1.9.1	Zielsetzung der Arbeit im Zusammenhang mit der Gehirnalterung	77
1.9.2	Zielsetzung der Arbeit im Zusammenhang mit der Alzheimer Demenz	78
1.9.3	Zielsetzung der Arbeit im Zusammenhang mit der Glioblastoma multiforme	79
2	<i>Materialien</i>	81
2.1	<i>Allgemeine Chemikalien</i>	81
2.2	<i>Geräte und Materialien</i>	86
2.2.1	Materialien	86
2.2.2	Geräte	87
2.2.3	Software	89
2.3	<i>Western Blot Antikörper</i>	90
2.3.1	Primärantikörper	90
2.3.2	Sekundärantikörper	91
2.4	<i>Kits</i>	91
2.5	<i>Zelllinien</i>	92
2.6	<i>Biologische Proben</i>	93
2.7	<i>Lösungen und Puffer</i>	93
2.7.1	PBS-Puffer	93
2.7.2	Tris-HCl-Puffer	93
2.7.3	Lösungen für die Cholesterin-Bestimmung	93
2.7.4	Lösungen für Isolierung der Isoprenoide aus Zellen	93
2.7.5	Lösungen für die Isolierung der Isoprenoide aus Gewebe	94
2.7.6	Lösungen und Puffer für die Probenderivatisierung der Isoprenoid-Bestimmung mittels HPLC	94
2.7.7	Eluenten für die Isoprenoid-Bestimmung mittels HPLC	95
2.7.8	Puffer und Lösungen für die Western Blot-Analyse	96

2.7.9	Puffer für die Trennung von Membran- und cytosolischer Fraktion aus Zellen	98
2.7.10	Puffer für die Trennung von Membran- und cytosolischer Fraktion aus Hirngewebe	99
2.7.11	Puffer für die Präparation der cytosolischen Fraktion zur Bestimmung der GGTase-Aktivität aus Zellen oder Hirngewebe	99
2.7.12	Lösungen für den MTT-Assay	100
2.7.13	Lösungen für den Kristallviolett-Assay	100
2.8	<i>Zellkultur-Medien</i>	101
2.8.1	SH-SY5Y-Zellen	101
2.8.2	HEK293-Zellen	102
2.8.3	Humane Astrozyten	102
2.8.4	Glioblastoma-Zelllinien	103
2.8.5	Medium zum Einfrieren von Zellen	103
2.8.6	Medium für die Zell-Behandlung mit Inhibitoren oder Modulatoren	104
3	Methoden	105
3.1	<i>Zellkultur - Methoden</i>	105
3.1.1	Passagieren	105
3.1.2	Einfrieren	106
3.1.3	Auftauen	107
3.1.4	Zellernte	107
3.1.5	Bestimmung der Zellzahl	107
3.1.6	Präparation des Kulturmediums für die A $\beta$ -Bestimmung	108
3.1.7	Inhibitor-Inkubationsprotokolle	108
3.2	<i>Biologische Proben</i>	110
3.2.1	Humane Hirn-Proben von Patienten mit Alzheimer Demenz	110
3.2.2	Murine Hirn-Proben	110
3.2.3	Präparation von Gewebe	113
3.3	<i>Methoden zur biochemische Charakterisierung</i>	114
3.3.1	BCA Proteinbestimmung	114
3.3.2	Gesamtcholesterin-Bestimmung	114
3.3.3	Bestimmung von A $\beta$ (1-42) mittels ELISA	115
3.3.4	Trennung von Membran – und cytosolischer Fraktion	115
3.3.5	Western Blot – Analyse	117
3.3.6	RNA Isolierung, Reverse Transkription, Primer Design und qRT-PCR	121

3.3.7	Isolierung der Isoprenoide aus Zellen	122
3.3.8	Isolierung der Isoprenoide aus Gewebe	123
3.3.9	Proben-Derivatisierung für die Isoprenoidbestimmung mittels HPLC	124
3.3.10	Derivatisierung der Standards für die Isoprenoidbestimmung mittels HPLC	124
3.3.11	Chromatographische Konditionen des HPLC-FD-Systems für die Isoprenoidbestimmung	125
3.3.12	Bestimmung der relativen GGTase-Aktivität aus Zellen oder Hirngewebe	125
3.3.13	MTT-Assay	126
3.3.14	Kristallviolett-Assay	128
3.3.15	Migrations-Assay	129
3.3.16	Invasions-Assay	130
3.4	<i>Statistik</i>	131
4	Ergebnisse	132
4.1	<i>Gehirnalterung</i>	132
4.1.1	Zelluläre Verteilung von Rho- und Rab-GTPasen in Hirngewebe junger und alter C57BL/6 Mäuse	134
4.1.2	GGPP, GGTase-Aktivität, GGTase-I $\beta$ -Protein- und Gen-Expression in Hirngewebe junger und alter C57BL/6 Mäuse	141
4.1.3	Synaptische Markerproteine Synaptophysin und GAP-43 in Hirngewebe junger und alter C57BL/6 Mäuse	143
4.1.4	Relative GGTase-Aktivität in Hirngewebe junger und alter NMRI-Mäuse, Inhibition der GGTase-I mittels GGTI-286	144
4.1.5	Inhibition der GGTase-I mittels GGTI-2133 in SH-SY5Y Zellen	147
4.2	<i>7,8-Dihydroxyflavon (7, 8-DHF)</i>	155
4.2.1	Pharmakologische Wirkung von 7, 8-Dihydroxyflavon in Hirngewebe junger und alter C57BL/6 Mäuse	155
4.3	<i>Morbus Alzheimer</i>	161
4.3.1	Sekretion von A $\beta$ <sub>1-42</sub> in HEK293 Zellen mit verschiedenen APP-Transfektionen	161
4.3.2	Einfluss der $\beta$ -Sekretase-Inhibition auf A $\beta$ <sub>1-42</sub> in HEK293 Zellen mit verschiedenen APP-Transfektionen	162
4.3.3	Einfluss der $\gamma$ -Sekretase-Inhibition auf A $\beta$ <sub>1-42</sub> in HEK293 Zellen mit verschiedenen APP-Transfektionen	163
4.3.4	$\gamma$ -Sekretase-Inhibition mittels DAPT	164

4.3.5	Zusammenfassung: Isoprenoide und GTPasen in HEK293 Zellen mit verschiedenen APP-Transfektionen	178
4.3.6	Zusammenfassung: Effekte der $\gamma$ -Sekretase-Inhibition auf Isoprenoide und GTPasen in HEK293 Zellen mit verschiedenen APP-Transfektionen	181
4.3.7	$\beta$ -Sekretase-Inhibition mittels $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV	183
4.3.8	Zusammenfassung: Effekte der $\beta$ -Sekretase-Inhibition auf Isoprenoide und GTPasen in HEK293 Zellen mit verschiedenen APP-Transfektionen	189
4.3.9	Effekte von oligomerisiertem A $\beta$ auf GGPP, FPP und Cholesterol in untransfizierten HEK293 Zellen	191
4.4	<i>Glioblastom (Glioblastoma multiforme)</i>	193
4.4.1	Einfluss von Lovastatin und Perillylalkohol auf die Migration und Invasion von GBM-Zellen	197
4.4.2	Einfluss von Lovastatin und Perillylalkohol auf die Proliferation von GBM-Zellen	200
4.4.3	Einfluss von Lovastatin und Perillylalkohol auf die ERK-Signalwirkung in GBM-Zellen	202
4.4.4	Einfluss von Lovastatin und Perillylalkohol auf die zelluläre Lokalisation kleiner GTPasen	204
4.4.5	Einfluss von Lovastatin und Perillylalkohol auf Intermediate des Mevalonatweges	209
5	Diskussion	211
5.1	<i>Gehirnalterung</i>	211
5.2	<i>7, 8-Dihydroxyflavon</i>	219
5.3	<i>Morbus Alzheimer</i>	223
5.3.1	A $\beta$ und Cholesterol	224
5.3.2	A $\beta$ und die Isoprenoide FPP und GGPP	226
5.3.3	A $\beta$ und kleine GTPasen	227
5.3.4	Inhibition der $\gamma$ -Sekretase mittels DAPT	229
5.3.5	Inhibition der $\beta$ -Sekretase mittels $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV	232
5.4	<i>Glioblastoma multiforme</i>	236

## Inhaltsverzeichnis

6 Zusammenfassung	241
Bibliographie	243
Abkürzungen	314
Abbildungsverzeichnis	319
Tabellenverzeichnis	334
Publikationen	335

# 1 Einleitung

## 1.1 Cholesterol

Cholesterin ist ein polyzyklischer Alkohol und wird als Steroid auch den Lipiden zugeordnet. Cholesterin, das sich im menschlichen Organismus befindet kann einerseits über die Nahrung aufgenommen oder über den sogenannten Mevalonatweg de novo synthetisiert werden (Goldstein & Brown, 1990). Nur etwa 10% des Cholesterins wird über die Nahrung aufgenommen. Der Grossteil von bis zu 90% des Cholesterols wird im Körper synthetisiert. Nahezu jede Zelle ist in der Lage Cholesterin zu synthetisieren. Jedoch spielt die Leber für die de novo Synthese und den Metabolismus von Cholesterin eine besondere Rolle (van der Wulp, Verkade, & Groen, 2013), da in den Hepatozyten das Cholesterin in einem hohen Maße synthetisiert wird. Aber auch andere Zelltypen sind in der Lage Cholesterin zu bilden. So findet die Cholesterinbiosynthese in geringerem Maße auch in der Darmmukosa, den Nebennieren, der Haut, der gestreiften Muskulatur, dem Knochenmark und den Gonaden statt. Das Gehirn ist durch die Blut-Hirn-Schranke von dem peripheren Cholesterin-Kreislauf getrennt und reguliert seinen Cholesterinhaushalt autonom (Frank W Pfrieger & Ungerer, 2011). Aus diesem Grund ist die Cholesterinbiosynthese im Gehirn von besonders hoher Bedeutung.

Als essentieller Bestandteil von Plasmamembranen ist Cholesterin ein wichtiger Regulator ihrer Struktur und Funktionen (M. Simons et al., 1998; Yeagle, 1989). Eine weitere physiologische Funktion des Cholesterins übt es als Bestandteil von Lipoproteinkomplexen und daher bei dem Transport von Lipiden und lipidlöslichen Substanzen im kardiovaskulären System aus, wobei Hypercholesterinämie einen relevanten Risikofaktor für Arteriosklerose und koronare Herzerkrankungen darstellt (Kannel, Castelli, Gordon, & McNamara, 1971). Auch für den ischämischen Schlaganfall bedeutet ein erhöhter Blutcholesterinspiegel ein leicht erhöhtes Risiko, wohingegen verringerte Cholesterinspiegel die Entwicklung eines hämorrhagischen Schlaganfalls begünstigen (Iso, Jacobs, Wentworth, Neaton, & Cohen, 1989). Cholesterin ist außerdem Vorstufe von Cholecalciferol (Vitamin D3), Gallensäuren und Steroidhormonen (Carbone et al., 2008).

In Bezug auf die Gehirnalterung ist erhöhtes Serum-Cholesterol mit einem erhöhten altersbedingten kognitiven Rückgang und einer verringerten neuronalen

Vernetzung assoziiert (Spielberg et al., 2017). Untersuchungen von Gen-Interaktionen an Senioren, die 85 Jahre oder älter sind, geben Hinweise darauf, dass speziell im Gehirn eine Verbindung zwischen diversen Genen des Cholesterin-Metabolismus und der Gehirnalterung besteht. Ähnliche Hinweise wurden entdeckt, die Verbindungen zwischen dem Cholesterin-Metabolismus und der Alzheimer Demenz aufzeigen (Tindale, Leach, Spinelli, & Brooks-Wilson, 2017).

### 1.1.1 Cholesterinmetabolismus in der Peripherie des Körpers

Außerhalb des Gehirns wird die Cholesterinhomeostase über die Zirkulation der Lipoproteine zwischen dem Verdauungstrakt, der Leber und anderen Organen und Geweben über das Blutgefäßsystem geregelt. Da das Cholesterin durch seine steroidale Struktur nur minimal in Wasser löslich ist, wird es über Apolipoproteine assoziiert im Blut transportiert. Die Apolipoproteine sind der Proteinanteil der Lipoproteine, welcher die wasserunlöslichen Lipide im Blut transportiert. Die Apolipoproteine lagern sich um die Lipide an und sind dabei über elektrostatische Wechselwirkungen und van der Waals-Kräfte mit den Lipiden verbunden. Bei den dadurch gebildeten Komplexen aus Apolipoproteinen, Cholesterin, Cholesterylester, Triglyceriden und Phospholipiden befinden sich die Phospholipide, die hydrophilen Anteile der Apolipoproteine und die Hydroxylgruppen von unverestertem Cholesterin an der Außenseite und umschließen den lipophilen Anteil. Diese Komplexe werden auch als Pseudomizellen bezeichnet und bedingen durch ihren Aufbau die Löslichkeit im Blut. Es existieren neun Typen von Apolipoproteinen (AI, AII, AIII, B, CI, CII, CIII, D und E), diese unterscheiden sich in ihrer Aminosäuresequenz. Der hydrophile Teil der Apolipoproteine beinhaltet Bindungsdomänen für Lipidproteinrezeptoren worüber die Aufnahme in bestimmte Zellen reguliert wird (W. J. Johnson, Phillips, & Rothblat, 1997). Mit Ausnahme der Isoformen des Apolipoproteins B sind die Apolipoproteine in der Lage zwischen den Lipoproteinkomplexen zu wechseln. Über die Zusammensetzung der Apolipoproteine definiert sich die Zusammensetzung der Lipide in einem Lipoproteinkomplex.

Lipoproteine werden über ihre Dichte klassifiziert. Man unterscheidet hierbei die Chylomikrone, Chylomikronen-Remnants, very low density lipoproteins (VLDL),



low density lipoproteins (LDL), intermediate density lipoproteins (IDL), high density lipoproteins (HDL) und Lipoprotein a (Berg, Tymoczko, Gatto, & Stryer, 2018).

Das über die Nahrung aufgenommene Cholesterin wird nach der Resorption im Darm im glatten endoplasmatischen Retikulum der Dünndarmepithelzellen in die Chylomikrone aufgenommen. Die Chylomikrone werden anschließend über das kardiovaskuläre System bis hin zur Leber und anderen Organen transportiert. Durch Lipoproteinlipasen und Triglyceridlipasen werden die Chylomikrone an der Oberfläche der Kapillarendothelzellen zu Fettsäuren, Glycerin und Chylomikronen-Remnants gespalten.

Die cholesterinreichen Chylomikronen-Remnants gelangen zur Leber und werden dort verstoffwechselt.

Die Lipoproteine VLDL, LDL und IDL transportieren sowohl exogenes als auch endogenes Cholesterin von der Leber in andere Organe und Gewebe (J M Dietschy, 1997; J M Dietschy & Turley, 2001). Über den reversen Cholesterintransport wird überschüssiges Cholesterin von den Körperzellen in den Geweben über HDL zur Leber transportiert. In der Leber wird das HDL dann über katabole Reaktionen abgebaut.

In den Hepatozyten der Leber eines erwachsenen Menschen werden täglich über enzymatische Reaktionen aus Cholesterin ca. 400 Milligramm Gallensäuren de novo synthetisiert. Die Gallensäuren haben ihre physiologische Funktion bei der Fettverdauung und Fettsorption und zirkulieren zu ca. 90% über den enterohepatischen Kreislauf zwischen der Leber, der Gallenblase und dem Darm. Der Gallensäurepool beträgt beim Erwachsenen in etwa 4 Gramm und zirkuliert pro Tag vier- bis zwölfmal zwischen der Leber und dem Darm.

### **1.1.2 Cholesterinmetabolismus im zentralen Nervensystem**

Eine intakte Blut-Hirn-Schranke verhindert den Transport von peripherem Cholesterin in das Zentrale Nervensystem. Dadurch wird nahezu das gesamte Cholesterin im Zentralen Nervensystem lokal synthetisiert (Ingemar Björkhem & Meaney, 2004; F W Pfrieger, 2003). So muss auch das Cholesterin im Gehirn fast ausschließlich de novo synthetisiert werden und beträgt in etwa 25% des Gesamtcholesterins im Körper (John M Dietschy & Turley, 2004a). Das Gehirn ist

somit das Cholesterin-reichste Organ. Etwa 70% des Cholesterols im Gehirn ist im Myelin angereichert. Ca. 30% des Cholesterins im Gehirn ist in den Membranen von Gliazellen und Neuronen angereichert und ist metabolisch aktiv (J M Dietschy & Turley, 2001; John M Dietschy & Turley, 2004b). Während der frühen Entwicklung synthetisieren Oligodendrozyten eine große Menge Cholesterin für die Myelinisierung. Sobald die Myelinisierung abgeschlossen ist, wird im Gehirn von Erwachsenen das Cholesterin vor allem von Gliazellen und in einem geringeren Maße von Neuronen synthetisiert (Mahley, 2016). Der Umsatz des Cholesterins im Gehirn ist beim Menschen sehr langsam und die Halbwertszeit des Cholesterols liegt beim Erwachsenen zwischen sechs Monaten und fünf Jahren (Andersson, Elmberger, Edlund, Kristensson, & Dallner, 1990).

Im Gehirn ist das Cholesterin neben dem Myelin vor allem in Plasmamembranen angereichert. Plasmamembranen beinhalten Cholesterin-reiche Nano-beziehungsweise Mikro-Domänen, die sogenannten Lipid Rafts. Diese Lipid Rafts sind hoch dynamische Strukturen und verteilt über die Membranen von Zellen, die bedingt durch interne oder externe Signale nachgeschaltete Signalmoleküle rekrutieren (Lingwood & Simons, 2010). In Neuronen befinden sich die Lipid Rafts vor allem an den Synapsen, wo sie bei pre- und postsynaptischen Funktionen mitwirken (J. A. Allen, Halverson-Tamboli, & Rasenick, 2007; Gil, Cubí, Blasi, & Aguilera, 2006; Mailman, Hariharan, & Karten, 2011; Suzuki, 2002; Wasser & Kavalali, 2009).

Für die neuronale Differenzierung und die Synapsenformation ist Cholesterin essentiell (Goritz, Mauch, & Pfrieder, 2005; Mauch et al., 2001). Das Cholesterin im Gehirn spielt auch eine Schlüsselrolle für die synaptische Plastizität, welche sowohl bei der Gehirnalterung als auch bei neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer Demenz beeinträchtigt ist (Yanagisawa, 2002).

Das Cholesterin im Gehirn ist weitgehend unabhängig von dem peripheren Cholesterin. Jedoch ist das Oxysterin 24(S)-Hydroxycholesterin in der Lage über Diffusion die Blut-Hirn-Schranke zu passieren und so vom Gehirn in die Peripherie zu gelangen. Die Konversion von Cholesterin zu 24(S)-Hydroxycholesterin ist aus diesem Grund sehr wichtig für die Eliminierung von Cholesterin aus dem Gehirn. Die Cholesterin 24-Hydroxylase CYP46A1 katalysiert die Oxidation von Cholesterin zu 24(S)-Hydroxycholesterin. Aus diesem Grund ist CYP46A1 einer der wichtigsten Regulatoren der Cholesterinhomöostase im Gehirn. CYP46A1 Polymorphismen sind mit einem kognitiven Verfall assoziiert (B. Y. Fu et al., 2009; C.-L. Lai, Liou, Liu, Yang, & Lin, 2014) und mit einem erhöhten

Risiko der Alzheimer Demenz verbunden (A. N. M. Garcia, Muniz, Souza e Silva, da Silva, & Athayde-Junior, 2009; Min Li et al., 2013). CYP46A1 moduliert die Cholesterolsynthese im Gehirn über einen Rückkopplungsmechanismus welcher den Mevalonatweg reguliert. Die Cholesterin 24-Hydroxylase CYP46A1 ist in der Lage die Aktivierung von Trk-Rezeptoren zu bewirken und somit die neuronale Entwicklung zu fördern. Dies erfolgt über die Aktivierung kleiner GTPasen, wofür deren Prenylierung über die Geranylgeranyltransferase-I (GGTase-I) erforderlich ist (Moutinho et al., 2016).

Auch die  $7\alpha$ -Hydroxy-3-oxo-4-Cholesterinsäure kann über Diffusion die Blut-Hirn-Schranke vom Gehirn in Richtung Peripherie passieren. Die  $7\alpha$ -Hydroxy-3-oxo-4-Cholesterinsäure entsteht im Gehirn aus dem Oxysterol 27-Hydroxycholesterin und die Synthese wird durch CYP7B1 katalysiert. Der basale Spiegel des 27-Hydroxycholesterins ist im zentralen Nervensystem wegen der hohen metabolischen Umsatzrate sehr gering und deshalb spielt  $\alpha$ -Hydroxy-3-oxo-4-Cholesterinsäure für die Eliminierung von Cholesterin aus dem Gehirn nur eine untergeordnete Rolle. CYP7B1 und CYP46A1 gehören zur Familie der Cytochrom P450 Enzyme und sind beide in Neuronen lokalisiert (Leoni & Caccia, 2011; Mutemberezi, Guillemot-Legris, & Muccioli, 2016).

Lediglich das Oxysterol 27-Hydroxycholesterin ist in der Lage aus dem peripheren Cholesterin-Pool über die Blut-Hirn-Schranke in das Gehirn zu gelangen (Björkhem, 2006; Heverin et al., 2005).

Veränderungen des Cholesterinmetabolismus im Gehirn wurden im Zusammenhang mit der Pathophysiologie neurodegenerativer Erkrankungen wie der Alzheimer Demenz, der Parkinson-Krankheit, der Huntington-Krankheit, der Amyotrophen Lateralsklerose, dem Schlaganfall und auch bei der normalen Hirnalterung festgestellt.

Die Gehirnalterung ist mit dem Rückgang der kognitiven Fähigkeiten, wobei vor allem das Erinnerungsvermögen und die Lernfähigkeit beeinträchtigt sind. In Abhängigkeit des Alters kann es zu einem veränderten Cholesterolgehalt im menschlichen Gehirn kommen (Söderberg, Edlund, Kristensson, & Dallner, 1990a; Thelen, Falkai, Bayer, & Lütjohann, 2006). Bei diesem Effekt spielt unter anderem die Zusammensetzung der zellulären Membranen im Gehirn eine Rolle. So konnten in verschiedenen humanen Hirnregionen detektiert werden, dass sich die Lipidzusammensetzung der zellulären Membranen mit dem Alter verändert

(Svennerholm, Boström, Helander, & Jungbjer, 1991; Svennerholm, Boström, & Jungbjer, 1997; Svennerholm, Boström, Jungbjer, & Olsson, 1994).

Die genauen Mechanismen, die für die Veränderung des Cholesteringehaltes während der Alterung im Gehirn verantwortlich sind, sind jedoch noch unbekannt.

Auch bei neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer Demenz wurden Veränderungen des Cholesterinmetabolismus im Gehirn festgestellt. Eine epidemiologische retrospektive Kohortenstudie an Probanden mit familiärer Hypercholesterinämie deutet darauf hin, dass eine frühe Exposition mit erhöhten Cholesterinwerten und einer LDL Rezeptor Dysfunktion einen Risikofaktor für kognitive Beeinträchtigungen darstellt (Zambón et al., 2010). Weiterhin zeigt eine epidemiologische Querschnittsstudie an Alzheimer Patienten den Zusammenhang zwischen erhöhten LDL-Cholesterinwerten und erhöhtem zerebralem A $\beta$  auf (Reed et al., 2014). Es gibt Hinweise dafür, dass der Zusammenhang zwischen den erhöhten Cholesterinwerten im Blut und der Alzheimer Demenz bei vaskulären Veränderungen und einer mitochondrialen Dysfunktion liegt (Bell, 2012; Orsucci et al., 2013).

Eine Vielzahl von Zellen im Zentralen Nervensystem, zu denen auch Astrozyten und Neurone gehören, bilden das Apolipoprotein E. Physiologisch dient das Apolipoprotein E der Rezeptor-vermittelten Endozytose von Cholesterin und somit dem Transport von Cholesterin in die Neuronen um dort den Bedarf an Cholesterin zu decken. Das Allel  $\epsilon$ 4 des Apolipoprotein E erhöht das Risiko der spät einsetzenden familiären und sporadischen Alzheimer Demenz und erhöht die Ablagerung von A $\beta$  im Gehirn (Saunders et al., 1993; Schmechel et al., 1993). Das Apolipoprotein E4 führt zur Pathogenese der Alzheimer Demenz über vielfältige Mechanismen im Gehirn, zu welchen der Metabolismus, die Aggregation und die Toxizität von A $\beta$ , die Tauopathie, die synaptische Plastizität, der Lipidtransport, der Glukosemetabolismus, die mitochondriale Funktion, die vaskuläre Integrität und die Neuroinflammation gehören (Bien-Ly, Gillespie, Walker, Yoon, & Huang, 2012; Bu, 2009; Castellano et al., 2011; Cramer et al., 2012; Kanekiyo, Xu, & Bu, 2014; N. Zhao, Liu, Qiao, & Bu, 2017).

Neben dem Cholesterin selbst liegen auch diverse Metabolite des Cholesterins im Gehirn bei kognitiven Beeinträchtigungen verändert vor. So zeigen Patienten mit

einer milden kognitiven Beeinträchtigung erhöhte Cholesterin-Gehalte in der Zerebrospinalflüssigkeit und Patienten mit Alzheimer Demenz weisen erhöhte Gehalte der Cholesterin-Metabolite 24-Hydroxycholesterin und 27-Hydroxycholesterin in ihrer Zerebrospinalflüssigkeit auf (H.-L. Wang et al., 2016). Diese Befunde der Zerebrospinalflüssigkeit weisen auf eine erhebliche Veränderung des Cholesterin-Metabolismus von Alzheimer Patienten hin. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass eine erhöhte CYP46 Aktivität im Gehirn bei Alzheimer Patienten zu einer erhöhten Oxidation und Exkretion von Cholesterin führt (Bogdanovic et al., 2001; Lütjohann et al., 2000).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass ein veränderter Cholesterin-Metabolismus über vielfältige Mechanismen zu multiplen Dysfunktionen und kognitiven Beeinträchtigungen im Gehirn führen kann. Diese können sowohl bei der normalen Gehirnalterung als auch bei der Pathophysiologie der Alzheimer Demenz auftreten.

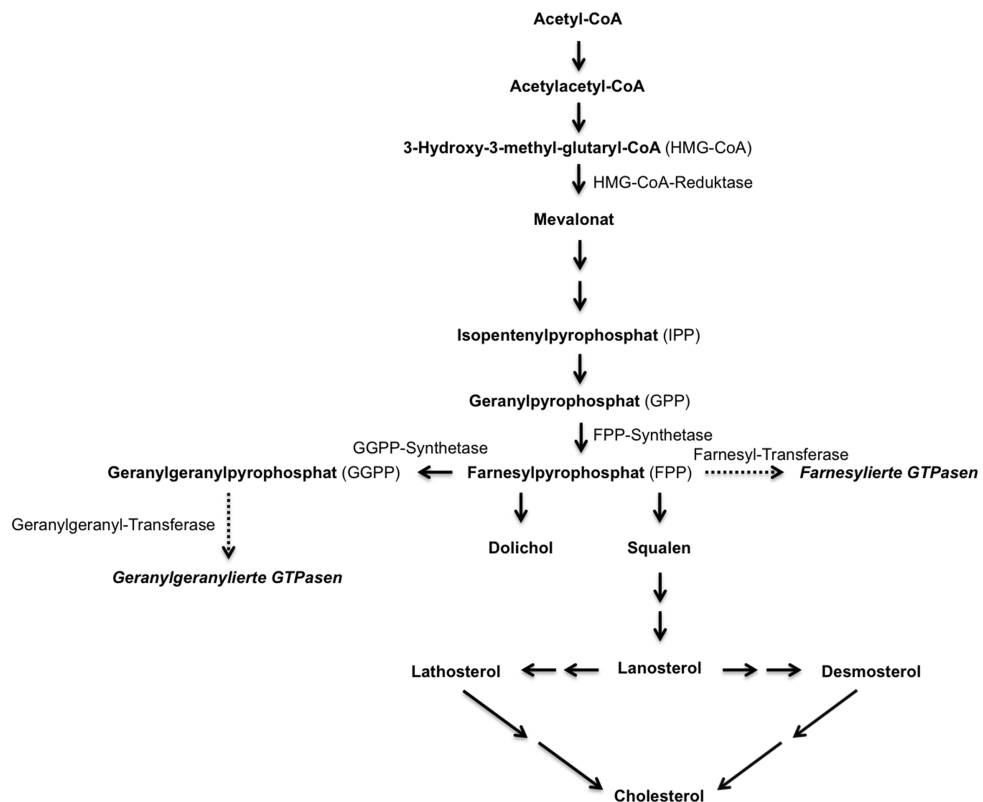
### **1.1.3 Mevalonatweg**

Der initiale Schritt des Cholesterinbiosyntheseweges (Mevalonatweg) ist die Bildung von Acetyl-CoA aus zwei Molekülen Acetyl-CoA. Acetyl-CoA entsteht hauptsächlich als Abbauprodukt des Glukose-, Fettsäure- und Aminosäurestoffwechsels in den Mitochondrien und wird durch einen Acetyl-CoA-Carnitin-Carrier über die Mitochondrienmembran in das Zytoplasma transportiert. Im Zytoplasma findet der erste Schritt der Cholesterinbiosynthese statt. Alle weiteren Schritte der Cholesterinbiosynthese sind vorwiegend in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert, von dort aus wird das Cholesterin intrazellulär über vesikuläre und nicht-vesikuläre Transportmechanismen zu zellulären Membrankompartimenten verteilt (Lev, 2010).

Nach der Bildung von Acetyl-CoA katalysiert das Enzym 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Synthase (HMG-CoA Synthase) die Kondensation eines dritten Moleküls Acetyl-CoA zu 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA). Die HMG-CoA Reduktase katalysiert die Reduktion von HMG-CoA zu Mevalonat, dies ist der am höchsten regulierte Schritt des gesamten Biosyntheseweges (Goldstein & Brown, 1990). Die HMG-CoA Reduktase spielt hierbei eine Schlüsselrolle, da

dieses Enzym den geschwindigkeitsbestimmenden und irreversiblen Schritt des Mevalonatweges katalysiert. Dieser Schritt wird durch eine Feedback Inhibition reguliert. Bei dieser Feedback Inhibition reguliert das Nahrungscholesterin die Cholesterinbiosynthese und hierbei wird die HMG-CoA Reduktase durch Cholesterin, seine Derivate wie beispielsweise den Gallensäuren und Mevalonsäure allosterisch gehemmt (K. Simons & Ikonen, 2000). Weiterhin wird die HMG-CoA Reduktase durch Hormone kontrolliert. Insulin bewirkt eine Dephosphorylierung der HMG-CoA Reduktase, wodurch sie aktiviert wird. Glukagon phosphoryliert die HMG-CoA Reduktase und bewirkt dadurch ihre Inaktivierung.

Nach der Reduktion von HMG-CoA zu Mevalonat wird im Folgenden über eine Reihe von Phosphorylierungsschritten und eine Decarboxylierung aus Mevalonat Isopentenylpyrophosphat (IPP) gebildet. IPP ist ein C5-Körper, der den Grundbaustein der Substanzklasse der Isoprenoide darstellt. IPP polymerisiert zu dem C10-Körper Geranylpyrophosphat (GPP). Und GPP polymerisiert weiter zu Farnesylpyrophosphat (FPP), welches ein C15-Körper ist. Ab dem Isoprenoid FPP verzweigt sich der Biosyntheseweg in Richtung mehrerer steroidaler und nichtsteroidaler Produkte. Über eine Reihe von Kondensationen entstehen aus FPP entweder trans- oder cis- Polyprenylpyrophosphate, aus welchen wiederum Ubichinone oder Dolichole entstehen können. Unter anderem katalysiert das Enzym Geranylgeranyl Synthetase die Bildung von Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) aus FPP. Der eigentliche Cholesterinbiosyntheseweg geht aber über die Kondensation zweier Moleküle FPP zur Bildung des C30-Körpers Squalen über. Mehrere komplexe Zyklisierungsreaktionen und intramolekulare Neuarrangements, gefolgt von Demethylierungen, führen letztendlich über die Intermediate Lanosterol und Desmosterol zu dem C27-Körper Cholesterol (Rudney & Sexton, 1986; Russell, 1992). Die vielen enzymatischen Reaktionen der Cholesterinbiosynthese finden sowohl im Cytosol als auch in Membrankompartimenten der Zelle statt, jedoch erfolgt der geschwindigkeitsbestimmende Schritt im ER, da hier die HMG-CoA Reduktase lokalisiert ist (Brown & Goldstein, 1997).



**Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der Cholesterinbiosynthese.** Die Abbildung zeigt die wichtigsten Intermediate und Enzyme des Mevalonatweges. Die einfachen Pfeile stellen eine einfache Umsetzung dar und zwei Pfeile hintereinander stehen für eine mehrstufige Umsetzung.

Um den intrazellulären Cholesteringehalt dem Bedarf der Zelle anzupassen unterliegt die Cholesterinbiosynthese, genau wie der Cholesterininflux und –Efflux einer komplexen Regulation (Rudney & Sexton, 1986). Diese Regulation kann sich wiederum je nach Zelltyp unterscheiden (J. Chen, Zhang, Kusumo, Costa, & Guizzetti, 2013). Generell wird die Cholesterolhomöostase durch drei miteinander verbundene Rückkopplungsmechanismen reguliert und aufrechterhalten. Diese Mechanismen sind die Regulation der LDL Rezeptorproduktion, die Regulation der Cholesterin-7 $\alpha$ -Hydroxylase in der Gallensäuresynthese und die Aktivität und Regulation der HMG-CoA Reduktase und anderer Enzyme des Mevalonatweges. Dabei erkennen die Zellen ihren Cholesterolgehalt durch Membran-gebundene Transkriptionsfaktoren, den sogenannten Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs), welche die Gen-Transkription der Cholesterin- Biosynthese, der Fettsäure-Biosynthese und der Lipoproteinrezeptoren kodieren (Brown & Goldstein, 1999).

#### 1.1.4 Regulation des Mevalonatweges im Zusammenhang mit der Gehirnalterung und der Alzheimer Demenz

Cholesterol und einige seiner Metabolite, wie beispielsweise das 24(S)-Hydroxycholesterol, das 25-Hydroxycholesterol und das Cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol, sind essentiell für die neuronalen Funktionen (Czuba, Steliga, Lietzau, & Kowiański, 2017). 24(S)-Hydroxycholesterol fungiert als endogener Modulator des N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptors, einem Subtyp der Glutamatrezeptoren, und beeinflusst durch diese Wirkung die neuronale Signalübertragung und das Überleben der Neurone (Sun et al., 2016; Sun, Taylor, Zorumski, & Mennerick, 2017). 25-Hydroxycholesterol übt Spezies-abhängig eine neuroprotektive Wirkung aus, die sowohl über N-Methyl-D-Aspartat-Repetoren als auch über N-Methyl-D-Aspartat-unabhängige Mechanismen verläuft (Sun et al., 2017). Cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol fungiert ebenfalls als endogener Modulator des N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptors und verfügt in vitro und in vivo über eine neuroprotektive Wirkung (H. Hu et al., 2014).

Nicht nur Cholesterin und einige seiner Metabolite, sondern auch diverse intermediäre Moleküle der Cholesterin-Biosynthese beeinflussen die neuronalen Funktionen. Das Ubichinon beispielsweise, welches auch als Coenzym Q10 bezeichnet wird, ist ein Chinon-Derivat und ist als Coenzym der mitochondrialen Atmungsketten-Komplexe I, -II und -III an der oxidativen Phosphorylierung bei der Bildung von ATP beteiligt (Acosta et al., 2016; Alcázar-Fabra, Navas, & Brea-Calvo, 2016; Ernster & Dallner, 1995). Dolichole spielen eine Rolle bei der cotranslationalen Modifikation von Proteinen, speziell in deren *N*-Glykosylierung im endoplasmatischen Retikulum (Carroll, Guthrie, & Ravi, 1992). Dolichol wurde als Biomarker für die Alterung vorgeschlagen, da es in allen Geweben während der Alterung akkumuliert. Die Dolichol-Akkumulierung korreliert quantitativ mit dem Alter, sie tritt aber nicht als sekundärer Effekt alterbedingter metabolischer Veränderungen auf (Parentini, Cavallini, Donati, Gori, & Bergamini, 2005).

Sowohl bei der normalen Gehirnalterung als auch bei der Alzheimer Demenz kommt es zu Veränderungen der Gehalte der Ubichinone und Dolichole. Während die Ubichinon-Gehalte im menschlichen Gehirn bei steigendem Alter abnehmen, steigen die Dolichol-Gehalte im Gehirn mit dem Alter an. Im Zusammenhang mit der Alzheimer Demenz wurde beobachtet, dass hier die Ubichinon-Gehalte in den meisten Hirnregionen ansteigen. Bei Alzheimer Patienten liegen die Dolichol-



Gehalte im Gehirn in allen Hirnregionen verringert vor (Edlund, Söderberg, Kristensson, & Dallner, 1992). Eine Tierstudie an Ratten zeigt ebenfalls altersbedingte Veränderungen der Dolichol- und Ubichinon-Gehalte in den Hirnen der Tiere. Die Lipidperoxidation im Hirngewebe der Versuchstiere bleibt während der Alterung unverändert. Aber während sowohl Cholesterol als auch Dolichol eine geringe Umsatzrate in den gealterten Tieren aufweisen, wird Ubichinon in einem erhöhten Maß synthetisiert und besitzt einen hohen Umsatz während der gesamten Lebenszeit der Versuchstiere (Andersson, Aberg, Teclebrhan, Edlund, & Appelkvist, 1995). In einer weiteren Tierstudie an Ratten wurde nachgewiesen, dass sich die Expression der HMG-CoA Reduktase mit dem Alter der Versuchstiere in deren Leber und Hirngewebe nicht verändert. Jedoch ergaben die Untersuchungen, dass die Enzymaktivität der HMG-CoA Reduktase mit dem Alter der Tiere ansteigt und dadurch zu einer Akkumulation von Dolichol in der Leber und dem Gehirn führt (Pallottini, Marino, Cavallini, Bergamini, & Trentalance, 2003).

Auch die Intermediate des Mevalonatweges Farnesylpyrophosphat und Geranylgeranylpyrophosphat haben eine entscheidende Rolle bei der Regulation der neuronalen Funktionen. Sie üben ihre Funktion als posttranslationale Modifikation kleiner GTPasen (Guanosintriphosphatasen) aus (Maltese, 1990) und ermöglichen über die Prenylierung der kleinen GTPasen ihre Verankerung in der Zellmembran. Diese Verankerung in der Zellmembran ist für die nachgeschalteten Protein-Protein Interaktionen erforderlich. Hierdurch sind die beiden Isoprenoide Farnesylpyrophosphat und Geranylgeranylpyrophosphat an der intrazellulären Signaltransduktion in Neuronen beteiligt (Moutinho, Nunes, & Rodrigues, 2017).

Eine Subfamilie der kleinen GTPasen sind die Rho-GTPasen, welche im neuronalen Zellwachstum (Qiu, Abo, McCormick, & Symons, 1997; Qiu, Chen, Kirn, McCormick, & Symons, 1995; Qiu, Chen, McCormick, & Symons, 1995), der Leitung und Ausläuferbildung von Axonen, dem Dendritenwachstum und der Synapsenformation involviert sind (L. Luo, 2000). Die Familie der Rho-GTPasen gehört zu den Hauptregulatoren der synaptischen Plastizität und sie sind an der dendritischen Morphogenese und Stabilisierung beteiligt (Govek, Newey, & Van Aelst, 2005; D. A. Holtzman & Li, 2014; Schubert & Dotti, 2007; Sekino, Kojima, & Shirao, 2007). In vitro Untersuchungen an N1E-115 Glioblastomazellen der Maus

haben gezeigt, dass während der neuronalen Differenzierung die HMG-CoA Reduktase und der Low Density Lipoprotein Rezeptor (LDLr) verringert vorliegen, wobei die Gehalte des LDLr-related Protein-1 (LRP1) und die Dimerisierung des Scavanger Rezeptors B1 (SRB-1) ansteigen. Außerdem beschleunigt die pharmakologische Inhibition der HMG-CoA Reduktase durch Simvastatin die neuronale Differenzierung durch die Modulation prenylierter Proteine (Cartocci et al., 2016). In murinen und humanen Neuronen sorgt die Inhibition der Protein-Prenylierung mittels Statinen, die als HMG-CoA Reduktase-Inhibitoren fungieren, für das axonale Wachstum (H. Li et al., 2016). Die Inhibition der Geranylgeranylierung durch Lovastatin erhöht das Wachstum und die Verzweigung von Neuriten in Neuroblastomazellen der Ratte, dieser Effekt konnte aber durch Supplementierung des Prenylierungs-Vorläufers Geranylgeraniol aufgehoben werden (Samuel et al., 2014). Mithilfe einer Alterungsstudie mit Mäusen konnte gezeigt werden, dass die beiden Isoprenoide Farnesylpyrophosphat und Geranylgeranylpyrophosphat im Hirngewebe der alten Tiere im Vergleich zu den jungen Kontroll-Tieren erhöht vorliegen (Hooff et al., 2012).

## 1.2 Isoprenoide

Isoprenoide sind in Pflanzen und Tieren weit verbreitete Naturstoffe, die aus Isopren-Untereinheiten bestehen. Das Isopren ( $C_5H_8$ ; 2-Methyl-1,3-butadien) ist eine ungesättigte Kohlenwasserstoffverbindung, die aus 5 C-Atomen und einer Methylverzweigung besteht. Je nach Anzahl der  $C_5$ -Einheiten spricht man bei den Isoprenoiden von Mono-, Di-, Tri- oder Prenyl-Verbindungen. Im allgemeinen bestehen die Isoprenoide aus einer Anzahl von C-Atomen, die durch 5 teilbar ist und entsprechen somit der sogenannten Isoprenregel. Es existieren jedoch auch Isoprenoide, bei welchen die Anzahl der C-Atome nicht durch 5 teilbar ist. Sie können sekundär durch Einführen oder Verlust von C-Atomen entstehen. Auch andere Folgereaktionen, wie beispielsweise Umlagerungen, Zyklisierungen, Einführung funktioneller Gruppen oder der Einbau von Heteroatomen sorgen für eine strukturelle Vielfalt der Isoprenoide (Holstein & Hohl, 2004; Rodriguez-Concepcion & Boronat, 2002). Wegen ihrer Fettlöslichkeit zählen die Isoprenoide zu den Lipiden.

Die  $C_{10}$ -Verbindungen der Isoprenoide werden als Terpene bezeichnet. Terpene sind flüchtige Verbindungen, die meist einen charakteristischen Geruch aufweisen und vor allem von Pflanzen gebildet werden.

Als Sesquiterpene werden die  $C_{15}$ -Verbindungen der Isoprenoide bezeichnet. Auch sie treten wie die Terpene hauptsächlich im Pflanzenreich als Bestandteile von etherischen Ölen auf.

Die  $C_{20}$ -Verbindungen der Isoprenoide bezeichnet man als Diterpene. Es handelt sich bei den Diterpenen um kaum flüchtige hochviskose Öle oder feste Substanzen. Sie kommen vor allem in Harzen, Balsamen und als Diterpenalkaloide vor. Zu den Diterpenen zählen beispielsweise Vitamin A (Retinal) und Geranylgeraniol.

Die  $C_{30}$ -Verbindungen der Isoprenoide werden Triterpene genannt. Die Triterpene sind schwer flüchtige, feste Verbindungen. Verestert oder verethert kommen die Triterpene als Bausteine von Saponinen, in Pflanzenextrakten, Harzen und Balsamen vor. Methylsterine und Steroide werden außerdem auch von Tieren und Mikroorganismen gebildet. Ein offenkettiger Vertreter der Triterpene ist das Squalen. Die meisten Triterpene bestehen jedoch aus tetra- und pentazyklischen Verbindungen. Zu den tetrazyklischen Triterpenen gehören die Steroide und Cucurbitacine. Die pentazyklischen Triterpene werden in den Oleanan-, Ursan- und den Lupan-Typ unterteilt. Zu ihnen gehören die Saponine und Resinosäuren.

Neben den Isoprenoiden existieren auch Naturstoffe mit isoprenoiden Seitenketten, sie werden als gemischte Isoprenoide bezeichnet. Zu den gemischten Isoprenoiden gehören beispielsweise Tocopherol, Vitamin K (Phyllochinon), Plastochinon, Ubichinon sowie Chlorophyll.

Die klassische Isopren-Synthese findet in tierischen und pflanzlichen Zellen über den Mevalonatweg statt (Rodriguez-Concepcion & Boronat, 2002). Ausgangsstoff des Cholesterin-Biosyntheseweges ist Acetyl-CoA. Die Isopren-Synthese über den sogenannten Nicht-Mevalonat-Weg findet in Bakterien, den Plastiden der grünen Algen und Pflanzen, sowie bei einigen Sporozoen statt. Höhere Pflanzen und verschiedene Algen sind in der Lage über beide Biosynthese-Wege Isoprenoide zu synthetisieren, die beiden Isoprenoid-Biosynthese-Wege sind allerdings in unterschiedlichen Kompartimenten lokalisiert. Der Ausgangsstoff des Nicht-Mevalonat-Weges, der auch als Mevalonat-unabhängiger oder Isopentenyl-diphosphat (IPP)-Biosyntheseweg bezeichnet wird, ist das biochemisch aktivierte Isopentenyl-diphosphat (IPP) und dessen Isomer 3,3-Dimethylallyl-diphosphat (DMAPP) (Karlson Peter; Doenecke Detlef; Koolman Jan; Fuchs Georg; Gerock Wolfgang, 2005).

Die Isoprenoide Farnesylpyrophosphat (FPP) und Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) sind Intermediate des Mevalonatweges. Sie üben ihre Funktion als posttranslationale Modifikation kleiner GTPasen aus (Maltese, 1990). Die Isoprenoide FPP und GGPP üben eine entscheidende Rolle bei der Regulation der neuronalen Funktionen aus, wobei es Veränderungen in der Alterung des Gehirns und bei diversen neurodegenerativen Erkrankungen gibt (Moutinho et al., 2017).

### 1.3 Kleine GTPasen

Kleine GTPasen (Guanosintriphosphatasen) werden auch als kleine G-Proteine, Guaninnucleotid-bindendes Protein oder GTP-bindendes Protein bezeichnet. Diese Proteinfamilie übt auf zellulärer Ebene unterschiedliche Schalterfunktionen in verschiedenen Signaltransduktionskaskaden aus. Um die aktive Form der kleinen GTPasen zu erlangen und so ihre spezifischen Funktionen ausüben zu können, erfordern die kleinen GTPasen die Prenylierung mittels der Isoprenoide Geranylgeranylpyrophosphat oder Farnesylpyrophosphat um hierüber in der Zellmembran verankert zu werden (F. L. Zhang & Casey, 1996).

Im menschlichen Organismus beinhaltet die Ras-Superfamilie der kleinen GTPasen mehr als 170 Mitglieder, die ihrerseits in hauptsächlich 5 Subfamilien unterteilt sind. Auf der Basis der strukturellen Homologie und der funktionellen Ähnlichkeit erfolgt die Einteilung der GTPasen in die Subfamilien Ras, Rho, Rab, Ran und Arf (D. S. Johnson & Chen, 2012).

Jedoch gibt es einige weniger gut untersuchte kleine GTPasen, deren Zuordnung in eine Subfamilie eher willkürlich getroffen wurde und es daher weder strukturelle noch funktionelle Übereinstimmung mit den anderen Mitgliedern der Subfamilie gibt (Wennerberg, Rossman, & Der, 2005).

#### 1.3.1 Subfamilie der Ras-GTPasen

Die Ras (rat sarcoma) Subfamilie der GTPasen wird in die Subgruppen p21 Ras, Rap, R-Ras, Ral und Rheb unterteilt (Kennedy, Beale, Carlisle, & Washburn, 2005). Ras-GTPasen spielen eine wichtige Rolle in der Onkogenese, da sie durch Hyperaktivierung an onkogenen Prozessen verschiedener Formen humaner Krebserkrankungen beteiligt sind (Repasky, Chenette, & Der, 2004). Die zur Subgruppe der p21 Ras-Proteine zugehörigen drei humanen Ras-Gene kodieren die vier onkogenen Ras-Proteine H-Ras, N-Ras, K-Ras4A und K-Ras4B (Khosravi-Far & Der, 1994; Eric K Rowinsky & Patnaik, 2000). Durch extrazelluläre Stimulation über Wachstumsfaktoren werden diese Ras-GTPasen aktiviert und sind ihrerseits intrazelluläre Bestandteile von Signaltransduktionsprozessen bei der Kontrolle der Genexpression und der Regulation von Proliferation, Differenzierung und Apoptose (Gómez, Martínez-A, González, & Rebollo, 1998; A Hall, 1993).

Die Proteine der Untergruppen Rap, R-Ras, Ral und Rheb sind in verschiedenen intrazellulären Signalweiterleitungsprozessen involviert, einige Vertreter wie beispielsweise Rerg, Noey2 und D-Ras fungieren sogar als Tumorsuppressoren (Colicelli, 2004; Wennerberg et al., 2005).

### **1.3.2 Subfamilie der Rho-GTPasen**

Die Rho (Ras homolog) Subfamilie umfasst im menschlichen Organismus 23 Gene. Die hierüber kodierten Proteine werden über Strukturanaloga in die 6 Subgruppen Rho, Rac, Cdc42, Rnd, RhoBTB and RhoT/Miro unterteilt (Bustelo, Sauzeau, & Berenjano, 2007).

Die meisten der mindestens 26 Rho-GTPasen sind maßgeblich in zahlreiche zelluläre Prozesse wie der Organisation des Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskeletts, der Dynamik der Zellpolarität und Transkription, sowie der Kontrolle des Zellzyklus involviert (Bustelo et al., 2007; Jaffe & Hall, 2005; Wennerberg et al., 2005).

Obwohl der Großteil der Rho-GTPasen in allen Arten von Säugetierzellen vorkommt, sind sie, bedingt durch ihre Funktionen auf zellulärer Ebene, im Gehirn von besonderer Bedeutung. Zu den am besten erforschten Rho-GTPasen gehören die Proteine Rac1, RhoA und Cdc42. Rac1 wird im menschlichen Organismus ubiquitär exprimiert (Didsbury, Weber, Bokoch, Evans, & Snyderman, 1989). Es existieren Splice-Varianten für Rac1 und Cdc42 (Boureux, Vignal, Faure, & Fort, 2007). Die am häufigsten untersuchte Splice-Variante Cdc42a (placental Cdc42p, Cdc42Hs) wird ubiquitär exprimiert, wohingegen Cdc42b (brain Cdc42p, G25K) nur im Gehirn exprimiert wird (Wennerberg & Der, 2004). Für RhoA sind bisher keine Splice-Varianten entdeckt worden und es gibt bisher auch keinerlei Hinweise auf eine Gewebe- oder Zell-spezifische Expression des Proteins. Außer den bereits erwähnten zellulären Prozessen sind Rac1, RhoA und Cdc42 in das Zellwachstum (Qiu et al., 1997; Qiu, Chen, Kirn, et al., 1995; Qiu, Chen, McCormick, et al., 1995), Leitung und Ausläuferbildung von Axonen, dem Dendritenwachstum und der Synapsenformation involviert (L. Luo, 2000).

### 1.3.3 Subfamilie der Rab-GTPasen

Die Subfamilie der Rab (Ras-like proteins in brain) -GTPasen wird aus rund 60 Genen des humanen Genoms kodiert (Bock, Matern, Peden, & Scheller, 2001) und besteht aus mindestens 66 Proteinen, deren Funktionen im Zusammenhang mit vesikulären Transportprozessen steht (S. R. Pfeffer, 2013). Aufgrund ihrer strukturellen Homologie werden die meisten Rab-GTPasen den 10 Subgruppen Rab1, Rab3, Rab4, Rab5, Rab6, Rab8, Rab11, Rab22, Rab27 und Rab40 zugeordnet, es gibt jedoch Proteine, die in keine dieser Subgruppen eingeteilt sind (Moore, Schell, & Palme, 1995; Pereira-Leal & Seabra, 2000).

Im Gegensatz zu den Proteinen der Ras- und Rho-GTPasen, werden einige Rab-GTPasen ubiquitär und andere Zell- und Zellorganell-spezifisch exprimiert (Pereira-Leal & Seabra, 2001).

Neben den Phosphatidylinositolen (Di Paolo & De Camilli, 2006) und den Arf-GTPasen sind die Rab-GTPasen Regulatoren des intrazellulären Membran- und Vesikel-Verkehrs (Behnia & Munro, 2005). Die Subgruppe der Rab3-GTPasen stellt einen kritischen Faktor für die Synapsenfunktion dar und die Gruppe der Rab11-GTPasen spielt eine wichtige Rolle für das Wachstum und den Umbau von Neuriten (Hutagalung & Novick, 2011).

Rab3A wird Gewebe-spezifisch im Gehirn in Neuronen, neuroendokrinen und exokrinen Zellen exprimiert (Stenmark & Olkkonen, 2001; Takai, Sasaki, & Matozaki, 2001), ist dort an synaptische Vesikel assoziiert und übt seine Funktion zum Zeitpunkt des Andockens und der Fusion von synaptischen Vesikeln an der Synapsenmembran direkt vor der Neurotransmitterausschüttung aus (Geppert, Goda, Stevens, & Südhof, 1997; Ghijssen & Leenders, 2005).

Rab11B kommt sowohl im Herzen, in Testes und im Gehirn vor (Kelly, Horgan, & McCaffrey, 2012; F. Lai, Stubbs, & Artzt, 1994). Rab11-GTPasen sind im Gehirn an somatodendritischen Domänen von Neuronen lokalisiert (Sheehan, Ray, Calhoun, & Goldenring, 1996). Rab11B ist an synaptische Endosomen assoziiert und reguliert dort die  $Ca^{2+}$ -induzierte Exozytose und die Sekretion von humanem Wachstumshormon hGh (human growth hormon) (Ng & Tang, 2008).

### 1.3.4 Subfamilie der Ran-GTPasen

Die Subfamilie der Ran (Ran-related oder Ras-like nuclear) -GTPasen stellt aus Sicht der Proteinsequenzanalyse einen Seitenarm der Subfamilie der Rab-GTPasen dar, wurde aber bedingt durch ihre abweichenden zellulären Funktionen als eigenständige Subfamilie definiert (Colicelli, 2004). Ran-GTPasen regulieren den nukleären Import und Export (Weis, 2003) und spielen auch eine Rolle bei dem Aufbau des Spindelapparats während der Mitose (Carazo-Salas, Gruss, Mattaj, & Karsenti, 2001).

### 1.3.5 Subfamilie der Arf-GTPasen

Zur Subfamilie der Arf (ADP ribosylation factors) –GTPasen werden auch die Arl (Arf -like proteins) und SARA (Smad anchor for receptor activation) –GTPasen gezählt. Im menschlichen Organismus wurden bisher 30 Mitglieder dieser Proteinfamilie identifiziert (Colicelli, 2004), darunter die 6 Isoformen Arf1, Arf2, Arf3, Arf4, Arf5 und Arf6 (Stalder & Antony, 2013).

Wie die Rab-GTPasen regulieren auch sie neben den Phosphatidylinositolen (Di Paolo & De Camilli, 2006) den intrazellulären Verkehr zwischen Membranen und Vesikeln (Behnia & Munro, 2005).

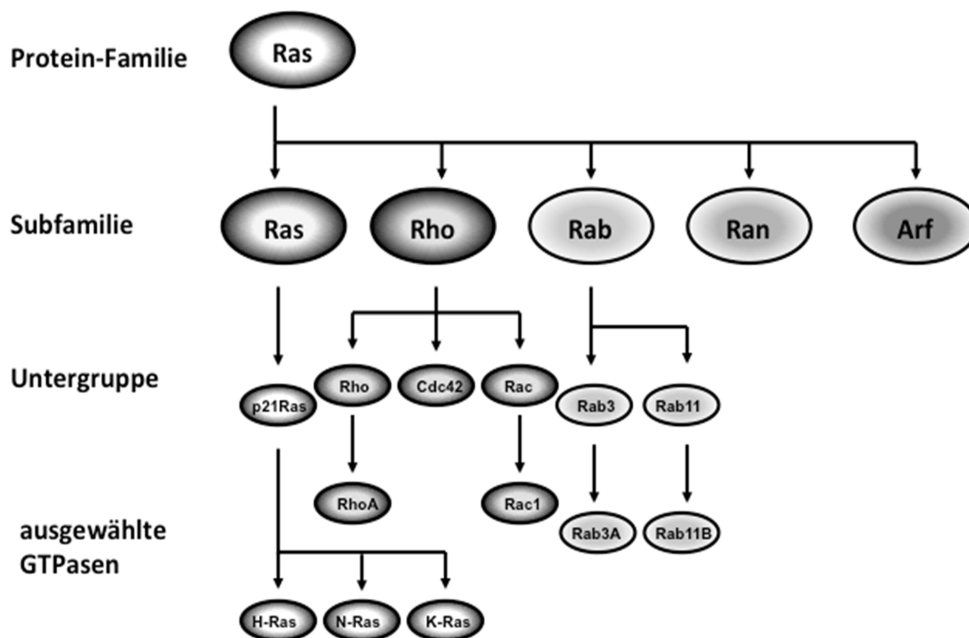


Abbildung 2: Einteilung ausgewählter kleiner GTPasen in ihre Subfamilie und Untergruppe.



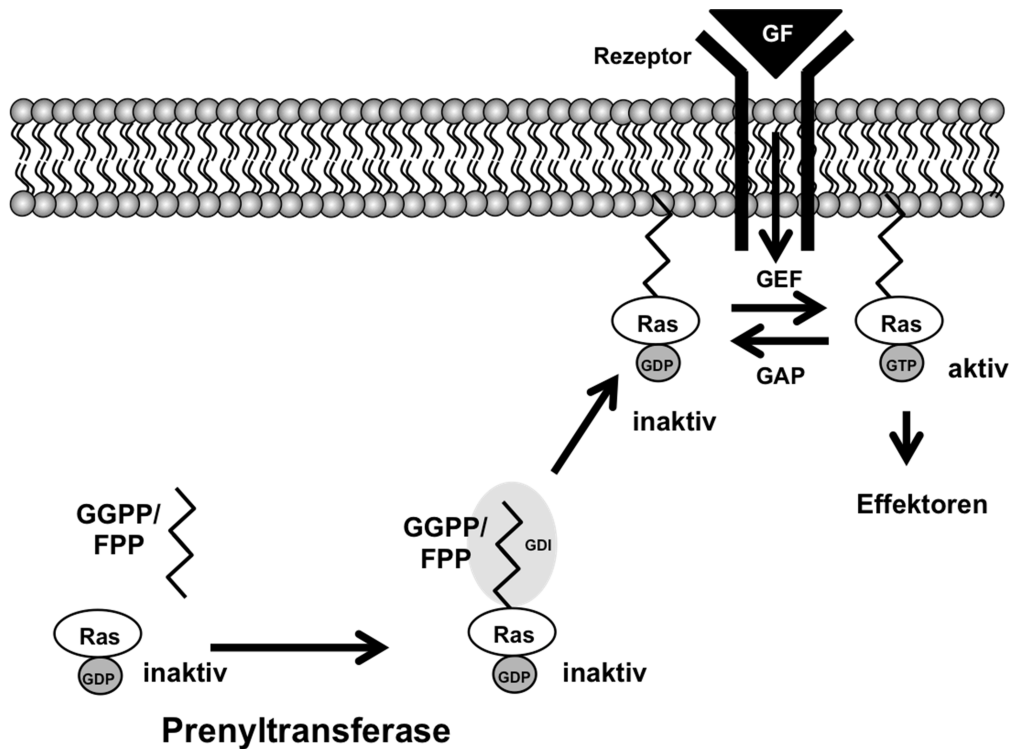
## 1.4 Regulation kleiner GTPasen

GTPasen können reversibel von einer aktiven GTP (guanine nucleotide triphosphate) –gebundenen Form in eine inaktiven GDP (guanine nucleotide diphosphate) –gebundene Form überführt werden. Die an der Plasmamembran lokalisierten guanine nucleotide exchange factors (GEFs) katalysieren den Austausch von GDP zu GTP und sorgen so für die Aktivierung der entsprechenden GTPase (A. Schmidt & Hall, 2002).

GTPase activating proteins (GAPs) stimulieren die GTP-Hydrolyse, die zur Inaktivierung der GTPase führt. Zusätzlich regulieren spezifische guanine nucleotide exchange inhibitors (GDIs) die Lokalisation der GTPasen, indem sie sie aus der Membran entfernen und im Cytosol in Lösung halten (Nikonova, Tsyganov, Kolch, Fey, & Kholodenko, 2013).

Ein weiterer Faktor zur Regulierung der kleinen G-Proteine ist die posttranslationale Modifikation dieser Proteine mit Lipiden, zu diesen Lipiden gehören unter anderem auch die Isoprenoide FPP und GGPP (Glomset & Farnsworth, 1994).

Die posttranslationale Modifikation der kleinen GTPasen mittels Prenylierung der Isoprenoide Geranylgeranylpyrophosphat und Farnesylpyrophosphat wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht und wird im Folgenden noch weiter ausgeführt.



**Abbildung 3. Vereinfachte Darstellung der Regulation von GTPasen.** Im Cytosol werden inaktive GDP-gebundene GTPasen der Ras-Superfamilie (Ras) mit dem Isoprenoid GGPP oder FPP prenyliert, katalysiert durch die Prenyltransferasen. Diese Prenylierung ist erforderlich für die Insertion der GTPasen in Membranen, wo sie durch GEFs (guanine nucleotide exchange factors) aktiviert werden. Die GEFs werden ihrerseits nach der Bindung von Wachstumsfaktoren (growth factor = GF) an den adequate Rezeptor aktiviert. Die Aktivierung der GDP-gebundenen GTPase erfolgt durch Phosphorylierung zum GTP-gebundenen Stadium. Die aktive GTPase kann durch GAPs (GTPase-activating proteins) deaktiviert werden. Im Cytosol halten GDIs (guanidine nucleotide-dissociation inhibitors) die GDP-gebundenen GTPase im inaktiven Stadium. Aktive GTPasen können über diverse Effektoren nachgelagerte Signalkaskaden aktivieren (Samuel & Hynds, 2010).

### 1.4.1 Posttranslationale Modifikation kleiner GTPasen

Posttranslationale Modifikationen kleiner GTPasen durch verschiedene Lipide steuern die Lokalisation der G-Proteine in der Zelle und haben dadurch Einfluss auf ihre Interaktion mit regulatorischen Proteinen oder Targetproteinen. Kleine GTPasen können sowohl an ihrem N-Terminus als auch an ihrem C-Terminus modifiziert werden. Gesteuert wird eine solche Modifikation über bestimmte Motive in der Aminosäuresequenz der Protein, die von spezifischen Enzymen erkannt wird. Klassische posttranslationale Modifikationen der kleinen G-Proteine sind die Phosphorylierung, Methylierung, Palmitoylierung, Myristoylierung, Farnesylierung und Geranylgeranylierung (Glomset & Farnsworth, 1994).

Mit Ausnahme der Arf-GTPasen, werden die meisten kleinen GTPasen an ihrem C-Terminus modifiziert. Die N-terminale Modifikation der Arf-GTPasen wird von

dem Enzym Myristoyl-CoA Avyltransferase katalysiert, hierbei wird die Myristinsäure an den N-terminalen Glycinrest gebunden (Kahn, Goddard, & Newkirk, 1988). Das Erkennungsmotiv am C-Terminus der anderen Proteine der Ras-Superfamilie ist das CXXX-Motiv, welches auch als CaaX- oder CAAX-Motiv bezeichnet wird. Für alle kleinen GTPasen ist X eine aliphatische Aminosäure (auch a oder A) und das C-terminale X eine andere Aminosäure, die sich nach der vorliegenden GTPase definiert (Casey, 1992). Im Fall der Ras-GTPasen handelt es sich bei dem C-terminalen X meistens um Metionin oder Serin (Glomset & Farnsworth, 1994).

Dieses Motiv wird von der im Cytosol lokalisierten Farnesyltransferase erkannt, welche den Transfer der Farnesylgruppe, die von dem Isoprenoid Farnesylpyrophosphat stammt, katalysiert. Hierbei erfolgt der Transfer von Farnesylidiphosphat auf die Sulfhydrylgruppe des Cysteinrests des Ras-Proteins. Im Anschluss katalysiert eine membrangebundene Enteropeptidase, die bevorzugt mit prenylierten Substraten reagiert, das Entfernen des C-terminalen –XXX Peptids aus der farnesylierten –CXXX Sequenz (Gutierrez, Magee, Marshall, & Hancock, 1989).

Eine membrangebundene Methyltransferase, die auch bevorzugt mit prenylierten Substraten reagiert, katalysiert nun die Methylveresterung der freigelegten Carboxylgruppe am Cysteinrest (S. Clarke, Vogel, Deschenes, & Stock, 1988; Pérez-Sala, Gilbert, Tan, & Rando, 1992).

Die Ras-GTPasen werden bevorzugt durch die Farnesyltransferase farnesyliert (F. L. Zhang & Casey, 1996), jedoch belegen Studien mit Farnesyltransferase-Inhibitoren, dass N-Ras und K-Ras auch von der GGTase-I geranylgeranyliert werden können, wenn die Farnesylierung geblockt ist (Whyte et al., 1997).

Eine Studie an H-Ras und K-Ras(4B) zeigte außerdem, dass neben der Prenylierung am C-terminalen Cysteinrest für H-Ras eine oder mehrere zusätzliche Palmitoylierungen an vorangestellten Cysteinresten notwendig sind um das Protein in der Membran zu verankern (Hancock, Cadwallader, Paterson, & Marshall, 1991). Dabei müssen sowohl die Farnesylgruppe als auch die Palmitoylgruppe in der Lipiddoppelschicht der Plasmamembran eingebracht sein. Für die Verankerung von K-Ras(4B) ist außer der Prenylierung eine vorangestellte polybasische Region notwendig. Außerdem ist die Interaktion der polybasischen Region von K-Ras(4B) mit den negativ geladenen Kopfgruppen der sauren Phosphoglyceride der Membranlipiddoppelschicht notwendig um die Verankerung

des Proteins zu gewährleisten. Eine weitere Studie zeigte, dass für die Ras-GTPasen H-Ras, N-Ras und K-Ras die Endoproteolyse und Carboxymethylierung, die der Prenylierung folgen, für die Membranverankerung dieser Proteine zwingend notwendig sind (Michaelson et al., 2005).

Für alle GTPasen ist die Verankerung in der Plasmamembran essentiell für ihre Aktivierung durch die GEFs.

Bei verschiedenen Mitgliedern der Rho-GTPasen, unter anderem auch Rac1, RhoA und Cdc42, endet der C-Terminus des CXXX-Motivs mit Leucin oder Phenylalanin (-CXXL oder -CXXF) und bedingt dadurch die Geranylgeranylierung dieser Proteine. Die cytosolische Geranylgeranyltransferase-I (GGTase-I) erkennt dieses Motiv und katalysiert den Transfer der Geranylgeranylgruppe, die von dem Isoprenoid GGPP stammt, auf die Sulfhydrylgruppe des Cysteins des Rho-Proteins. Die nachfolgende Endoproteolyse und Carboxymethylveresterung erfolgen analog den Vorgängen bei den Ras-GTPasen (Glomset & Farnsworth, 1994).

Anders als bei den Ras-GTPasen, sind die Endoproteolyse und Carboxymethylierung im Anschluss an ihre Geranylgeranylierung nicht zwingend notwendig für die Membranverankerung der Rho-GTPasen Rac1, RhoA und Cdc42 (Michaelson et al., 2005). Diesen Rho-GTPasen ist es wohl möglich durch Polyprenylierung die fehlenden Postprenylierungsprozesse zu kompensieren.

Die Rab-GTPasen, die am C-Terminus mit den Motiven -CC, -CXC, -CCXX oder -CCXXX enden, werden von der im Cytosol vorliegenden Geranylgeranyltransferase-II (GGTase-II) geranylgeranyliert (F. L. Zhang & Casey, 1996). Hierbei katalysiert die GGTase-II den Transfer der Geranylgeranylgruppe auf den Cysteinrest des C-terminalen Endes der Rab-GTPase, reagiert aber nicht direkt mit dem Cystein-haltigen Peptid sondern mit einer oberhalb gelegenen Aminosäuresequenz (Seabra, Goldstein, Südhof, & Brown, 1992).

Für die Geranylgeranylierung ist ein weiterer Faktor notwendig, das Rab Escort Protein (REP), welches zusammen mit der Rab-GTPase und der GGTase-II einen Komplex bildet. Nach der Komplexbildung wird die Übertragung der Geranylgeranylgruppe auf die Rab-GTPase katalysiert und anschließend erfolgt entweder eine weitere Geranylgeranylierung eines Cysteinrests am C-Terminus oder die GGTase-II wird direkt von dem Komplex getrennt (Anant et al., 1998). Auch hier unterliegt das Protein am C-Terminus nach dem Transfer der Geranylgeranylgruppe einer Carboxymethylveresterung (Farnsworth et al., 1991).

### 1.4.2 Prenyltransferasen

Prenylierte GTPasen können aufgrund ihrer Struktur am C-Terminus in zwei Klassen eingeteilt werden. Die meisten GTPasen gehören zu der ersten Gruppe, die mit dem CAAX-Motiv enden, und die zweite Gruppe besteht fast ausschließlich aus den Rab-GTPasen, welche am C-terminalen Ende ein CC-, CXC-, CCXX- oder CCXXX-Motiv aufweisen. Drei Enzyme katalysieren die Prenylierung der GTPasen, die Farnesyltransferase (FTase), die Geranylgeranyltransferase-I (GGTase-I) und die Geranylgeranyltransferase-II (GGTase-II) (F. L. Zhang & Casey, 1996).

#### 1.4.2.1 Farnesyltransferase

Die FTase ist ein  $Zn^{2+}$ -abhängiges Enzym, das bevorzugt die Farnesylierung am C-terminalen CAAX-Motiv der Ras-GTPasen katalysiert. Sie besteht aus einem 48 kDa  $\alpha$ - und einem 46 kDa  $\beta$ -Heterodimer, welche ihrerseits zum größten Teil aus  $\alpha$ - Helices aufgebaut sind (Liang, Ko, & Wang, 2002). Die  $\alpha$ - Untereinheit umfasst sieben Haarnadelschleifen. Die  $\alpha$ - 2 und  $\alpha$ - 15 Helices der  $\alpha$ - Untereinheit falten eine helikale Haarnadelschleife, die in einer halbmondförmigen Domäne resultiert und einen Teil der  $\beta$ -Untereinheit umhüllt. Die  $\beta$ -Untereinheit besteht aus 18 Helices, von denen 12 Helices im Inneren ein  $\alpha$ - $\alpha$  Fass bilden. 6 weitere Helices verbinden die inneren Kern-Helices und formen die Außenseite des Fasses. Im Zentrum des Fasses befindet sich eine tiefe Spalte aus hydrophoben Aminosäuren, welche als Bindungstasche für FPP fungiert. Ein einziges  $Zn^{2+}$ -Ion ist zwischen  $\alpha$ -hydrophober Oberflächenfurche nahe der Untereinheitengrenzfläche und der tiefen Spalte der  $\beta$ -Untereinheit lokalisiert. Das  $Zn^{2+}$ -Ion ist an Asp297, Cys299 und His362 gebunden, aktiviert hier das Thiolat des Cys299 und greift als Nucleophil die ionisierte Farnesylgruppe an. Das Ersetzen von Cys299 $\beta$  durch Ala hat eine verminderte  $Zn^{2+}$ -Affinität und dadurch bedingt eine erniedrigte Enzymaktivität zur Folge (H. W. Fu, Moomaw, Moomaw, & Casey, 1996).

Das Ersetzen des Substrates FPP durch GGPP am aktiven Zentrum der FTase bedingt, dass das Thiolat-Nucleophil weiter entfernt ist von dem elektrophilen Carbon an der Pyrophosphatabgangsgruppe und hat ebenfalls eine geringere Enzymaktivität der FTase zur Folge. Für die optimale Aktivität der FTase ist außerdem Magnesium notwendig (Casey & Seabra, 1996).

#### 1.4.2.2 Geranylgeranyltransferase-I

Die GGTase-I katalysiert bevorzugt die Geranylgeranylierung von GTPasen, die ein CAAX-Motiv aufweisen bei dem das terminale X Leucin oder Phenylalanin ist. Die GGTase-I besteht, wie die FTase, aus einer 48 kDa  $\alpha$ - und einer 43 kDa  $\beta$ -Untereinheit. Die  $\alpha$ -Untereinheit der GGTase-I ist sequenzanalog zu der  $\alpha$ -Untereinheit der FTase, jedoch besitzt sie eine Wölbung der halbmondförmigen  $\alpha$ -Untereinheit. Bei der  $\beta$ -Untereinheit liegt lediglich eine Übereinstimmung von ca. 30% zwischen der FTase und der GGTase-I vor. Sie unterscheiden sich vor allem in der Identität der Seitenketten und der Längen verschiedener Loop-Regionen (Taylor, Reid, Terry, Casey, & Beese, 2003).

Im Vergleich mit der FTase und der GGTase-II formen die Reste 79b±121b der GGTase-I eine Loop-Verbindung zwischen Helix 3b und Helix 4b, in welche weitere 26 Resten eingeschoben sind. Dieser Loop endet bei Helix 4b, die einen Teil der Oberfläche der CAAX-Bindungsseite bildet. Unterschiede an einer solchen Position könnten verantwortlich sein für unterschiedliche Protein-Protein-Interaktionen der Prenyltransferasen (Casey & Seabra, 1996).

Die GGTase-I besitzt ein  $Zn^{2+}$ -Ion, dieses ist an Asp269b, Cys271b und His321b gebunden. Im Gegensatz zur FTase ist die Enzymaktivität der GGTase-I unabhängig von Magnesium. Im Bezug auf ihre Substratspezifität weist die GGTase-I eine 330-fach höhere Affinität zu GGPP als zu FPP auf.

Die GGTase-I ist in ihrer Funktion als katalytisches Enzym der Geranylgeranylierung von Rac1 als Mediator der BDNF-induzierten Bildung von Synapsen involviert (Z. Li et al., 2013; Z. G. Luo et al., 2003).

Außerdem bewirkt die TrkB-vermittelte Aktivierung der GGTase-I die Aktivierung von Rac1 und ist essentiell für die Entwicklung von Dendriten (K.-Y. Wu, Zhou, & Luo, 2010; X.-P. Zhou, Wu, Liang, Fu, & Luo, 2008).

### 1.4.2.3 Geranylgeranyltransferase-II

Die GGTase-II, die auch als Rab-GGTase bezeichnet wird, katalysiert die Geranylgeranylierung der Rab-GTPasen, die am C-terminalen Ende ein CC-, CXC-, CCXX- oder CCXXX-Motiv besitzen. Das  $Zn^{2+}$ -haltige Enzym setzt sich aus einer 60 kDa  $\alpha$ - und einer 38 kDa  $\beta$ -Untereinheit zusammen. Die  $\alpha$ - Untereinheit der GGTase-II besteht aus 15  $\alpha$ -Helices, die eine halbmondförmige Domäne bilden und einen Teil der  $\beta$ -Untereinheit umhüllen. Außerdem besitzt die  $\alpha$ - Untereinheit zwei zusätzliche Domänen, eine C2-like Domäne und eine LRR (Leucin Rich Repeat)-Domäne. Die  $\beta$ -Untereinheit der GGTase-II setzt sich aus 12  $\alpha$ -Helices zusammen, die ein  $\alpha$ - $\alpha$ -Fass bilden und ähnelt stark dem  $\alpha$ - $\alpha$ -Fass der  $\beta$ -Untereinheit der FTase (Rasteiro & Pereira-Leal, 2007).

Im Gegensatz zu den anderen Prenyltransferasen erkennt die GGTase-II ihre Substrate nicht direkt, sondern benötigt das sogenannte Rab Escort Protein (REP) (Seabra, Brown, Slaughter, Südhof, & Goldstein, 1992; Seabra, Goldstein, et al., 1992). Das REP bildet einen Komplex mit der Rab-GTPase und präsentiert sie der GGTase-II. Es kommt zu einer Komplexbildung aus REP, RabGTPase und GGTase-II, die nach der Geranylgeranylierung der Rab-GTPase durch erneute Bindung eines GGPP-Substrats an der GGTase-II-Bindestelle wieder aufgelöst wird. Das REP eskortiert anschließend die geranylgeranylierte Rab-GTPase an die Target-Membran (Alexandrov, Horiuchi, Steele-Mortimer, Seabra, & Zerial, 1994).

Ein weiterer Unterschied zu den anderen Prenyltransferasen besteht darin, dass die GGTase-II in der Lage ist eine Rab-GTPase nacheinander mit zwei Geranylgeranylgruppen zu prenylieren, jedoch ist die Stöchiometrie zwischen Enzym und Substrat im Verhältnis 1:1 definiert (Desnoyers & Seabra, 1998).

Für die Geranylgeranylierung einer Rab-GTPase benötigt die GGTase-II  $Zn^{2+}$  und millimolare Mengen an  $Mg^{2+}$ , wobei die Reaktion schon durch mikromolare Konzentrationen  $Zn^{2+}$  inhibiert wird, die Mechanismen hierfür sind nicht bekannt (Seabra, Goldstein, et al., 1992). Die GGTase-II hat eine 100-fach höhere Bindungsaffinität zu GGPP als zu FPP (Guo et al., 2008).

### 1.4.3 GDIs

Drei Arten von regulatorischen Proteinen kontrollieren reversibel die Aktivierung der kleinen GTPasen. Neben den guanine nucleotide exchange factors (GEFs) und GTPase-activating proteins (GAPs), beeinflussen die guanine dissociation inhibitors (GDIs) die Funktion und Lokalisation der GTPasen (Jacqueline Cherfils & Zeghouf, 2013). Im Cytosol halten GDIs die kleinen GTPasen in der inaktiven GDP-gebundenen Form indem sie den Nukleotidaustausch blockieren und dadurch die Membranassoziation regulieren (DerMardirossian & Bokoch, 2005).

GDIs können die prenylierten GTPasen von der Endomembran ablösen und schirmen die unlöslichen Lipide im Cytosol ab. Es existieren drei Familien von GDIs. PDE $\delta$  (Delta Untereinheit der cGMP Phosphodiesterase) bindet bevorzugt farnesylierte Ras-GTPasen, Rho- und RabGDIs erkennen den Geranylgeranylrest der Rho- und Rab-GTPasen. Die Funktion der Rho- und RabGDIs besteht darin ihre Target-Proteine in einem löslichen inaktiven Komplex im Cytosol zu halten (Jacqueline Cherfils & Zeghouf, 2013). Jedoch wird die Möglichkeit diskutiert, dass RhoGDIs auch prenylierte GTPasen in ihrer aktiven GTP-gebundenen Form im Cytosol komplexieren (Samuel & Hynds, 2010).

PDE $\delta$  verfügt über eine C-terminale  $\beta$ -Sandwich-Domäne, welche strukturell der Lipid-Bindungs-Domäne der RhoGDIs entspricht (Hanzal-Bayer, Renault, Roversi, Wittinghofer, & Hillig, 2002). Diese beiden  $\beta$ -Faltblätter umfassen die C-terminale Farnesylgruppe der Target-GTPase und bilden somit die Lipid-Bindestelle. Im Gegensatz zu den RhoGDIs besitzt PDE $\delta$  keine zusätzliche Bindungs-Domäne für die GTPase. Bevorzugt werden von PDE $\delta$  Ras-GTPasen gebunden, jedoch sind unter anderem auch Interaktionen mit Rho6, Rab13 und verschiedenen Arl-GTPasen beobachtet worden (Hanzal-Bayer et al., 2002; Marzesco, Galli, Louvard, & Zahraoui, 1998).

RhoGDIs besitzen ein N-terminales  $\alpha$ -Helix-Bündel, welches zuerst mit der membrangebundenen geranylgeranylierten Rho-GTPase interagiert. In einem darauffolgenden Schritt bindet eine C-terminale  $\beta$ -Sandwich-Domäne des RhoGDIs die Geranylgeranylgruppe und berührt zusätzlich die Innenseite der Rho-GTPase in einer bestimmten Entfernung zu der Nukleotid-Bindungsstelle (Grizot et al., 2001; Scheffzek, Stephan, Jensen, Illenberger, & Gierschik, 2000).

Bislang konnten drei verschiedenen RhoGDIs identifiziert werden, RhoGDI-1 ( $\alpha$ ), RhoGDI-2 ( $\beta$ ) und RhoGDI-3 ( $\gamma$ ) (Fukumoto et al., 1990; Scherle, Behrens, &



Staudt, 1993; Zalzman et al., 1996). Diese drei RhoGDIs variieren in ihrer Bindungsspezifität zu den Rho-GTPasen. RhoGDI- $\alpha$  bindet spezifisch Rac1, RhoA und Cdc42, wohingegen RhoGDI- $\beta$  weder an Rac1, noch RhoA oder Cdc42 bindet (Olofsson, 1999; Wennerberg & Der, 2004).

RhoGDI- $\gamma$  hat keine Affinität zu Rac1 und nur geringe Affinität zu RhoA und Cdc42 (Adra et al., 1997; Dovas & Couchman, 2005; Zalzman et al., 1996).

RabGDIs haben eine unterschiedliche Struktur aber eine ähnliche Funktion für die GTPasen der Rab-Familie (McTaggart, 2006). Ähnlich wie die RhoGDIs verfügen die RabGDIs über zwei Bindungsseiten zu den Rab-GTPasen, wobei eine Region des RabGDIs die Innenseite der Rab-GTPase und die andere den geranylgeranylierten C-Terminus der Rab-GTPase erkennt. Drei flexible  $\alpha$ -Helices bilden die Lipid-Bindungsseite, sie sind eng gepackt wenn kein Substrat vorliegt und können sich räumlich ausdehnen um einer oder zwei Geranylgeranylgruppen Platz zu bieten. RabGDIs berühren nicht direkt das GDP-Nukleotid, jedoch wurde bislang keine Interaktion zwischen RabGDIs und GTP-gebundenen Rab-GTPasen nachgewiesen werden (Jacqueline Cherfils & Zeghouf, 2013).

Es existieren drei Isoformen der RabGDIs im menschlichen Organismus (S. K. Wu, Zeng, Wilson, & Balch, 1996). RabGDI- $\alpha$  ist im Gehirn angereichert, RabGDI- $\beta$  wird ubiquitär exprimiert und RabGDI- $\gamma$  kommt zwar ebenfalls ubiquitär vor, ist aber angereichert in Adipozyten (Alory & Balch, 2001; S. Pfeffer & Aivazian, 2004).

#### 1.4.4 GEFs

Guanine nucleotide exchange factors (GEFs) katalysieren den Austausch von GDP zu GTP in einer komplexen mehrstufigen Reaktion und bewirken so die Aktivierung der entsprechenden GTPase (A. Schmidt & Hall, 2002). GEFs erhalten ein vorgeschaltetes Signal, das eine spezifische Signaltransduktionskaskade auslöst, in welche die GTPase involviert ist. Bevor die Aktivierung der GTPase erfolgt wird der spezifische GEF an die Plasmamembran oder einen Rezeptor rekrutiert. Dort wird im initialen Schritt ein Komplex aus GDP-gebundener GTPase und GEF gebildet, welcher nur eine geringe Bindungsaffinität aufweist. Dieser Komplex wird durch die Dissoziation von GDP in einen stabilen Nukleotid-freien Komplex aus GTPase und GEF konvertiert. Die anschließende Bindung von GTP

an die GTPase löst den Komplex auf und es resultiert die aktive GTP-gebundene Form der GTPase. GEFs können auf zwei Arten klassifiziert werden, nach Strukturanaloga oder nach den kleinen GTPasen mit denen sie interagieren. Die meisten GEFs sind Multidomänen-Proteine, katalytische Domänen können Oligomerisierung, Protein-Protein oder Membran –Interaktionen fördern, aber die Funktion vieler Domänen ist bislang nicht geklärt (J Cherfils & Chardin, 1999).

Es wurden GEFs identifiziert die hochspezifisch nur eine bestimmte GTPase aktivieren, wie beispielsweise Fgd1/Cdc42 oder p115RhoGEF/Rho (Hart et al., 1996; Zheng et al., 1996).

Andere GEFs, wie beispielsweise Vav1/Cdc42, Rac, Rho oder Dbl/Rho, Cdc42 können mehrere GTPasen aktivieren (Hart et al., 1994; Olson, Pasteris, Gorski, & Hall, 1996). Alleine für die Subfamilie der Rho-GTPasen existieren mehr als 80 verschiedene GEFs im menschlichen Organismus (Alan Hall, 2012).

Die meisten Rho-GEFs enthalten eine DH-PH Region, die sich aus einer Dbl (diffuse B-cell-lymphoma) homology (DH) Domäne und einer pleckstrin homology (PH) Domäne zusammensetzt (Scita et al., 2000). Die DH Domäne enthält das katalytische Zentrum für die enzymatische Aktivität des Rho-GEFs und die PH Domäne bildet die Lipid-Bindungstelle und wahrscheinlich auch eine Oberfläche, die der Protein-Protein-Interaktion dient. Es gibt aber auch Rho-GEFs, die keine DH-PH Region aufweisen. Den Proteinen der Dock-Familie fehlt die DH-Domäne, an deren Stelle befinden sich die Dock-homology region-1 und -2 (DHR1 und DHR2) (Rossman, Der, & Sondek, 2005). SWAP70 (Switch-associated protein 70) und SLAT (SWAP70-like adaptor of T cells)/IBP Proteine verfügen über eine PH Domäne und eine angehängte C-terminale Doppelhelix, aber auch ihnen fehlt die DH Domäne (Mavrakis, McKinlay, Jones, & Sablitzky, 2004; Shinohara et al., 2002).

### **1.4.4.1 Rac1-spezifische GEFs**

Zu den Rac1-spezifischen GEFs gehören die Proteine Tiam1, Kalirin7, Trio, Arhgef7 ( $\beta$ -Pix) und Rasgrf2 (Kiraly, Eipper-Mains, Mains, & Eipper, 2010). Von ihnen stehen Tiam1, Kalirin7 und Arhgef7 mit der Entwicklung von Synapsen und ihrer Plastizität in Verbindung (Tolias, Duman, & Um, 2011). Tiam1 ist notwendig für die Entwicklung der dendritischen Dornfortsätze (Spines), Kalirin7 fungiert als Regulator der Dynamik der Spines und Arhgef7 ist Regulator der Morphogenese der Spines und der Synaptogenese.

#### 1.4.4.2 Tiam1

Tiam1 (T-cell lymphoma invasion and metastasis 1) ist ein Rac1-spezifischer GEF. Das Protein enthält eine DH-PH Domäne in der Nähe des C-Terminus, ein PDZ-Bindemotiv am C-Terminus und eine zweite PH Domäne in der Nähe des N-Terminus (Songyang et al., 1997). Die näher am N-Terminus gelegene PH Domäne ist essentiell für die Membranlokalisation von Tiam1 (Michiels et al., 1997). Im Komplex aus Tiam1 und Rac1 sind die beiden Switch-Regionen der GTPase durch das Trennen der Magnesium-Bindung und der Nukleotid-Interaktion stabilisiert, wobei die PH Domäne von Tiam1 Rac1 nicht berührt (Worthylake, Rossman, & Sondek, 2000).

Tiam1 ist angereichert im Gehirn, der Epidermis und den Testes, in anderen Geweben wird es in geringerer Menge exprimiert (García-Mata & BurrIDGE, 2007). Im Gehirn steht Tiam1 in Verbindung mit zahlreichen neuronalen Prozessen, wie der neuronalen Migration, dem Neuritenwachstum und der axonalen Spezifizierung (Kawauchi, Chihama, Nabeshima, & Hoshino, 2003; Kunda, Paglini, Quiroga, Kosik, & Caceres, 2001; Leeuwen et al., 1997). Tiam1 ist außerdem in Dendriten und ihren Dornfortsätzen in dem postsynaptischen dichten (PSD) Membranbereich lokalisiert und ist dort notwendig für das vollständige Wachstum der Dendriten, der dendritischen Dornfortsätze und des PSD (Tolias et al., 2005, 2007). Um diese Funktionen auszuüben interagiert Tiam1 mit den NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors (Tolias et al., 2005). Tiam1 interagiert aber auch mit dem Rezeptor Tyrosinkinase EphB2, der nach Stimulation durch EphrinB die Dendritenanzahl und ihre Größe erhöht (Tolias et al., 2007; Yamaguchi & Pasquale, 2004).

Außerdem interagiert Tiam1 mit dem TrkB-Rezeptor und vermittelt auf diese Weise die BDNF-induzierte Aktivierung von Rac1, die in der Neuordnung des Zytoskeletts und Veränderungen der zellulären Morphologie resultiert (Miyamoto, Yamauchi, Tanoue, Wu, & Mobley, 2006; P. Zhou et al., 2007).

#### 1.4.5 GAPs

GTPase activating proteins (GAPs) stimulieren die schwache intrinsische GTP-Hydrolyse-Aktivität, die zur Inaktivierung der GTPase führt. Eine Vielzahl von Mechanismen, wie beispielsweise Protein-Protein-Interaktionen, Phospholipid-

Interaktionen, Phosphorylierungen, subzelluläre Translokationen und proteolytische Degradationen, steuern die Aktivität der GAPs (Bernards & Settleman, 2004). Die am häufigsten vorkommenden Motive der GAPs sind die SH3 Domäne (Src homology domain 3) und die PH Domäne. Die SH3 Domäne ist in der Lage Prolin-haltige Peptide zu binden und die PH Domäne bindet Phosphoinositide. Viele GAPs verfügen über eine enzymatisch aktive Domäne, was darauf schließen lässt, dass die GAPs noch weitere Funktionen als nachgeschaltete Effektoren der kleinen GTPasen ausführen (Bernards & Settleman, 2004).

Aufgrund weniger Strukturanaloga lassen sich die unterschiedlichen GAPs neben der Spezifität für die Subfamilien der kleinen GTPasen nur schwer klassifizieren. Jedoch enthalten alle GAPs eine BCR (breaking cluster region) homology (BH) Domäne, die aus 150 bis 200 Aminosäure-Resten besteht und die GAP-Aktivität auf die GTPasen ausübt (Gamblin & Smerdon, 1998). Nicht nur die Strukturen der einzelnen GAPs, sondern auch die Mechanismen nach welchen die GAP-induzierte GTP-Hydrolyse abläuft sind sehr unterschiedlich, hinzu kommt, dass zahlreiche Mechanismen noch unbekannt sind (Jacqueline Cherfils & Zeghouf, 2013).

Es wurden bislang 67 Rho-GAPs im Säuger identifiziert (Alan Hall, 2012), sie alle haben eine spezielle RhoGAP Domäne, die sie von den anderen GAPs unterscheidet. Diese RhoGAP Domäne besteht aus mindestens 150 Aminosäureresten der Primärstruktur und weisen ca. 20% Sequenzidentität zwischen den einzelnen Mitgliedern der RhoGAP-Familie auf (Moon & Zheng, 2003).

Die Sekundärstruktur der RhoGAP Domäne zeichnet sich durch neun Helices und einen konservierten Arginin-Rest, der in einer Loop-Region lokalisiert ist, aus. Die tertiäre Faltung und der grundsätzliche Mechanismus, welcher die GTPasen deaktiviert, stimmen bei der RasGAP Domäne und der RhoGAP Domäne überein (Bax, 1998; Gamblin & Smerdon, 1998; Rittinger, Taylor, Smerdon, & Gamblin, 1998). Die RhoGAP Domäne interagiert mit der Switch I, der Switch II und mit der P-Loop-Region der Rho-GTPase, die die GTP-Bindungsstelle enthält. Im Gehirn sind zahlreiche Mitglieder der RhoGAPs über ihre Funktion als Aktivator der GTP-Hydrolyse von Rho-GTPasen in zelluläre Prozesse wie der Morphogenese von Neuronen, dem Wachstum der Zelle und ihrer Differenzierung, der Endozytose und der Tumorsuppression involviert (Moon & Zheng, 2003).

## 1.5 Neurotrophine

Neurotrophine sind kleine sezernierte Proteine, die im zentralen Nervensystem (ZNS) und peripheren Nervensystem (PNS) das Wachstum, die Differenzierung und das Überleben von Neuronen fördern, die neuronale Morphologie und auch die synaptische Transmission und Plastizität regulieren (Schuman, 1999; Skaper, 2012). Zu den Neurotrophinen gehören der nerve growth factor (NGF), der brain-derived neurotrophic factor (BDNF), das Neurotrophin-3 (NT-3), das Neurotrophin-4 (NT-4) und das Neurotrophin-5 (NT-5). NT-4 und NT-5 besitzen ähnliche Eigenschaften und werden daher auch oft als NT-4/5 zusammengefasst, NT-4 wurde zuerst in *Xenopus* entdeckt und bei NT-5 handelt es sich um das humane Homologe des NT-4 (Berkemeier et al., 1991; Hallböök, Ibáñez, & Persson, 1991). Neurotrophine können membranständige Rezeptoren aktivieren und so intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden auslösen. Die Rezeptoren der Neurotrophine sind die tropomyosin-related kinase (Trk) Familie der Tyrosinkinase Rezeptoren A, B und C, sowie der p75 Neurotrophin Rezeptor (p75NTR), welcher zur Superfamilie der Tumor Nekrose Faktor (TNF) Rezeptoren gehört. Während ein Neurotrophin im Stande ist einen oder mehrere Trk-Rezeptoren zu aktivieren wird der p75NTR von allen Neurotrophinen aktiviert.

Alle Neurotrophine entstehen aus Vorläufern, den pro-Neurotrophinen. Sortilin fungiert als Rezeptor für die pro-Neurotrophine, jedoch nicht für die reifen Neurotrophine (Nykjaer et al., 2004). Sortilin gehört zur Familie der Proteine, die die vascular protein sorting 10 protein (Vps10p) Domäne besitzen. Nicht nur pro-Neurotrophine, sondern auch Neurotensin und Progranulin gehören zu den Bindungspartnern des reifen Sortilin (Nykjaer & Willnow, 2012). Pro-BDNF induziert Apoptose über die Bindung und Aktivierung von p75NTR und Sortilin und ist daher ein Teil der komplexen Regulation des Nervensystems (Teng et al., 2005).

Neurotrophine werden im PNS weitgehend von nicht-neuronalen Zellen synthetisiert, im ZNS hingegen bewältigen überwiegend Neurone die Synthese der Neurotrophine. In Neuronen werden die Neurotrophine nach ihrer Bildung in Form von Post-Golgi-Granula zur Presynapse transportiert und über den Vorgang der Degranulation in den synaptischen Spalt sezerniert. Das Neurotrophin bindet nun den Neurotrophin-spezifischen Trk-Rezeptor, der sowohl pre- und postsynaptisch lokalisiert ist. Es kommt zu einer endozytotischen Aufnahme des Neurotrophin-Trk Rezeptor-Komplexes. Sowohl in der Pre- als auch in der Postsynapse entsteht daraufhin ein retrograder Fluss der Neurotrophin-Trk Rezeptor-Endosomen in

Richtung des Somas. Dieser retrograde Fluss löst MAPK-abhängige Transkription von leistungsbezogenen Genen, wie beispielsweise dem activity-regulated cytoskeleton-associated (ARC) Protein und von Genen, die mit der synaptischen Plastizität in Verbindung stehen, aus (Park & Poo, 2013). Neurone, die diesen retrograden Fluss etablieren, unterliegen nicht dem neuronalen Zelltod und müssen diesen Fluss lebenslänglich aufrecht erhalten um den Status der funktionellen Differenzierung zu erhalten. Neurone, die einen solchen Fluss nicht gewährleisten können, degenerieren (Skaper, 2012; Yuan & Yankner, 2000).

### 1.5.1 NGF (nerve growth factor)

NGF wurde bereits 1951 von Levi-Montalcini entdeckt (Levi-Montalcini, 1987; LEVI-MONTALCINI & HAMBURGER, 1951). Das reife ca. 13 kDa NGF entsteht aus dem Vorläufer pro-NGF, einem Homodimer mit einem Molekulargewicht von ca. 26 kDa. Pro-NGF ist aus drei Untereinheiten aufgebaut. Die  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit formen einen 7S-Komplex. Der 7S-Komplex setzt sich aus zwei identischen  $\beta$ -Ketten, die ihrerseits aus jeweils 118 Aminosäuren bestehen, zusammen. Diese  $\beta$ -Ketten bilden die Struktur mit der trophischen Aktivität des NGF. Während sowohl das monomere NGF als auch das dimere pro-NGF die Wachstums-promovierende Aktivität aufweisen, liegt im ZNS physiologisch eher das dimere pro-NGF vor (Maness et al., 1994; Ullrich, Gray, Berman, & Dull, 1983). Im Gehirn wird NGF in hohem Maße in cholinergen Neuronen des basalen Vorderhirns (cholinergic basal forebrain (ChBF)), in striatalen und hippocampalen Neuronen im Cortex und Hippocampus gebildet (S. J. Allen, Watson, Shoemark, Barua, & Patel, 2013). In anderen Hirnregionen liegt NGF ebenfalls vor, aber in vergleichsweise niedrigen Konzentrationen. ChBFs des ausgewachsenen ZNS sind auf NGF angewiesen um ihren Phänotyp zu erhalten und das Überleben der Neurone zu gewährleisten (Araujo, Chabot, & Quirion, 1990; Cuellar, 1993). NGF bindet neben dem p75-Rezeptor auch spezifisch an den membranständigen TrkA-Rezeptor (Wiesmann, Ultsch, Bass, & de Vos, 1999). Der TrkA-Rezeptor verfügt über eine immunoglobulin-like Domäne (TrkA-d5 Domäne), die sich in der Nähe der Membran befindet und NGF mit einer sehr hohen Affinität bindet. Das Wachstum und die Differenzierung von Nervenzellen werden durch NGF vermittelt (Calamandrei & Alleva, 1995) und durch ein Defizit an NGF kommt es zu Beeinträchtigungen der Gedächtnisleistung (Connor & Dragunow, 1998). Bei der

Differenzierung von Neuronen kommt es zum Wachstum der Neuriten und der neuronalen Vernetzung. In diesem Zusammenhang induziert NGF durch die Bindung an den TrkA-Rezeptor die Aktivierung von Rac1 und dadurch die vesicle-associated membrane protein (VAMP)-vermittelte neuronale Vernetzung (D'Alessandro, Racchetti, & Meldolesi, 2010). Zusätzlich sind die Rho-GTPasen Rac1, RhoA und Cdc42 in die Ausdifferenzierungsprozesse über ihre Funktionen bei der Bildung und dem Umbau des Zytoskeletts involviert.

### **1.5.2 BDNF (brain derived neurotrophic factor)**

Das Neurotrophin BDNF entsteht wie alle anderen Neurotrophine aus einem Vorläufer, dem pro-BDNF. Bei pro-BDNF handelt es sich um ein dimeres Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 28 kDa, welches sich aus zwei nicht-kovalent gebundenen Untereinheiten zusammensetzt. Jede Untereinheit hat ein Molekulargewicht von ca. 14 kDa und ist strukturell verwandt mit NGF (Rosenthal et al., 1991). Im ZNS kommt BDNF in einem hohen Maß im Hippocampus, aber auch in der Amygdala, dem Thalamus, den Ansätzen des olfaktorischen Systems, den inneren und äußeren pyramidalen Ebenen des Neocortex, dem Claustrum, dem Septum, dem Cerebellum und den Colliculi superiores in Pyramidenzellen und Körnerzellen vor (Connor & Dragunow, 1998). BDNF ist ausschließlich in neuronalen Zellen, jedoch nicht in Gliazellen lokalisiert (Dugich-Djordjevic et al., 1995). Wie die anderen Neurotrophine bindet BDNF an den p75-Rezeptor, BDNF bindet aber zusätzlich wie NT-3 und NT-5 spezifisch an den TrkB-Rezeptor und ist in der Lage ihn zu aktivieren (Berkemeier et al., 1991). Obwohl unterschiedliche Neurotrophine an den TrkB-Rezeptor binden ist er in der Lage die Neurotrophine voneinander zu diskriminieren und je nach Bindung unterschiedliche Signalkaskaden zu aktivieren (Lewin & Barde, 1996). BDNF agiert aber nicht nur als Target-bezogener neurotropher Faktor, sondern übt auch parakrine und autokrine Funktionen im ZNS aus (Mufson et al., 1994; Wetmore, Cao, Pettersson, & Olson, 1991). So fördert BDNF das Überleben und die Aufrechterhaltung von sensorischen Neuronen, retinalen Ganglien, bestimmten cholinergen Neuronen, spinalen Motoneuronen und einigen dopaminergen Neuronen (S. J. Allen et al., 2013). BDNF ist ein notwendiger Faktor für die Verzweigung von Axonen und Dendriten und fördert dadurch die Bildung und Reifung von Synapsen (Alsina, Vu, & Cohen-Cory, 2001; McAllister, Lo, & Katz, 1995).

Zudem fungiert BDNF als Modulator der synaptischen Funktion und Plastizität (Park & Poo, 2013). Über die Interaktion des TrkB-Rezeptors mit dem Rac1-spezifischen GEF Tiam1 wird die BDNF-induzierte Aktivierung von Rac1 vermittelt. Hierdurch kommt es zu einer Neuordnung des Zytoskeletts und Veränderungen der zellulären Morphologie der betroffenen Neurone (Miyamoto et al., 2006; P. Zhou et al., 2007).

Darüber hinaus vermittelt die GGTase-I die BDNF-induzierte Synaptogenese in hippocampalen Neuronen (Z. Li et al., 2013). Die GGTase-I geranylgeranyliert Rac1 und sorgt so für die Lokalisation von Rac1 in der Membran. Verankert in der Membran wird Rac1 nun von GEFs aktiviert und bewirkt eine verstärkte Synaptogenese.

### 1.5.3 Tyrosinkinase B (TrkB)-Rezeptor

Bei dem TrkB-Rezeptor handelt es sich um einen membranständigen Rezeptor der tropomyosin-related kinase (Trk) Familie. Im menschlichen Gehirn kommen hauptsächlich drei Isoformen des TrkB vor. Die katalytische Form in voller Länge wird als full-length TrkB (TrkB-FL) bezeichnet. Bei den weiteren Isoformen des TrkB handelt es sich um zwei verkürzte Formen, die keine Tyrosinkinase Domäne aufweisen, sie werden als truncated TrkB (TrkB-T) und TrkB-Shc bezeichnet. Der TrkB-FL vermittelt Signale, die das Überleben und die Differenzierung von Neuronen und die synaptische Plastizität bewirken. Diese Effekte werden von den verkürzten Isoformen TrkB-T und TrkB-Shc inhibiert, indem sie mit TrkB-FL Heterodimere bilden (J. Wong, Rothmond, Webster, & Weickert, 2013). Der TrkB-Rezeptor wird in weiten Teilen des ZNS und PNS exprimiert (Klein, Conway, Parada, & Barbacid, 1990; Klein, Martin-Zanca, Barbacid, & Parada, 1990). Die Transkription der katalytischen Form des TrkB-Rezeptors ist vorrangig in Neuronen lokalisiert und die Transkription der nicht katalytischen Formen des TrkB-Rezeptors findet eher in nicht-neuronalen Zellen, wie den Astrozyten, Oligodendrozyten und Schwann-Zellen statt (Frisén et al., 1993).

Der TrkB-Rezeptor kann von den Neurotrophenen BDNF, NT-3 und NT-4/5 aktiviert werden (Berkemeier et al., 1991; Klein et al., 1991).

Jeder Trk-Rezeptor verfügt über eine extrazelluläre Juxtamembran-Region in welcher der Inhalt oder das Fehlen einer kurzen Aminosäuresequenz über die



Spezifität und die Reaktionsbereitschaft des Rezeptors entscheidet (E. J. Huang & Reichardt, 2003). Fehlt diese Sequenz bei einer Isoform des TrkB-Rezeptors kann er nur durch BDNF aktiviert werden, ist diese Sequenz vorhanden kann der TrkB-Rezeptor auch von NT-3 und NT-4/5 aktiviert werden (Boeshore, Luckey, Zigmond, & Large, 1999; Strohmaier, Carter, Urfer, Barde, & Dechant, 1996). Neben anderen Faktoren, entscheidet vermutlich die Regulation des Spleißens (splicing) des Exons, das diese Aminosäuresequenz kodiert, über die Entwicklung und Funktion der Neurone. Außer der Spleißvariante der Juxtamembran-Region des TrkB-Rezeptors gibt es weitere Faktoren, die die Signalübertragung des TrkB-Rezeptors beeinflussen. Die unterschiedlichen Isoformen des TrkB-Rezeptors aktivieren durch die Bindung des selben Neurotrophins unterschiedliche Signalkaskaden. Im Gegensatz zu TrkB-FL, lenkt die verkürzte Form TrkB-T die BDNF-induzierte Differenzierung kortikaler neuraler Stammzellen zu Gliazellen (A. Cheng et al., 2007). Dieser Befund und auch die unterschiedliche Lokalisation der Transkription der TrkB-Isoformen veranschaulichen, dass nicht nur die Neurotrophine und ihre Vorläufer, sondern auch die Expression der Rezeptoren einen wesentlichen Anteil an der Regulation des ZNS haben. Jedoch ist die Aktivität der Tyrosinkinase essentiell für die meisten Trk-Rezeptor-vermittelten intrazellulären Reaktionen (E. J. Huang & Reichardt, 2003). Eine wichtige Funktion der beiden verkürzten Isoformen des TrkB-Rezeptors liegt in der Regulierung der Expression des TrkB-FL an der Zelloberfläche (Haapasalo et al., 2002). Zusätzlich beeinflusst die Präsenz des p75NTR die Spezifität des TrkB-Rezeptors. Wenn der p75NTR vorhanden ist können NT-3 und NT-4/5 den TrkB-Rezeptor weniger effektiv aktivieren und dadurch erhöht sich die Spezifität des TrkB-Rezeptors für seinen primären Liganden BDNF (Bibel, Hoppe, & Barde, 1999).

Neben dem Neurotrophin NGF, welches den TrkA-Rezeptor aktiviert, reguliert BDNF durch die Aktivierung des TrkB-Rezeptors die Orientierung von Axonen, die synaptischen Funktionen und die neuronale Differenzierung. In diesem Zusammenhang ist BDNF in der Lage über die Aktivierung des TrkB-Rezeptors verschiedene Rho-GTPasen, wie Rac1, Cdc42 und RhoA zu aktivieren. So führt die TrkB-vermittelte Aktivierung der GGTase-I über die Geranylgeranylierung zur Aktivierung von Rac1 und resultiert in der Entwicklung von Dendriten (X.-P. Zhou et al., 2008). Hierbei ist die GGTase-I ein essentieller Faktor bei der Regulierung der Morphogenese während der Entwicklung der Dendriten (K.-Y. Wu et al., 2010). Außerdem induziert BDNF die TrkB-vermittelte Synaptogenese, bei welcher ebenfalls die Signaltransduktion über die Geranylgeranylierung von Rac1 mittels der GGTase-I abläuft (Z. Li et al., 2013; Z. G. Luo et al., 2003).

## **1.6 Alzheimer Demenz**

### **1.6.1 Epidemiologie der Alzheimer Demenz**

In Deutschland leben gegenwärtig schätzungsweise 1,5 Millionen Menschen die an Demenz erkrankt sind. Davon sind in etwa zwei Drittel von der Alzheimer-Krankheit betroffen. Jedes Jahr treten ungefähr 300.000 Neuerkrankungen auf. Durch die Veränderung der Bevölkerungsstruktur werden die Zahlen in den nächsten Jahren weiter zunehmen, denn es kommt zu weitaus mehr Neuerkrankungen als zu Sterbefällen bei den bereits Erkrankten. Statistische Vorausberechnungen prognostizieren bis zum Jahr 2050 eine Erhöhung der Zahl der Demenzkranken in Deutschland auf rund 3 Millionen.

Das Hauptrisiko an Demenz zu erkranken ist das zunehmende Alter. Der Anteil der Demenzkranken liegt bei 60 Jährigen bei ca. 1% und nimmt mit steigendem Lebensalter zu. So sind ca. 5% der 70 Jährigen an Demenz erkrankt. Unter den 80 Jährigen leiden ca. 20% an einer Demenz und unter den 90 Jährigen sind ca. 30% Demenzkranke (Bundesamt, 2002; Statistisches Bundesamt (Destatis), 2017).

### **1.6.2 Ätiologie der Morbus Alzheimer**

Die Alzheimer Demenz ist die am häufigsten auftretende Form der Demenz und gehört zu den progressiven neurodegenerativen Erkrankungen. Die Krankheit ist nach dem Neurologen Alois Alzheimer (1864-1915) benannt, der die Krankheit mit ihren Symptomen und histopathologischen Veränderung der Gehirnmorphologie erstmals beschrieb (Vishal, Sourabh, & Harkirat, 2011). Es gibt zwei klassische molekularbiologische Hypothesen der Alzheimer Demenz, die beide mit den histopathologischen Befunden von Alois Alzheimer zusammenhängen. Bei diesen histopathologischen Veränderungen des Gehirns handelt es sich zum einen um die sogenannten „Tangles“, die aus intrazellulären Neurofibrillen des hyperphosphorylierten Tau-Proteins in Neuronen bestehen, und zum anderen um die sogenannten „Amyloidplaques“, die extrazellulären Aggregate des Peptids A $\beta$ .

Durch das Scheitern von therapeutischen Ansätzen, die vor allem auf der Amyloid-Kaskaden-Hypothese beruhten, haben sich alternative molekularbiologische Hypothesen der Alzheimer Demenz entwickelt, die immer weiter in den Vordergrund der aktuellen Forschung rücken. Zu ihnen gehört die Mitochondrien-

Kaskaden-Hypothese (Mancuso et al., 2009; Swerdlow, Burns, & Khan, 2010, 2014; Swerdlow & Khan, 2004). Diese Hypothese unterstützt die Annahme, dass die genetische Vererbung eine individuelle Basislinie der mitochondrialen Funktion definiert. Sowohl genetische Faktoren als auch Umweltfaktoren bestimmen die Raten, mit denen sich die Mitochondrienfunktion im Laufe der Zeit ändert. Die Mitochondrien-Kaskaden-Hypothese bezieht sich auf die sporadische Form der Alzheimer Demenz und besagt, dass die mitochondriale Funktion die Expression der Amyloidvorläuferproteine (APP), die APP-Prozessierung und die Beta-Amyloid (A $\beta$ )-Akkumulation beeinflusst und die Amyloid-Kaskade auslöst (Swerdlow et al., 2014).

Im Vordergrund der Tau-Hypothese der Alzheimer-Krankheit steht das hyperphosphorylierte Tau-Protein. Die physiologische Funktion des intrazellulären Tau-Proteins ist die Stabilisierung der Mikrotubuli in den Neuronen. Bei der Pathophysiologie der Alzheimer Demenz kommt es zu einer Hyperphosphorylierung der Tau-Proteine, die sich in Neurofibrillen um den Zellkern lagern und die sogenannten „Tangles“ bilden. Diese Neurofibrillen treten zuerst im entorhinalen Kortex auf und verteilen sich über den Hippocampus in den Temporallappen des Gehirns. Das Auftreten und die räumliche Verteilung der Tau-Pathologie korreliert mit den kognitiven Ausfallerscheinungen des Krankheitsbildes. Der mediale Teil des Temporallappens, der den Hippocampus, den entorhinalen, perirhinalen und den parahippocampalen Kortex enthält, bildet den Teil des Gehirns, dem die Gedächtnisleistung und deren Koordination zugeschrieben wird. Diese sind im Krankheitsverlauf der Alzheimer Demenz bereits im Frühstadium stark betroffen.

Die zweite klassische Hypothese der Alzheimer-Krankheit beschäftigt sich mit dem Metabolismus des Amyloid Precursor Proteins (APP). Aminosäure-Bruchstücke des transmembranären APP bilden extrazelluläre Ablagerungen, die sogenannten „Amyloidplaques“. Das A $\beta$  Peptid besteht aus Aminosäure-Bruchstücken verschiedener Länge, wobei die carboxy-terminalen Bruchstücke, die von der  $\gamma$ -Sekretase gebildet werden, mindestens aus 36 bis 43 Aminosäuren (A $\beta$ <sub>1-36</sub> bis A $\beta$ <sub>1-43</sub>) bestehen (J. Kang et al., 1987). Die am häufigsten produzierte Spezies der APP-Fragmente sind das A $\beta$ <sub>1-40</sub> und das A $\beta$ <sub>1-42</sub> (Masters & Selkoe, 2012). Das APP kann extrazellulär enzymatisch von der  $\beta$ -Sekretase und anschließend von der  $\gamma$ -

Sekretase gespalten werden und es kommt zur Bildung des neurotoxischen Peptids A $\beta$ <sub>1-42</sub> (Walter, Kaether, Steiner, & Haass, 2001). Dieses und andere A $\beta$ -Peptide aggregieren zu  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen, die sich zu den histologisch sichtbaren extrazellulären senilen Plaques ablagern.

Die klassische Amyloid-Kaskaden-Hypothese geht davon aus, dass die Mutation des Gens, welches das APP kodiert, alleine ausreicht um das volle Spektrum der klinischen und pathologischen Veränderungen, die für die Alzheimer Demenz charakteristisch sind, auszulösen (Beyreuther & Masters, 1991; J. A. Hardy & Higgins, 1992; J. Hardy & Allsop, 1991; Joachim & Selkoe, 1992; Masters & Beyreuther, 1991; D J Selkoe, 1991).

Bei der erweiterten Amyloid-Kaskaden-Hypothese wird heute davon ausgegangen, dass nicht nur die A $\beta$ -Plaques und damit das fibrilläre A $\beta$  für die Pathophysiologie der Alzheimer Demenz verantwortlich sind, sondern auch die Oligomere der A $\beta$ -Peptide (Cernescu et al., 2012; Karran & De Strooper, 2016).

Bei mehr als 90% aller Alzheimer Erkrankungen handelt es sich um die sporadische Form der Alzheimer Demenz (SAD), die meist nach dem 65. Lebensjahr auftritt (Barykin, Mitkevich, Kozin, & Makarov, 2017; S L Cole & Vassar, 2006; de Oliveira, Bertolucci, Chen, & Smith, 2014). Weniger als 10% der Alzheimer Erkrankungen sind auf die genetisch bedingte familiäre Form der Alzheimer Demenz (FAD) zurückzuführen.

Die seltenere familiäre Form der Alzheimer Demenz (FAD) ist genetisch bedingt. Genetische Defekte, die Mutationen der Gene, welche die Transmembranproteine APP, Presinilin-1 und Presinilin-2 (PS-1 und PS-2) kodieren, führen zu einer früh auftretenden Alzheimer Demenz. Alle Mutationen betreffen die für die APP Prozessierung relevanten Sekretase-Schnittstellen. Die Mutationen von PS-1 und PS-2 begünstigen die Aktivität des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes und somit die erhöhte Bildung von A $\beta$ -Peptiden. Bei der sogenannten „schwedischen Mutation“ handelt es sich um eine Doppelmutation (K670N/M671L), bei welcher die APP Prozessierung durch die  $\beta$ -Sekretase begünstigt ist und eine gesteigerte Gesamtbildung von A $\beta$  zur Folge hat (X. D. Cai, Golde, & Younkin, 1993; C Haass et al., 1995; Rocchi, Pellegrini, Siciliano, & Murri, 2003). Die FAD beginnt in der Regel bereits vor dem 50. Lebensjahr und deutliche Symptome der Erkrankung sind vor dem 65. Lebensjahr zu erkennen (Straub, 2006). Alle genetisch bedingten

Formen der Alzheimer Demenz beeinflussen die proteolytische Bildung des neurotoxischen Peptids  $A\beta_{1-42}$  oder  $A\beta_{1-40}$  und begünstigen somit die Ablagerung der Amyloid-Plaques im Gehirn.

Die am häufigsten auftretende Form der Alzheimer Demenz ist die sporadische Form (SAD), bei welcher bislang keine genetischen Defekte identifiziert werden konnten. Ein erhöhtes Risiko an der sporadischen Form der Alzheimer Demenz zu erkranken besteht bei homozygoten Trägern des Apolipoprotein-E4 (ApoE4) Gens und des TREM2 Gens. Die genauen Mechanismen, die für das erhöhte Risiko im Zusammenhang mit ApoE4 und TREM2 (Triggering receptor expressed on myeloid cells 2) an der Alzheimer Demenz zu erkranken verantwortlich sind wurden bislang nicht vollständig aufgeklärt (Rohn, 2013). Physiologisch wird ApoE im ZNS von einer Vielzahl von Zellen wie den Astrozyten gebildet. ApoE dient dem Transport von Cholesterol zu den Neuronen um einen erhöhten Cholesterol-Bedarf abzudecken. Neurone nehmen ApoE über spezielle Rezeptoren der LDL-Rezeptor Familie, den ApoE-Rezeptoren, auf. ApoE4 ist besonders anfällig für Proteolyseprozesse (Elliott et al., 2011). Neurotoxische Fragmente, die bei dieser proteolytischen Spaltung entstehen stehen im Zusammenhang mit der Phosphorylierung der Tau-Proteine und der daraus resultierenden Bildung der Tangles (Brecht et al., 2004). Im Tiermodell induzieren die Fragmente des ApoE4 neurodegenerative Erscheinungen (Harris et al., 2003). ApoE4-Fragmente fördern zudem die intrazelluläre Aggregation von  $A\beta_{1-42}$  und erhöhen die Aufnahme von extrazellulärem  $A\beta$ , was zu einer gesteigerten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) führt (Dafnis et al., 2010). TREM2 Rezeptor-Proteine in Mikroglia stimulieren die Phagozytoseaktivität und senken die proinflammatorische Reaktion der Mikroglia (Guerreiro et al., 2013; Jonsson et al., 2013; K. Takahashi, Rochford, & Neumann, 2005). Das TREM2 Protein übt seine Funktion in der Entsorgung geschädigter und apoptotischer Zellen und dem daraus resultierenden Zellschrott aus und löst dadurch eine Schädigungs-induzierte Inflammation auf. Die Mutation des TREM2-kodierenden Gens verursacht ein Fehlen dieser essentiellen Funktion der Mikroglia.

Den Hauptrisikofaktor an Alzheimer Demenz zu erkranken stellt jedoch die Hirnalterung dar (Barykin et al., 2017; Christian Behl, 2012; LeBlanc, 2017; Sanabria-Castro, Alvarado-Echeverria, & Monge-Bonilla, 2017; Stern, 2012). Sowohl symptomatisch als auch unter neuropathologischen Gesichtspunkten gibt es bei der normalen Gehirnalterung im Vergleich zu der Pathologie der Alzheimer Demenz beträchtliche Überschneidungen. So zeigt ein substanzieller Teil nicht

dementer älterer Menschen Alzheimer-ähnliche Läsionen unterschiedlichen Schweregrades des Gehirns. Zu diesen Läsionen gehören Atrophie des Hippocampus und verschiedener Regionen des cerebralen Kortex (Jellinger & Attems, 2013; Maillet & Rajah, 2013). Auf neuronaler Ebene kommt es sowohl im Alter als auch bei Alzheimer Patienten zu einem Abbau der dendritischen Verzweigungen, zu einer Verringerung der Dendritenlänge und der Spine-Dichte. Weitere dieser neuronalen Veränderungen betreffen die Regulation der Neurotrophine, der Rezeptoren, der Neurotransmitter und der elektrischen Transmission.

Der Verlust von Synapsen steht bei der normalen Gehirnalterung im Vordergrund, ist dort aber nicht so stark ausgeprägt wie bei der Alzheimer Demenz, bei der die Nervenzellen massiv degenerieren.

Die neuere Mitochondrien-Kaskaden-Hypothese der Alzheimer Demenz erachtet das Auftreten der Alzheimer Demenz im hohen Alter als einen regulären Prozess an und nicht als Ausnahmeerscheinung (Swerdlow et al., 2014).

Bei allen Formen der Alzheimer Demenz begünstigen die neurofibrillären Tangles und die senilen Plaques den neuronalen Zelltod. Es kommt zu einer chronischen Inflammation in Folge der beiden Läsionstypen (neurofibrilläre Tangles und senile Plaques) und einer daraus resultierenden fortschreitenden Atrophie des Gehirns (Cameron & Landreth, 2010). Bei den absterbenden Neuronen handelt es sich vor allem um cholinerge Neurone, da diese die betroffenen Hirnregionen des cerebralen Cortex und Hippocampus innervieren. Im frühen Stadium der Alzheimer Demenz kommt es zunächst zu einem Funktionsverlust der cholinergen Neurone, im Spätstadium zu deren Absterben (Schliebs & Arendt, 2011).

Von den neuropathologischen Veränderungen leiten sich die progredienten kognitiven psychopathologischen Symptome ab. Da im Verlauf der Krankheit die neuronale Degeneration im entorhinalen Kortex und im Hippocampus beginnt, ist die Leistung des Kurzzeitgedächtnisses als erstes gestört. Über den Neokortex dehnt sich das Absterben der Neurone bis auf den Temporal- und den Pariallappen aus, infolge dessen Störungen der Sprache und visuokonstruktiver Leistungen auftreten. Außerdem sind Störungen der örtlichen und zeitlichen Orientierung, sowie das Erkennen von Gegenständen und Gesichtern typische Symptome der Alzheimer Demenz. Hinzu kommen häufig im Verlauf der Krankheit akzessorische psychopathologische Symptome (Möller, Laux, & Kapfhammer, 2007).

Das „National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke“ und die „Alzheimer Disease and Related Disorders Association“ (NINCDS-ADRDA) führten 1984 Kriterien zur Beurteilung des medizinischen Verlaufs, der klinischen Beobachtung, neuropsychologischer und biochemischer Testverfahren ein um die Diagnostik der Alzheimer Demenz zu vereinheitlichen (G. McKhann et al., 1984). Diese Kriterien wurden im Bezug auf die neuropsychologische Beurteilung, auf aktuelle bildgebende Verfahren, neueste neuropathologische, biochemische und genetische Erkenntnisse im Jahr 2011 aktualisiert (G. M. McKhann et al., 2011). Wichtige Neuerungen sind beispielsweise die Untersuchung des Gehaltes an  $A\beta_{1-42}$  in der Zerebrospinalflüssigkeit, die Magnetresonanztomographie (Dona, Thompson, & Druchok, 2016), sowie die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) (Chételat et al., 2010; Deleaye et al., 2017; Farid, Charidimou, & Baron, 2017; Ganz et al., 2017; Jack et al., 2008)

### 1.6.3 APP Prozessierung

Bei dem Amyloid Precursor Protein (APP) handelt es sich um ein Typ I integrales Membranprotein mit einer größeren extrazellulären Domäne und einer kleineren intrazellulären Domäne (Gopal Thinakaran & Koo, 2008). Das APP wird sowohl in neuronalem als auch in nicht-neuronalem Gewebe expremiert (Niederwolfgruber et al., 1998). Im menschlichen Organismus besteht die Superfamilie der Amyloid Precursor Proteine aus APP selbst und aus den „Amyloid-like Proteinen“ APLP-1 und APLP-2. Es existieren drei Isoformen des wildtyp APPs, das APP695, APP751 und das APP770. Diese Isoformen resultieren aus dem alternativen Splicen des Exons 7 und 8 und haben eine Größe zwischen 110 und 140 kDa (Turner, O'Connor, Tate, & Abraham, 2003). Im Gehirn wird APP695 bevorzugt in Neuronen gebildet und kommt dort im Gegensatz zu den anderen beiden Isoformen in relativ hohen Gehalten vor (Neve, Finch, & Dawes, 1988). APP751 und APP770 werden ubiquitär expremiert und kommen im Gehirn in hohen Mengen in Astrozyten und Endothelzellen vor (Forloni, Demicheli, Giorgi, Bendotti, & Angeretti, 1992; Kitazume et al., 2010; Rohan de Silva et al., 1997). Die drei Isoformen unterscheiden sich strukturell dadurch, dass APP751 und APP770 im Gegensatz zu APP695 eine zusätzliche Kunitz-Typ Protease Inhibitor (KPI) Domäne besitzen. APP770 verfügt außerdem über eine hinzukommende OX-2 Domäne (Nalivaeva & Turner, 2013). Intrazellulär ist APP in der Plasmamembran,

im Trans-Golgi-Netzwerk, im endoplasmatischen Retikulum und auch in endosomalen, lysosomalen und mitochondrialen Membranen lokalisiert (Breen, Bruce, & Anderton, 1991; Kinoshita et al., 2003; Mizuguchi, Ikeda, & Kim, 1992; Sabo, Ikin, Buxbaum, & Greengard, 2001; H. Xu, Greengard, & Gandy, 1995). In Neuronen wird APP Kinesin-vermittelt in Vesikeln anterograd in verschiedene Zellkompartimente transportiert (Gopal Thinakaran & Koo, 2008).

Lokalisiert in der Plasmamembran wird dem APP die Beteiligung bei Funktionen der Zelladhäsion und der Zellbewegung zugeschrieben (Sabo et al., 2001).

APP wird durch die proteolytische Spaltung dreier unabhängiger membranständiger Sekretasen prozessiert. Die komplexe Spaltung erfolgt je nach der Aktivität der Sekretasen an unterschiedlichen Schnittstellen des APPs. Hierbei wird zwischen dem amyloidogenen und nicht amyloidogenen Weg unterschieden. Bei der amyloidogenen Prozessierung spaltet zuerst die  $\beta$ -Sekretase das APP an seiner Ektodomäne, wobei ein N-terminales sekretiertes APP $\beta$  (sAPP $\beta$ ) Fragment und ein membranständig C-terminales C99 Fragment (CTF99) entstehen. Die anschließende heterogene Spaltung des C99 durch die  $\gamma$ -Sekretase findet innerhalb der Membran an der  $\gamma$ -,  $\epsilon$ - und/oder  $\zeta$ -Seite des C99 statt. Hieraus entstehen extrazelluläre A $\beta$ -Peptide verschiedener Länge und einer im Cytoplasma lokalisierten „APP intracellular domain“ (AICD). Die nicht amyloidogene Prozessierung erfolgt durch die Spaltung des APP durch die  $\alpha$ -Sekretase. Hierbei wird APP an seiner extrazellulären Domäne gespalten und es entsteht das N-terminale sekretierte APP $\alpha$  (sAPP $\alpha$ ) und das C-terminale membranständige Fragment C83 (CTF83). Bei der anschließenden Spaltung des C83 durch die  $\gamma$ -Sekretase wird das kurze extrazellulär sekretierte Peptid P3 und die AICD gebildet (Brunholz et al., 2012).



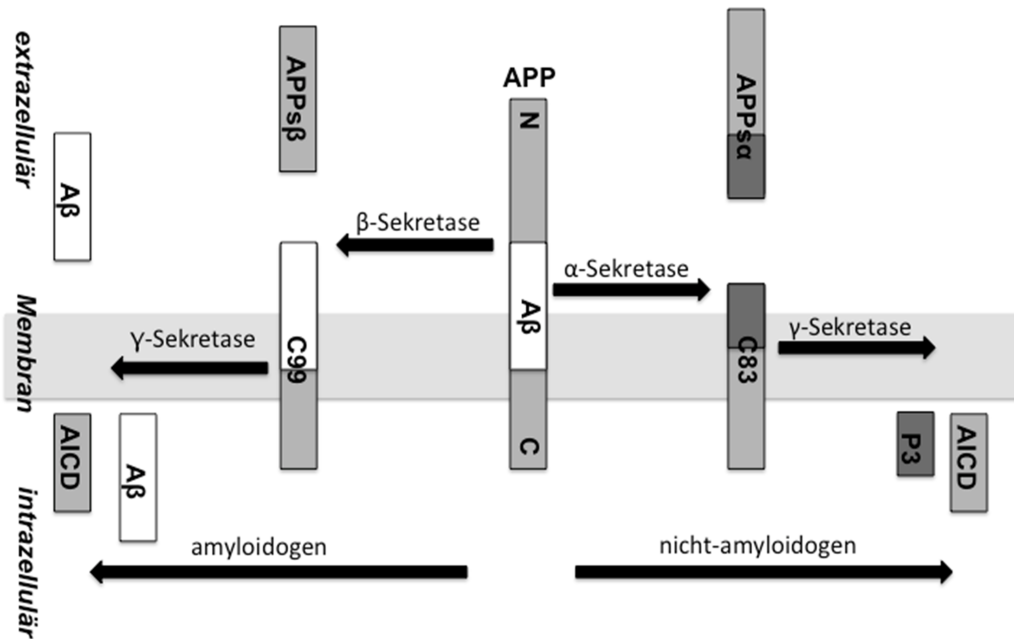


Abbildung 4. Schematische Darstellung der APP Prozessierung.

Es existieren verschieden Adapter-Proteine, die über eine Bindung mit APP in der Lage sind die Endozytose und proteolytische Spaltung von APP zu regulieren. Zu diesen Proteinen gehören Fe65, X11, JIP-1, Dab1, Shc, Grb2, und Numb. Sie alle interagieren mit dem konservierten YENPTY Motiv des APP, das in der intrazellulären Domäne lokalisiert ist (Jacobsen & Iverfeldt, 2009). Von diesen Adapter-Proteinen begünstigen die Proteine ShcC (Src homology collagen-like C), Fe65 und Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2) die amyloidogene Prozessierung von APP (Xie, Dong, Maeda, Xia, & Tanzi, 2007; D. Zhou, Noviello, D'Ambrosio, Scaloni, & D'Adamio, 2004).

#### 1.6.4 Sekretasen

##### 1.6.4.1 $\alpha$ -Sekretase

Drei Mitglieder der ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) Familie, ADAM-9, ADAM-10 und ADAM-17 verfügen über die Fähigkeit APP in das C83 Fragment und sAPP $\alpha$  zu spalten und werden aus diesem Grund als  $\alpha$ -Sekretase bezeichnet (Buxbaum et al., 1998; Koike et al., 1999; Lammich et al., 1999). ADAMs sind Typ I integrale Membranproteine und gehören zu der Superfamilie der Zink-abhängigen Proteasen. Die Expression von ADAM-9 erfolgt nicht Gewebe-spezifisch (Roghani et al., 1999; G Weskamp, Krätzschmar, Reid, & Blobel, 1996). ADAM-10 wird in einer Vielzahl von Geweben expremiert (Chantry & Glynn, 1990; Howard, Lu, Mitchell, Griffiths, & Glynn, 1996). Die Expression von ADAM-10 findet jedoch bevorzugt im Gehirn statt (Fahrenholz & Postina, 2006). Die ADAM-10 Promotor-Aktivität ist besonders hoch in neuronalen Zelllinien (Prinzen, Müller, Endres, Fahrenholz, & Postina, 2005). ADAM-17 wird ebenfalls in vielen Geweben expremiert, vor allem im Gehirn, den Nieren, dem Herzen und der Skelettmuskulatur, wobei die Expression sich während der embryonalen Entwicklung und im Erwachsenen verändert (Black et al., 1997; Gooz, 2010). Während die Expression von ADAM-10 in einem konstitutiven Zusammenhang mit der Bildung von sAPP $\alpha$  steht, üben ADAM-9 und ADAM-17 eine regulatorische Funktion auf die  $\alpha$ -Spaltung des APPs aus (Kuhn et al., 2010; Lammich et al., 1999; Gisela Weskamp et al., 2002). So sind sie in der Lage die Spaltung des APPs an der  $\alpha$ -Seite zu steigern, jedoch kann die Spaltung durch das Fehlen der beiden Enzyme nicht vollständig inhibiert werden.

##### 1.6.4.2 $\beta$ -Sekretase

Bei der amyloidogenen Prozessierung des APPs erfolgt zuerst die  $\beta$ -Spaltung zu sAPP $\beta$  und dem membranständigen C99 Fragment. Diese Spaltung wird durch die beiden Enzyme  $\beta$ -site APP cleaving enzyme 1 (BACE1) und BACE2 katalysiert (Acquati et al., 2000; Sinha et al., 1999; R Vassar et al., 1999). Die beiden Homologen gehören zu den Typ I Transmembran-Aspartyl-Proteasen, wobei der Aspartylsäurerest essentiell für ihre Enzymaktivität ist (R Vassar et al., 1999).

Von BACE1 existieren verschiedene Isoformen, wobei BACE1-501 die katalytische Form in voller Länge ist. Die kürzeren Isoformen haben keine oder nur eine sehr schwache Enzymaktivität und unterscheiden sich außerdem in der Lokalisation ihrer Expression von BACE1-501, sowohl auf subzellulärer Ebene als auch in

Bezug auf die Gewebe-Spezifität (Eehalt et al., 2002; Tanahashi & Tabira, 2001). BACE1 und BACE2 sind zu 71% homolog (Acquati et al., 2000). Auf zellulärer Ebene sind sie beide in post-Golgi-Strukturen und an der Zelloberfläche lokalisiert (Eehalt et al., 2002). Beide werden im Gehirn expremiert, wobei der Gehalt an BACE2 sehr viel geringer ist als der von BACE1. Die Expression von BACE1 findet größtenteils in Neuronen statt und die Expression von BACE2 beschränkt sich vorwiegend auf Astrozyten (Holler et al., 2012; Laird et al., 2005).

BACE1 spaltet APP an zwei verschiedenen Stellen des Proteins. Hauptsächlich erfolgt die  $\beta$ -Spaltung an Asp1, aus welcher an dieser Stelle der N-Terminus von A $\beta$  entsteht. Die BACE1-katalysierte Spaltung kann auch an Glu11 erfolgen, man spricht dann von der  $\beta'$ -Spaltung. Die  $\beta$ -Spaltung erfolgt hauptsächlich im endoplasmatischen Retikulum (ER), wohingegen die  $\beta'$ -Spaltung bevorzugt im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) abläuft (Huse et al., 2002; Kandalepas & Vassar, 2012; Venugopal, Demos, Rao, Pappolla, & Sambamurti, 2008).

BACE2 spaltet APP an Asp1, Phe19 und Phe20, wobei die Spaltprodukte, die aus den beiden letzteren Schnittstellen resultieren bislang nicht in senilen Plaques nachgewiesen wurden (Farzan, Schnitzler, Vasilieva, Leung, & Choe, 2000).

#### 1.6.4.3 $\gamma$ -Sekretase

Die Aktivität der  $\gamma$ -Sekretase involviert einen großen Proteinase-Komplex der aus vier Proteinen besteht. Dieser Komplex setzt sich aus den Proteinen Presenilin1 oder Presenilin2, PEN2 (presenilin enhancer 2), APH1 (anterior pharynx-defective 1) und Nicastrin zusammen (Vetrivel, Zhang, Xu, & Thinakaran, 2006). Initial bilden APH1 und Nicastrin einen Subkomplex um Presinilin zu stabilisieren, PEN2 gewährleistet die  $\gamma$ -Sekretase-Aktivität indem es die Endoproteolyse durch Presinilin erleichtert (Takeshi Iwatsubo, 2004). Die Stöchiometrie des aktiven  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes ist 1:1:1:1 (Presenilin:Nicastrin:APH1:PEN2) (T. Sato et al., 2007). Die eigentliche intramembranäre Protease-Aktivität wird den Presinilinen zugeschrieben (Wolfe et al., 1999).

Am häufigsten treten bei der familiären Form der Alzheimer Demenz Mutationen des Genes auf, welches die Proteine Presinilin-1 und Presinilin-2 (PS-1 und PS-2) kodiert. Hierdurch kommt es zu einer gesteigerten Aktivität der  $\gamma$ -Sekretase, die zu einer erhöhten Bildung des neurotoxischen Peptids A $\beta_{1-42}$  und der daraus resultierenden Ablagerung der senilen Plaques führt. Presiniline sind

Transmembranproteine, die während der post-translationalen Maturation zwischen den Transmembran-Regionen 6 und 7 gespalten werden können. Hierbei wird ein C-terminales und ein N-terminales Fragment gebildet, die nach der Spaltung miteinander interagieren und für die Aktivität der  $\gamma$ -Sekretase notwendig sind (G Thinakaran et al., 1996).

Bei APH1 (anterior pharynx defective 1) handelt es sich um ein transmembranäres Protein, das aus sieben transmembranär lokalisierten Domänen und einem cytosolischen C-Terminus besteht. Die in der Transmembran Domäne lokalisierten Aminosäurereste His-171 und His-197 stabilisieren den Zusammenschluss des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes und beeinflussen dadurch seine proteolytische Aktivität (Pardossi-Piquard et al., 2009).

Nicastrin ist ein Typ I Membran-Glykoprotein und verfügt über eine große Ektodomäne (Shah et al., 2005). Durch Glykosylierungsprozesse während der post-translationalen Maturation kommt es zu einer Konformationsänderung dieser Ektodomäne, die entscheidend ist für die Bildung des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes und die  $\gamma$ -Sekretase-Aktivität (Chávez-Gutiérrez et al., 2008).

PEN2 (PS enhancer 2) gehört zu den sogenannten „hairpin-like“ Proteinen und besitzt sieben transmembran-lokalisierete Domänen. Beide Enden des Proteins sind im Lumen lokalisiert. In die Haarnadelschleife bindet PEN2 die anderen Komponenten des  $\gamma$ -Sekretase-Komplexes, stabilisiert ihn dadurch und erhöht so die  $\gamma$ -Sekretase-Aktivität (Spasic & Annaert, 2008).

Die  $\gamma$ -Sekretase katalysiert die intramembranäre Proteolyse von APP, wobei hauptsächlich die Spaltung an den Aminosäuren 40 und 42 der A $\beta$ -Sequenz erfolgt. Die Spaltung an diesen Schnittstellen werden als  $\gamma$ -Spaltung bezeichnet. Während der  $\beta$ -Spaltung entstehen  $\beta$ -CTFs, die aus 99 Aminosäuren bestehen (C99). Durch die  $\gamma$ -Spaltung entstehen AICD41-99 und A $\beta_{1-40}$  oder AICD43-99 und A $\beta_{1-42}$ . Bei der sogenannten  $\epsilon$ -Spaltung entstehen AICD49-99 und A $\beta_{1-48}$  oder AICD50-99 und A $\beta_{1-49}$  (Takami & Funamoto, 2012; Weidemann et al., 2002). Die  $\zeta$ -Spaltung generiert AICD47-99 und A $\beta_{1-46}$  (G. Zhao et al., 2004). Außerdem kann es bei der  $\gamma$ - und  $\epsilon$ -Spaltung zur Freisetzung von Tripeptiden und Tetrapaptiden an der entsprechenden Schnittstelle kommen, was neben Mutationen des APP die Existenz von A $\beta$ -Peptiden aus 38 bis 49 Aminosäuren erklärt (Takami & Funamoto, 2012).

### 1.6.5 Beta-Amyloid (A $\beta$ )

Bei der proteolytischen Spaltung des transmembranären APPs entstehen je nach dem auf welche Weise diese Prozessierung erfolgt unterschiedlich große extrazelluläre Fragmente, die A $\beta$ -Peptide. Es wurden A $\beta$ -Peptide aus 36 bis 49 Aminosäuren identifiziert, wobei die am häufigsten vorkommenden Isoformen das A $\beta_{1-40}$  und A $\beta_{1-42}$  sind (J. Kang et al., 1987; Takami et al., 2009). A $\beta_{1-42}$  kommt aber im Vergleich zu A $\beta_{1-40}$  viel seltener vor und hat einen Anteil unter 10% der Gesamtmenge der gebildeten A $\beta$ -Peptide. A $\beta_{1-40}$  hingegen hat den Hauptanteil der gebildeten A $\beta$ -Peptide mit ca. 90% (Asami-Odaka, Ishibashi, Kikuchi, Kitada, & Suzuki, 1995). Von diesen beiden Isoformen ist A $\beta_{1-42}$  hydrophober und hat eine weit höhere Affinität zu aggregieren und die pathologischen senilen Plaques zu bilden (Jarrett, Berger, & Lansbury, 1993). A $\beta_{1-42}$  ist die dominierende Isoform in cerebralen Plaques (Younkin, 1998). Die A $\beta$ -Peptide werden zwar als lösliche Monomere gebildet, diese können sich aber auch zu Oligomeren, Protofibrillen und zu Fibrillen zusammenlagern und treten sowohl intrazellulär als auch extrazellulär auf (Frank M LaFerla, Green, & Oddo, 2007). Die Formation der Fibrillen setzt eine komplexe Keimbildung voraus, deren Mechanismus bislang nicht vollständig geklärt ist (Dolphin, Dumy, & Garcia, 2006; Ferrone, 1999). Jedoch besteht der Verdacht, dass dieser Prozess mit einer fehlerhaften Proteinfaltung in Zusammenhang steht (B. Cheng et al., 2013; Eisele, 2013).

Die Monomere A $\beta_{1-40}$  und A $\beta_{1-42}$  besitzen keine feste Peptidstruktur, weisen also keine einzigartige Faltung auf. Sie sind vielmehr in der Lage ihre Konformation sehr schnell in eine andere umzuwandeln. Es kommen Strukturen als gestreckte Kette und auch als kollabierte Spirale (coil) vor. Bevorzugt weist das Monomer eine sogenannte „coil-like“ Peptidstruktur auf, die nur wenige  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen beinhaltet (Baumketner et al., 2006). Der geringe Anteil regulärer  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Strukturen wurde für A $\beta_{1-40}$  und A $\beta_{1-42}$  nachgewiesen (Hou et al., 2004). Der ungeordnete Teil der löslichen monomeren A $\beta_{1-42}$ -Struktur beträgt zwischen 60% und 80%, die Faltblatt-Strukturen nehmen 10% bis 20% des Monomers ein und der Anteil an  $\alpha$ -Helices liegt unter 10% (Bitan, Vollers, & Teplow, 2003; T. H. Huang et al., 2000; Kirkitadze, Condrón, & Teplow, 2001; D M Walsh et al., 1999).

Die vorliegende Struktur wird jedoch von der vorherrschenden Mikroumgebung beeinflusst. Kritische Einflussfaktoren sind beispielsweise der pH-Wert oder die Polarität des Milieus. Im Gegensatz zu dem sehr geringen Anteil an regulären

Sekundärstrukturen des Monomers in Lösung, werden in einer Membran-ähnlichen Umgebung bevorzugt  $\alpha$ -Helices ausgebildet (Crescenzi et al., 2002). Höhere pH-Werte hingegen begünstigen  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen (Coles, Bicknell, Watson, Fairlie, & Craik, 1998). Es wird vermutet, dass diese  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen für die Bildung eines Paranukleus und die daraus resultierende Aggregation von A $\beta$  eine wesentliche Rolle spielen (Grant et al., 2007).

Die Oligomerisierung von A $\beta_{1-40}$  involviert ein Gleichgewicht aus Monomer, Dimer, Trimer und Tetramer. Besonders der N-Terminus (Region 1-10) und die Ladungen der Aminosäurereste 22 und 23 sind maßgeblich für die Polymerisierung. Anders verhält es sich bei der Oligomerisierung von A $\beta_{1-42}$ , hier liegen die maßgeblichen Regionen bei den Aminosäureresten 19-21 und 41-42 des C-Terminus. Die Bildung des Paranukleus hängt von einer hydrophoben Seitenkette des Aminosäurerests 41 ab, diese hydrophobe Seitenkette muss mindestens die Größe einer Methylgruppe aufweisen. Für die Selbst-Assoziation ist die Präsenz des Aminosäurerests 42 notwendig. Außerdem begünstigt eine zentrale hydrophobe Cluster-Region (central hydrophobic Cluster; CHC) bei den Aminosäureresten 19-21 die Oligomerisierung von A $\beta_{1-42}$  (Bitan et al., 2003; Côté, Laghaei, Derreumaux, & Mousseau, 2012; Jarrett et al., 1993). Insgesamt verfügt A $\beta_{1-42}$  über eine schnellere Aggregations-Kinetik als A $\beta_{1-40}$  und A $\beta_{1-43}$  (Bitan et al., 2003; L. Fu et al., 2017; Jarrett et al., 1993).

Aggregate von A $\beta$  bewegen sich in Größenordnungen von Dimeren bis hin zu Partikeln mit einem Molekulargewicht von einer Million Dalton oder größer (Burdick et al., 1992; Garzon-Rodriguez, Sepulveda-Becerra, Milton, & Glabe, 1997; Harper, Wong, Lieber, & Lansbury, 1997; Hilbich, Kisters-Woike, Reed, Masters, & Beyreuther, 1991; Soreghan, Kosmoski, & Glabe, 1994; D M Walsh, Lomakin, Benedek, Condron, & Teplow, 1997).

Dimere sind der Ausgangspunkt für die Bildung von A $\beta$ -Oligomeren höherer Ordnung. Verschiedene Homodimere werden aus A $\beta$ -Monomeren mit unterschiedlicher Konformation aufgebaut. Die einzelnen Klassen und Subklassen der Dimere variieren also nur in der Konformation und nicht in der Aminosäuresequenz (Tsigelny et al., 2013). Prefibrilläre Oligomere lagern sich zu ringförmigen Poren-ähnlichen Oligomeren zusammen, den sogenannten ringförmigen Protofibrillen (annular protofibril) (Lashuel, Hartley, Petre, Walz, & Lansbury, 2002). Wobei aber nicht alle Dimere in der Lage sind sich zu Oligomeren zusammenzulagern, dies erfolgt in Abhängigkeit ihrer Konformation

(Tsigelny et al., 2013). Die strukturelle Anordnung der Protofibrillen wird durch interfasziale Interaktion amphipathischer  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen angetrieben, die Toxizität der Protofibrillen liegt in ihrer Fähigkeit Membran-permeabilisierende  $\beta$ -Fass-Poren zu bilden (Kayed et al., 2009).

Den Endpunkt des Aggregations-Prozesses von  $A\beta$  stellen die  $A\beta$ -Fibrillen dar. Sie kommen in sehr großen Mengen in Gehirnen von Patienten mit Alzheimer Demenz vor und sind in neuritischen Plaques, in diffusem und vaskulärem Amyloid lokalisiert (J.-X. Lu et al., 2013). In  $A\beta$ -Fibrillen liegen überwiegend  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen vor (Serpell, 2000).

Bei den  $A\beta$ -Fibrillen besteht ein Zusammenhang zwischen ihrer Struktur und der intrinsischen Toxizität, mit steigender Länge und mit steigendem Anteil an regulären  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen der Fibrillen erhöht sich deren Toxizität (Lührs et al., 2005; Selkoe et al., 1997). Im Menschen ist der Gehalt an  $A\beta_{1-40}$  ungefähr fünf Mal größer als der Gehalt an  $A\beta_{1-42}$ , aber das Verhältnis von  $A\beta_{1-40}$  zu  $A\beta_{1-42}$  in  $A\beta$ -Aggregaten des menschlichen Gehirns unterscheidet sich stark von Patient zu Patient und weist kein festes Verhältnis auf (Gravina et al., 1995; T Iwatsubo et al., 1994). Im Gehirn können polymorphe  $A\beta_{1-42}$ -Fibrillen aber nicht das Keimen von  $A\beta_{1-40}$ -Fibrillen initiieren (J.-X. Lu et al., 2013).

$A\beta$ -Peptide treten sowohl intrazellulär als auch extrazellulär auf (Frank M LaFerla et al., 2007). Intraneuronale  $A\beta$ -Immunoreaktivität tritt bei Patienten mit leichten kognitiven Einschränkungen (mild cognitive impairment; MCI) in Hirnregionen wie dem Hippocampus und dem entorhinalen Kortex auf, die auch bei der frühen Form der Alzheimer Demenz betroffen sind (Gouras et al., 2000). Die intrazelluläre Akkumulation von  $A\beta_{1-42}$  wird daher als früh auftretendes Ereignis in der Pathologie der Alzheimer Demenz angesehen, die bereits vor der Bildung der neurofibrillären Tangles und der  $A\beta$ -Plaques auftritt. Das meiste intraneuronale  $A\beta$  endet am C-Terminus mit dem Aminosäurerest 42 und nicht mit dem Aminosäurerest 40 (Gouras et al., 2000). Interessanter Weise sinkt der Gehalt an intraneuronalem  $A\beta$  sobald der Gehalt an extrazellulärem  $A\beta$  steigt (Mori et al., 2002; Oddo, Caccamo, Smith, Green, & LaFerla, 2006).

Das APP, aus welchem die  $A\beta$ -Peptide durch proteolytische Spaltung generiert werden ist in der Plasmamembran, im Trans-Golgi-Netzwerk, im Endoplasmatischen Retikulum und auch in endosomalen, lysosomalen und

mitochondrialen Membranen lokalisiert (Breen et al., 1991; Kinoshita et al., 2003; Mizuguchi et al., 1992; Sabo et al., 2001; H. Xu et al., 1995).

Tritt die A $\beta$ -Spaltung innerhalb der Zellgrenzen auf, wird intrazelluläres A $\beta$  gebildet. Erfolgt die A $\beta$ -Spaltung an der Plasmamembran, so wird das gebildete A $\beta$  in die extrazelluläre Flüssigkeit sezerniert. Das Maß in welchem die intrazelluläre Bildung von A $\beta$  beziehungsweise die Sezernierung von A $\beta$  in den Extrazellulärraum stattfindet ist stark von dem jeweiligen Zelltyp abhängig. Im Vergleich zu den anderen Zelltypen im Gehirn bilden die humanen Astrozyten höhere Gehalte an A $\beta$  über den sekretorischen Weg und diese Tatsache legt nahe, dass Gliazellen die hauptsächlichen Produzenten von A $\beta$  im Gehirn darstellen (Busciglio, Gabuzda, Matsudaira, & Yankner, 1993).

Zusätzlich zu dem intrazellulär gebildeten A $\beta$ , sind Neurone in der Lage vorher sezerniertes A $\beta$  aus dem extrazellulären A $\beta$ -Pool wieder in die Zelle aufzunehmen und es so in den intrazellulären A $\beta$ -Pool zu internalisieren (Clifford et al., 2007; Frank M LaFerla et al., 2007). In Neuronen bindet A $\beta_{1-42}$  mit einer hohen Affinität an den  $\alpha 7$ -Nikotin-Acetylcholin-Rezeptor ( $\alpha 7$ nAChR) und diese Bindung resultiert in der Internalisierung des Rezeptors und der intrazellulären Akkumulation von A $\beta$  (Nagele, D'Andrea, Anderson, & Wang, 2002; H. Y. Wang et al., 2000). A $\beta_{1-40}$  zeigt eine viel geringere Bindungsaffinität zu dem  $\alpha 7$ nAChR als A $\beta_{1-42}$  (D. H. S. Lee & Wang, 2003). Neben dem  $\alpha 7$ nAChR, kann A $\beta$  direkt oder über Liganden wie ApolipoproteinE (ApoE) an „lipoprotein receptor-related proteins“ (LRP) an der Plasmamembran von Neuronen binden, diese Proteine gehören zur Familie der „low density lipoprotein“ (LDL)-Rezeptoren. Nach dieser Bindung erfolgt die zelluläre Aufnahme von A $\beta$  durch Endozytose (Bu, Cam, & Zerbinatti, 2006). Ein weiterer Rezeptor, der die neuronale Aufnahme von A $\beta$  nach dessen Bindung vermittelt ist der N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor (Bi, Gall, Zhou, & Lynch, 2002; Snyder et al., 2005).

Die Internalisierung von A $\beta$  findet in Neuronen und Astrozyten außerdem auch über den „receptor for advanced glycation end products“ (RAGE) statt (Arancio et al., 2004; Sasaki et al., 2001). Der „formyl peptide receptor like 1“ (FPRL1) ist ein von Mikroglia und Astrozyten exprimierter G-Protein-gekoppelter Rezeptor, welcher A $\beta$  bindet und eine chemotaktische Reaktion und die daraus resultierende Internalisierung von A $\beta_{1-42}$  vermittelt (Iribarren, Zhou, Hu, Le, & Wang, 2005).



### 1.6.6 Neurotoxizität von Beta-Amyloid (A $\beta$ )

Die monomeren A $\beta$ -Peptide sind nicht neurotoxisch. Bereits Dimere des A $\beta$ <sub>1-42</sub> und kleine Oligomere führen zur Bildung ringförmiger Protofibrillen und wirken neurotoxisch (Christian Haass & Selkoe, 2007; Jana, Cappai, Pham, & Ciccotosto, 2016; Roher et al., 1996; Shankar et al., 2008). Neurotoxische Effekte konnten bislang für lösliche Oligomere und Protofibrillen des A $\beta$  nachgewiesen werden (Jana et al., 2016; Klyubin et al., 2004; Krafft & Klein, 2010; Lesné et al., 2006; Noguchi et al., 2009; Sebollela et al., 2014; Dennis J Selkoe, 2008; Dominic M Walsh et al., 2002; R. S. Wong, Cechetto, & Whitehead, 2016). Jedoch spielt für die Ausprägung der Neurotoxizität der löslichen Oligomere und Protofibrillen die Interaktion verschiedener A $\beta$ -Spezies und die Fähigkeit sich von einer in die andere Spezies umzuwandeln eine wichtige Rolle (Vadukul, Gbajumo, Marshall, & Serpell, 2017). Wobei unabhängig von dieser Tatsache die löslichen A $\beta$ -Oligomere eindeutig am stärksten neurotoxisch wirken (Jan et al., 2011; Jarosz-Griffiths, Noble, Rushworth, & Hooper, 2016; S. Kumar et al., 2016; Salahuddin, Fatima, Abdelhameed, Nusrat, & Khan, 2016). Es gibt jedoch Hinweise aus einer Studie an primären Neuronen, dass die neurotoxische Wirkung von A $\beta$ -Oligomeren zumindest teilweise reversibel ist (Tanokashira et al., 2017).

Die weitaus überwiegende Zahl der Studien über die Wirkung der A $\beta$ -Fibrillen in Zellkulturen belegt, dass extrazelluläre A $\beta$ -Fibrillen neurotoxisch auf diverse Zelllinien und primäre Neurone wirken (Chimon et al., 2007; Hoyer, 1994; Lorenzo & Yankner, 1994, 1996; Petkova et al., 2005; Pike, Walencewicz, Glabe, & Cotman, 1991; Price, Sisodia, & Gandy, 1995; Qiang, Yau, Luo, Mattson, & Tycko, 2012; D M Walsh et al., 1999). In diesem Zusammenhang induziert A $\beta$  die vermehrte Bildung von Hydrogenperoxid und Lipidperoxiden, welche innerhalb der Neurone akkumulieren und zu Zellschäden durch freie Radikale führen (C Behl, Davis, Lesley, & Schubert, 1994). Im Hirngewebe werden die A $\beta$ -Fibrillen als Initiatoren für inflammatorische Prozesse, für oxidative Schäden und andere pathogene Prozesse angesehen (Cameron & Landreth, 2010; Glass, Saijo, Winner, Marchetto, & Gage, 2010; Sultana, Perluigi, & Butterfield, 2009; Töugu, Tiiman, & Palumaa, 2011).

Allgemein bedingt extrazelluläres A $\beta$  die erhöhte Anfälligkeit für sekundäre Insulte wie oxidativen Stress und daraus resultierende DNA-Schaden (C Behl et al., 1994; Ghribi, Herman, & Savory, 2003), eine veränderte Kalziumhomöostase (DiChiara et al., 2017; Drews et al., 2016; R. Ho, Ortiz, & Shea, 2001; Mattson et al., 1993),

die Aktivierung von Mikroglia und inflammatorische Prozesse (Eikelenboom et al., 2002; Gasic-Milenkovic, Dukic-Stefanovic, Deuther-Conrad, Gärtner, & Münch, 2003; Monsonogo, Imitola, Zota, Oida, & Weiner, 2003), die Induktion der Apoptose (Colurso, Nilson, & Vervoort, 2003; Hashimoto et al., 2003), sowie die Induktion der lysosomalen Protease-Aktivität und direkte Membranschäden (Bahr & Bendiske, 2002; Bendiske & Bahr, 2003; Fernandez-Perez, Peters, & Aguayo, 2016). A $\beta$ -Oligomere, aber nicht die A $\beta$ -Fibrillen, beeinträchtigen die Langzeitpotenzierung (LTP) und verursachen kognitive Defizite wie die verschlechterte Gedächtnisleistung (Christian Haass & Selkoe, 2007; Lesné et al., 2006).

Die Akkumulation von intrazellulärem A $\beta$  steht in einer direkten Verbindung zum neuronalen Zelltod, wobei auch hier das oligomere A $\beta$  und nicht das fibrilläre A $\beta$  die toxische Spezies darstellt (Chui et al., 2001; Kienlen-Campard, Miolet, Tasiaux, & Octave, 2002; F M LaFerla, Tinkle, Bieberich, Haudenschild, & Jay, 1995; R. H. Takahashi, Nagao, & Gouras, 2017; Yan Zhang, McLaughlin, Goodyer, & LeBlanc, 2002). Mehrere molekulare und zelluläre Mechanismen sind für die neurotoxische Wirkung von intrazellulärem A $\beta$  und den damit verbundenen Gedächtnisstörungen verantwortlich. Durch die Akkumulation von intrazellulärem A $\beta$  wird die Struktur subzellulärer Kompartimente verändert, es kommt zu einer erhöhten Anzahl an Elementen des Golgi-Apparates, der Lysosomen und der Lipofuszin-Körper im Hippocampus und dem Neokortex (Lopez, Bell, Ribeiro-da-Silva, & Cuello, 2004). Außerdem bedingt die Akkumulation von intrazellulärem A $\beta$  in den Axonen Veränderungen der axonalen Struktur und des axonalen Transports. So tritt eine Schwellung der Axone auf und es kommt zur Axonopathie (Suo et al., 2007; Wirths, Weis, Szczygielski, Multhaup, & Bayer, 2006). Außerdem verhindert die A $\beta$ -Akkumulation die Entsorgung multivesikulärer Körper durch Inhibition der Aktivität verschiedener Enzyme des Ubiquitin-Proteasom-Systems (Almeida, Takahashi, & Gouras, 2006).

### 1.6.7 Cholesterol-Metabolismus und Alzheimer Demenz

Der Cholesterol-Metabolismus ist mit neuropathologischen Prozessen der Alzheimer Demenz, wie dem APP-Metabolismus, der Tau-Phosphorylierung und der synaptischen Plastizität verbunden (S L Cole & Vassar, 2006; M. Simons, Keller, Dichgans, & Schulz, 2001; Benjamin Wolozin, 2004). Es besteht eine enge Relation zwischen der Alzheimer Demenz und koronaren Herzerkrankungen, Hypertonie und Hypercholesterinämie, denn diese Erkrankungen stellen signifikante Risikofaktoren der Alzheimer Demenz dar (Kivipelto et al., 2002; I Skoog et al., 1996; Soneira & Scott, 1996; D L Sparks et al., 1990). Viele dieser Risikofaktoren sind mit einer cerebralen Hypoperfusion verbunden und zahlreiche Studien implizieren die Beteiligung der Blutgefäße des Gehirns an der sporadischen Alzheimer Demenz (González et al., 1995; Ingmar Skoog & Gustafson, 2002).

Zusätzlich scheint die gestörte Regulation der Cholesterin-Homöostase bei der Alzheimer Demenz durch die Tatsache bestätigt, dass einige Polymorphismen von Genen, die in den Transport oder den Katabolismus von Cholesterol involviert sind, als wichtige Risikofaktoren der Alzheimer Demenz identifiziert wurden. Beispiele hierfür sind das Allel  $\epsilon 4$  des ApoE, welches eines der hauptsächlichen Apolipoproteine im Gehirn ist, aber auch Polimorphismen des LRP und Cyp46 (Jarvik et al., 1995; Kölsch et al., 2003; Papassotiropoulos et al., 2003, 2005; Strittmatter et al., 1993).

In vitro Studien mit Neuronen haben gezeigt, dass ein erhöhter zellulärer Cholesterin-Gehalt in einer erhöhten A $\beta$ -Produktion resultiert und auch in vivo führte eine Cholesterin-reiche Diät zu erhöhten A $\beta$ -gehalten im Gehirn (Fassbender et al., 2001; Refolo et al., 2000; D L Sparks, 1999; D L Sparks et al., 1994). Des Weiteren konnte in einer Studie mit gealterten Ratten gezeigt werden, dass eine Cholesterin-reiche Diät einen schädlichen Effekt auf die Gedächtnisleistung und hippocampale Marker hat (Ledreux, Wang, Schultzberg, Granholm, & Freeman, 2016). In einer Tierstudie mit transgenen 3xTg-AD Mäusen wurden die Expressionsgehalte verschiedener A $\beta$ -Influxtransporter und A $\beta$ -Effluxtransporter der Blut-Hirn-Schranke untersucht. Dabei zeigte sich, dass mit steigendem Alter der Tiere die Expression des A $\beta$ -Influxtransporters RAGE (receptor for advanced glycation end products) ansteigt und gleichzeitig sinkt die Expression des Lrp-1 Rezeptors, der in den Epithelzellen der Blut-Hirn-Schranke für die Rezeptor-vermittelte Endozytose und den Efflux von A $\beta_{1-40}$  und A $\beta_{1-42}$  verantwortlich ist (Deane, Bell, Sagare, & Zlokovic, 2009; Do et al., 2016; Storck et

al., 2016). Die Expression des Lrp-1 Rezeptors ist in den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke im Menschen und Tiermodellen sowohl bei der normalen Gehirnalterung als auch bei der Alzheimer Demenz reduziert (D. E. Kang et al., 2000; Shibata et al., 2000).

Obwohl alle diese Studien den Zusammenhang einer veränderten Cholesterol-Homöostase und der A $\beta$ -Produktion belegen, bleiben die vermittelnden Mechanismen unklar.

Es wird vermutet, dass die Cholesterin-abhängige Regulation der sogenannten „Lipid Rafts“ teilweise für diesen Zusammenhang verantwortlich sind. Lipid Rafts sind dynamische hoch geordnete Membranmikrodomänen, diese sind angereichert mit Cholesterol, Sphingolipiden und gesättigten Phospholipiden, im Gegensatz zu den ungesättigten Phospholipiden der umgebenden Lipiddoppelschicht der Membran. Proteine können selektiv in diese Mikrodomänen aufgenommen oder von ihnen ausgeschlossen werden, aus diesem Grund werden die Lipid Rafts als funktionelle Plattform für Moleküle, die in Signaltransduktions-Prozesse involviert sind, angesehen (Ikonen, 2001; Parton & Richards, 2003; K. Simons & Ikonen, 1997; K. Simons & Toomre, 2000). So sind die Lipid Rafts auch durch ihren Einfluss auf die membrangebundene  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase in die APP-Prozessierung involviert (Cordy, Hooper, & Turner, 2006). Presinilin, Nicastrin, APH1, PEN2 und ein geringer Anteil an APP sind in Lipid Rafts lokalisiert und die Aktivität der  $\gamma$ -Sekretase wird direkt durch Cholesterol reguliert (Bouillot, Prochiantz, Rougon, & Allinquant, 1996; Cordy, Hussain, Dingwall, Hooper, & Turner, 2003; Eehalt, Keller, Haass, Thiele, & Simons, 2003; Urano et al., 2005; Vetrivel et al., 2004; Wahrle et al., 2002). Es gibt Hinweise, dass die Lokalisation von APP in Lipid Rafts die  $\beta$ -Spaltung begünstigt, wohingegen APP außerhalb der Lipid Rafts bevorzugt über die nicht amyloidogene  $\alpha$ -Spaltung prozessiert wird (Eehalt et al., 2003). Ein niedriger Cholesterin-Gehalt oder die Störung der Lipid Rafts könnten auf diese Weise an einer erniedrigten A $\beta$ -Bildung beteiligt sein (Reid, Urano, Kodama, & Hamakubo, 2007). So konnte gezeigt werden, dass membranäres Cholesterin in Lipid Rafts im exofazialen Blatt der neuronalen Membran die Bildung von A $\beta$  provoziert (Gunter P Eckert, Kirsch, Leutz, Wood, & Müller, 2003; Kirsch, Eckert, & Mueller, 2002, 2003). Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass endogenes oligomeres A $\beta_{1-40}$  die APP-Prozessierung in neuronalen Membranen über die Reduktion der Membranfluidität und Komplexierung mit GM-1 Gangliosid stimuliert. Diese in vitro Befunde deuten darauf hin, dass endogenes A $\beta$  die eigene

Produktion durch die Verringerung der Membranfluidität in Neuronen stimuliert (I. Peters et al., 2009).

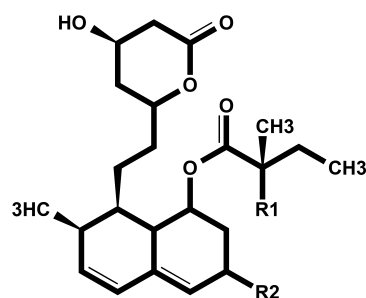
### 1.6.8 Statine und Alzheimer Demenz

Statine sind kompetitive Inhibitoren des wichtigsten regulatorischen Enzyms des Mevalonat-Weges, der HMG-CoA-Reduktase. Dieses Enzym reguliert nicht nur die Bildung von Cholesterin, sondern neben anderen auch von FPP, GGPP, Ubichinon und Dolichol. Statine werden als Cholesterinsenker eingesetzt. Jedoch besitzen sie neben der Cholesterin-senkenden Wirkung zahlreiche pleiotrope Effekte, wie die Verbesserung der endothelialen Funktion, antithrombotische Erscheinungen und die Stabilisierung atherosklerotischer Plaques, antiproliferative Effekte, die Reduktion vaskulärer inflammatorischer Prozesse und antioxidative Effekte (Barone, Di Domenico, & Butterfield, 2013; Liao & Laufs, 2005; Saeedi Saravi, Saeedi Saravi, Arefidoust, & Dehpour, 2017). Viele dieser pleiotropen Effekte sind vermutlich auf die Statin-induzierte Reduktion der Isoprenoide FPP und GGPP zurückzuführen (Liao & Laufs, 2005; Q. Zhou & Liao, 2010). Generell bewirken Statine bei einer chronischen Einnahme veränderte Genexpressionsmuster im cerebralen Kortex (Johnson-Anuna et al., 2005). Es gibt Publikationen, welche die Statin-induzierten Effekte auf die APP Prozessierung und A $\beta$ -Produktion über einen Isoprenoid-abhängigen Signalweg aufzeigen, und auch solche, die einen Cholesterin-abhängigen Signalweg beschreiben (L. Li, Zhang, Cheng, Cao, & Parent, 2012). So sinken durch die Behandlung mit Lovastatin in humanen transfizierten SH-SY5Y-APP695 die Gehalte des FPP, GGPP, Cholesterin und A $\beta_{1-40}$  (Hooff, Peters, Wood, Müller, & Eckert, 2010). In murinen Neuroblastomazellen stimulieren Atorvastatin und Simvastatin die Aktivität der  $\alpha$ -Sekretase und begünstigen so die nicht amyloidogene Prozessierung von APP durch die Dezymierung von FPP und die Inhibition der Farnesylierung der GTPasen (Pedrini et al., 2005). Zusätzlich führt in vitro die Behandlung mit Statinen zu einer erniedrigten Aktivität der  $\gamma$ -Sekretase in den Lipid Rafts (Urano et al., 2005). Außerdem reduziert die Behandlung mit Statinen die A $\beta$ -Produktion durch die Inhibition der Isoprenylierung der Rho-GTPasen Rac1, RhoA und Cdc42 und der -GTPasen Rab1B, Rab4, Rab5B und Rab6 in vitro (Ostrowski, Wilkinson, Golde, & Landreth, 2007). Im Gegensatz dazu stimuliert GGPP die Aktivität der  $\gamma$ -Sekretase und führt zu einer Akkumulation von

intrazellulärem A $\beta$  und auch hier reduziert die Behandlung mit Lovastatin und Simvastatin das sezernierte A $\beta$  (Sarah L Cole et al., 2005; Y. Zhou et al., 2008). Zahlreiche in vivo Studien zeigen, dass die Behandlung mit Statinen zu einer Reduktion der A $\beta$ -Gehalte führt, wohingegen andere Studie die Senkung des A $\beta$  durch die Statine für nicht geklärt halten (Fassbender et al., 2001, 2002; Höglund et al., 2004; Hosaka, Araki, Oda, Tomidokoro, & Tamaoka, 2013; N. Sato, Shinohara, Rakugi, & Morishita, 2012).

Neuropathologische Studien legen nahe, dass die Statine die Progression der Alzheimer Demenz verzögern, indem sie die Inflammation inhibieren ohne die A $\beta$ -Gehalte zu beeinflussen (B Wolozin et al., 2006). In mehreren Beobachtungsstudien mit einer relativ geringen Probandenzahl wurde die Reduktion des Risikos an AD zu erkranken beschrieben, jedoch konnte dieses Ergebnis weder in der groß angelegten Cache County Studie, der Cardiovascular Health Studie noch in der Religious Orders Studie bestätigt werden (Ricciarelli et al., 2012). Und auch in der randomisierten kontrollierten PROSPER Studie mit Pravastatin und der MCR/BHF Heart Protection Studie mit Simvastatin konnte kein Nutzen für die Kognition durch die Behandlung mit Statinen in der AD festgestellt werden (Heart Protection Study Collaborative Group, 2002; Shepherd et al., 2002). Hinzu kommt, dass zwar vorläufige Daten über die Behandlung mit Atorvastatin bei milder bis moderater Demenz positive Ergebnisse zeigte, diese aber auch nicht in der randomisierten kontrollierten LEADe Studie belegt werden konnten (Feldman et al., 2010; D Larry Sparks et al., 2005).

Insgesamt bleiben die exakten Mechanismen, die zu den positiven Effekten der Behandlung mit Statinen in der Alzheimer Demenz führen unklar, jedoch spielt wohl der Einfluss auf die Isoprenoide FPP und GGPP eine wesentliche Rolle (S L Cole & Vassar, 2006; Gunter P Eckert et al., 2009a; McTaggart, 2006).



**Abbildung 5.** Chemische Strukturformel der inaktiven Prodrugs der Statine Lovastatin (R1 = H, R2 = CH3) und Simvastatin (R1 = CH3, R2 = CH3).

### 1.6.9 Isoprenoide, Rho-GTPasen und Alzheimer Demenz

FPP und GGPP sind Intermediate des Mevalonat-Weges und fungieren als post-translationale Modifikation kleiner GTPasen. Die Prenylierung kleiner GTPasen erfolgt katalysiert von den spezifischen Prenyltransferasen durch die kovalente Bindung der Geranylgeranylgruppe beziehungsweise der Farnesylgruppe an das –CXXX-Motiv der GTPase. Diese post-translationale Modifikation ist notwendig um die kleinen GTPasen in Membranen zu verankern, folglich wird hierdurch ihre zelluläre Lokalisation beeinflusst. Da die GTPasen an der Membran durch die GEFs aktiviert werden, ist die Isoprenylierung essentiell für ihre Funktionen in den darauf folgenden unterschiedlichen Signalkaskaden. Und auch die Interaktion der GTPasen mit anderen regulatorischen Proteinen wie den GAPs und GDIs wird durch die Lokalisation der GTPasen beeinflusst. Wenn eine prenylierte GTPase weder an die Plasmamembran oder eine intrazelluläre Membran, noch an einen GDI im Cytosol gebunden ist, erfolgt ihre Degradation (Boulter et al., 2010). Die Prenylierung der GTPasen ist somit auch ein Faktor, der den Abbau dieser Proteine beeinflusst. Zu den intrazellulären Funktionen der GTPasen gehören unter anderem der Aufbau des Cytoskeletts, das neuronale Zellwachstum, die Leitung und Ausläuferbildung von Axonen, das Dendritenwachstum, die Synapsenformation und die synaptische Plastizität (L. Luo, 2000; Qiu et al., 1997; Qiu, Chen, Kirn, et al., 1995; Qiu, Chen, McCormick, et al., 1995).

Es wurde gezeigt, dass die Gehalte spezifischer Isoprenoide in AD Hirnen im Vergleich zu Kontrollhirnen des gleichen Alters verändert sind (Edlund, Söderberg, & Kristensson, 1994). In der weißen und grauen Substanz des Neokortex sind bei Alzheimer Patienten die Isoprenoide FPP und GGPP erhöht, wohingegen die Gehalte an Cholesterol und die Expression der HMG-CoA-Reduktase keinen Unterschied zu den altersbezogenen Kontrollhirnen zeigen (Gunter P Eckert et al., 2009a). Dies lässt die Vermutung zu, dass bei der Alzheimer Demenz selektiv die Regulation der Isoprenoide FPP und GGPP innerhalb des Mevalonat-Weges verändert ist (Hooff, Wood, Müller, & Eckert, 2010). Die heterozygote Deletion der FTase und auch der GGTase-I in transgenen APPPS1 Mäusen führt zu erniedrigten A $\beta$ -Gehalten, A $\beta$ -Ablagerungen und Neuroinflammation, dabei verbessern sich die Lern- und Gedächtnisfunktionen durch die Deletion der FTase, wobei dieser Effekt jedoch bei der Deletion der GGTase-I ausbleibt (S. Cheng et al., 2013a). In transgenen APP Tg2576 Mäusen (schwedische Mutation) wurde eine Reduktion der Expression von RhoA in den Synapsen detektiert, die mit einer Erhöhung der RhoA Expression in distrophen Neuriten einhergeht (Huesa et al.,

2010). Im Hippocampus dieser Tiere war die RhoA Expression erniedrigt und die Autoren schließen auf eine Veränderung der subzellulären Verteilung dieser GTPase von der besonders der Hippocampus als beeinträchtigt Hirnareal in der AD betroffen ist. Eine weitere Studie mit Tg2576 Mäusen beschreibt eine erhöhte RhoA Expression in Neuronen des cerebralen Kortex, die in der Umgebung von A $\beta$ -Plaques lokalisiert sind (Petraatos et al., 2008). In dieser Studie wurde außerdem in humanen SH-SY5Y Neuroblastomazellen gezeigt, dass A $\beta$  die Gehalte des aktiven GTP-gebundenen RhoA in den Neuronen erhöht. Im cerebralen Kortex transgener TgCRND8 Mäuse bedingt A $\beta$  die Reduktion der prenylierten Rab-GTPasen, was sich auch bei der Behandlung von Neuronen mit oligomerem A $\beta_{1-42}$  bestätigt (Mohamed, Saavedra, Di Pardo, Sipione, & Posse de Chaves, 2012). Hierbei wird die Prenylierung der Rab-GTPasen Rab7 und Rab9 durch A $\beta$  inhibiert, wobei SREBP-2 (sterol regulatory element-binding protein-2) als eines der Targets von A $\beta$  identifiziert wurde (Mohamed et al., 2012).

In humanen Gehirnen von Alzheimer Patienten konnte ein erhöhter Gehalt von Rab10 nachgewiesen werden (Ridge et al., 2017). Außerdem wurde eine erhöhte Aktivität der Rab-GTPase Rab5 in Gehirnen von Alzheimer Patienten sowie in Gehirnen von Mausmodellen der Alzheimer Demenz detektiert (W. Xu, Fang, Ding, & Wu, 2018).

In Neuronen induziert oligomeres A $\beta_{1-42}$  die Aktivierung von Rac1 über den Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Phosphoinositol-dependent Kinase (PDK)/novel Protein Kinase C (nPKC) Signalweg und führt zum neuronalen Zelltod (Manterola et al., 2013). PKCs sind kritische Komponenten in Signaltransduktionswegen, die sowohl proapoptotische als auch antiapoptotische Prozesse in Neuronen regulieren (B.-H. Choi, Hur, Lee, Jun, & Kim, 2006; Cordey & Pike, 2006; Maher, 2001; Weinreb, Bar-Am, Amit, Chillag-Talmor, & Youdim, 2004). Rac1 wurde außerdem als eine essentielle Komponente der A $\beta$ -Signalkaskade identifiziert, bei welcher A $\beta_{1-42}$  über Rac1 die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies induziert (M. Lee et al., 2002). In hippocampalen Neuronen bewirkt A $\beta_{1-42}$  ebenfalls die Aktivierung von Rac1 über den Rac1-spezifischen GEF Tiam1 und auch die Aktivierung von Cdc42, was zu einer veränderten Dynamik des Aktinzytoskeletts führt (Mendoza-Naranjo, Gonzalez-Billault, & Maccioni, 2007). Die Inaktivierung von Rac1 führt zu einer abgeschwächten Aktivität der  $\gamma$ -Sekretase die in erniedrigten Gehalten der AICDs und der Akkumulation der intrazellulären C-terminalen APP-Fragmente (CTFs) resultiert (Boo, Sohn, Kim, Song, & Mook-Jung, 2008). In einer weiteren Studie wurden durch die Inhibition von Rac1 durch



die Substanz EHT 1864 die Gehalte von  $A\beta_{1-40}$  und  $A\beta_{1-42}$  in vitro und in vivo reduziert ohne die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase direkt zu inaktivieren (Désiré et al., 2005). In hippocampalen Primärneuronen und transfizierten HEK293 Zellen erniedrigt ein weiterer Rac1-spezifischer Inhibitor NSC23766 Dosis-abhängig die Aktivität von Rac1 und auch die Expression von APP, wobei die Produkte der proteolytischen Spaltung von APP wie sAPP $\alpha$ ,  $A\beta_{1-40}$  und  $A\beta_{1-42}$  ansteigen (P.-L. Wang, Niidome, Akaike, Kihara, & Sugimoto, 2009). Die Ergebnisse dieser Publikation weisen darauf hin, dass Rac1 die Transkription des APP-Gens in hippocampalen Primärneuronen reguliert.

Im Gehirn von ausgewachsenen Säugern spielen die GTPasen Ras, Rac1, Cdc42 und RhoA eine wichtige Rolle für die synaptische Plastizität, indem sie die neuronale Architektur, die synaptische Konnektivität und Wirkungskraft beeinflussen (S L Cole & Vassar, 2006; Gonzalez-Billault et al., 2012; Pilpel & Segal, 2004). Diese Prozesse werden maßgeblich über die Aktivität der kleinen GTPasen Rac1, Cdc42 und RhoA reguliert, für deren Aktivierung wiederum ihre Prenylierung notwendig ist (Martinez & Tejada-Simon, 2011). Eine exzessive Aktivierung von Rac1 übt einen negativen Effekt auf die synaptische Plastizität und die damit verbundenen synaptischen und kognitiven Funktionen aus (Oh et al., 2010). Aber auch die pharmakologische Inaktivierung von Rac1 beeinträchtigt die Langzeitpotenzierung (long-term potentiation = LTP), was bereits in Neuronen des Hippocampus in Mäusen nachgewiesen wurde (Martinez & Tejada-Simon, 2011). Bei der Alzheimer Demenz kommt es zur Abnahme der kognitiven Funktionen und der synaptischen Plastizität.  $A\beta_{1-42}$  übt einen negativen Effekt auf die synaptische Plastizität aus, indem es die Langzeitpotenzierung (long-term potentiation = LTP) inhibiert (Babri, Amani, Mohaddes, Alihemmati, & Ebrahimi, 2012; Lilja et al., 2013; Turner et al., 2003).

Bei dem Verhältnis der Isoprenoide FPP und GGPP, der kleinen GTPasen und den pathophysiologischen Mechanismen der Alzheimer Demenz handelt es sich um ein überaus komplexes Zusammenspiel unterschiedlicher Ereignisse, die über diverse Signalwege miteinander verknüpft sind.

## **1.7 Gehirnalterung**

### **1.7.1 Demographische Alterung der deutschen Bevölkerung**

Die Rahmenbedingungen in modernen Gesellschaften haben einen Einfluss auf den Gesundheitszustand der Bevölkerung und tragen dazu bei, dass mehr Menschen ein hohes Alter erreichen können. Im weltweiten Vergleich ist Deutschland heute (nach Japan, Italien und der Schweiz) das Land mit dem vierthöchsten Durchschnittsalter der Bevölkerung ("United Nations Population Divisions- Population, environment and development," 2001). Und weltweit hat Deutschland (nach Italien und Griechenland) den dritthöchsten Anteil der Bevölkerung ab 60 Jahren (Bundesamt, 2002). In den nächsten Jahrzehnten wird zwar die Bevölkerungszahl in Deutschland wegen der anhaltend niedrigen Geburtenraten abnehmen, doch die demographische Alterung wird sich weiter fortsetzen. Hierzu trägt auch die Entwicklung des hochaltrigen Bevölkerungsanteils bei, hierbei spricht man von Menschen im Alter von 80 und mehr Jahren. Aktuell sind in Deutschland rund 2,9 Millionen Menschen 80 Jahre und älter. Das Statistische Bundesamt rechnet für das Jahr 2050 mit etwa 8 Millionen Menschen in Deutschland, die 80 Jahre und älter sind. Neben dem Rückgang der Kinderzahlen ist eine wesentliche Hauptursache dieser Entwicklung der Anstieg der Lebenserwartung, die durch die sinkende Sterblichkeit im fortgeschrittenen und hohen Erwachsenenalter zustande kommt (Bundesamt, 2002).

### 1.7.2 Isoprenoide, Rho-GTPasen und und Gehirnalterung

Die zerebrale Alterung ist ein komplexer heterogener Prozess. Bei diesem Prozess finden zahlreiche molekulare Veränderungen statt, welche die Veränderung von Synapsen, Axonen und Dendriten bedingen und somit multiple neuronale Netzwerke beeinflussen. Von dieser Veränderung der Neurone sind besonders die strategisch wichtigen Gehirnregionen wie der Hippocampus und die prefrontalen Regionen betroffen (Christian Behl, 2012; Jellinger & Attems, 2013; Maillet & Rajah, 2013; Stern, 2012). Die Schädigung der Synapsen ist noch vor dem Verlust der Neurone die hauptsächliche Ursache für den Verfall des alternden Gehirns (Burke & Barnes, 2006; Grillo et al., 2013; Morrison & Baxter, 2012).

Altersbedingte synaptische Dysfunktion erfolgt aufgrund der Zerstörung synaptischer Kontakte zwischen axonalen Buttons und dendridischen Spines (Hof & Morrison, 2004; Mostany et al., 2013). Die Immunoreaktivität von synaptischen Markern, wie Synaptophysin und GAP43, ist in humanen und Nagere- Hirnen in Abhängigkeit zu deren Alter vermindert (Casoli, Spagna, Fattoretti, Gesuita, & Bertoni-Freddari, 1996; Keleshian, Modi, Rapoport, & Rao, 2013; Saito et al., 1994). Die Verringerung der Spine-Dichte, die mit der funktionellen Schädigung korreliert (A. Peters, Sethares, & Luebke, 2008), wurde bereits in alternden Gehirnen von Nagern (Bloss et al., 2013; Bloss, Janssen, McEwen, & Morrison, 2010; Wallace, Frankfurt, Arellanos, Inagaki, & Luine, 2007), nicht-menschlichen Primaten (Page et al., 2002) und Menschen (Anderson & Rutledge, 1996; Mostany et al., 2013) nachgewiesen. In vivo Zwei-Photonen Bildgebung zeigt eine Veränderung in der Größe und Stabilität der Spines und ihren Dornfortsätzen während der normalen Gehirnalterung auf (Grillo et al., 2013; Mostany et al., 2013).

Die kleinen GTPasen Rac1 und RhoA haben sich als kritische Regulatoren des Mikrotubuli- und Aktin-Zytoskeletts herausgestellt, die beide die neuronale Morphogenese fördern (Gonzalez-Billault et al., 2012). Die meisten Rho-GTPasen werden mit GGPP prenyliert, hierbei katalysiert die Geranylgeranyltransferase-I (GGTase-I) die kovalente Bindung der Geranylgeranyl-Gruppe über die Thioether-Bindungsstelle an das CAX-Motiv der GTPase. Diese post-translationale Modifikation erhöht die Insertion der GTPasen in zelluläre Membranen (Wright & Philips, 2006), die für ihre Funktion benötigt wird (Samuel & Hynds, 2010). Die Funktionen prenylierter Proteine im Gehirn sind bereits bekannt, aber nicht die genauen Mechanismen der Prenylierungsprozesse. Es wurde bereits publiziert, dass die Gehalte der beiden Isoprenoide FPP und GGPP in murinen

Gehirngewebe alter Tiere verglichen mit Gehirngewebe junger Kontrolltiere signifikant erhöht sind (Hooff et al., 2012). Außerdem führt die Verringerung der GGPP Gehalte zu einer Reduktion prenylierter GTPasen (Ostrowski et al., 2007; Rilling, Bruenger, Leining, Buss, & Epstein, 1993).

Die Veränderung der Cholesterinhomöostase, die nicht nur das Cholesterin sondern auch die Intermediate des Mevalonatweges betrifft, steht im direkten Zusammenhang mit der Gehirnalterung (Edlund et al., 1994; Y Zhang, Appelkvist, Kristensson, & Dallner, 1996). Diese Veränderung der Cholesterinhomöostase im Gehirn wirkt sich auf die Eigenschaften von synaptischen und mitochondrialen Membranen aus (G P Eckert, Kirsch, & Mueller, 2001; Igbavboa, Avdulov, Schroeder, & Wood, 1996; Wood, Schroeder, Igbavboa, Avdulov, & Chochina, 2002). Durch oxidativen Stress ausgelöste Veränderungen des Ceramid- und des Cholesterinmetabolismus sind ebenfalls bei der Gehirnalterung zu beobachten (Cutler et al., 2004). Die zahlreichen Untersuchungen des Cholesteringehaltes im gealterten Gehirn ergeben kontroverse Ergebnisse. So existieren zahlreiche Publikationen, die einen altersbedingten Anstieg des Cholesterols in Gehirnmembranen festgestellt haben (Andersson et al., 1995; G P Eckert et al., 2001; Eckmann, Eckert, Leuner, Muller, & Eckert, 2013; Söderberg, Edlund, Kristensson, & Dallner, 1990b). Im Gegenzug gibt es aber auch Befunde, die einen altersbedingt verringerten Cholesteringehalt in Membranen verschiedener Gehirnregionen aufzeigen (Söderberg et al., 1990b; Svennerholm et al., 1991, 1997, 1994; Thelen et al., 2006).

### 1.7.3 7,8-Dihydroxyflavon

Das Flavonoid 7,8-Dihydroxyflavon (7, 8-DHF) ist Teil der Familie der polyphenolischen Verbindungen und kommt in zahlreichen Früchten und Gemüsesorten natürlich vor (Harborne & Williams, 2000). 7, 8-DHF wird aufgrund seiner hohen antioxidativen Wirksamkeit den Antioxidantien zugeordnet (Foti, Piattelli, Baratta, & Ruberto, 1996). In hippocampalen HT-22 Zellen, die keine TrkB-Rezeptoren exprimieren, konnte gezeigt werden, dass 7, 8-DHF über seine antioxidative Aktivität in der Lage ist neuroprotektiv gegenüber Glutamin-induzierter Toxizität zu wirken (J. Chen et al., 2011).

Außerdem fungiert 7, 8-DHF als hoch affiner selektiver TrkB-Rezeptor-Agonist und bewirkt die Dimerisierung und Autophosphorylierung des TrkB-Rezeptors und dadurch die Aktivierung nachgeschalteter Signalwege (Jang et al., 2010). 7, 8-DHF besitzt somit die gleichen neurotrophen Eigenschaften wie BDNF. So vermittelt 7, 8-DHF das Überleben von Neuronen, deren Differenzierung, synaptische Plastizität und Neurogenese (Liu et al., 2010; Tsai et al., 2013; Zeng et al., 2011; Zeng, Lv, et al., 2012; Zeng, Liu, Wu, Liu, & Hu, 2012; Z. Zhang et al., 2014). Diese neurotrophe Aktivität von 7, 8-DHF wurde bereits in Zusammenhang mit neurologischen Erkrankungen wie dem Schlaganfall und Morbus Parkinson nachgewiesen (Jang et al., 2010). Auch in Mausmodellen der Alzheimer Demenz konnte 7, 8-DHF Erinnerungsdefizite aufheben, die Gehalte an BACE1 erhöhen und den Verlust von Synapsen verhindern (Devi & Ohno, 2012; Z. Zhang et al., 2014). Bei einem Mausmodell des Rett-Syndroms konnten mit Hilfe von 7, 8-DHF ebenfalls positive therapeutische Effekte erzielt werden (R. A. Johnson et al., 2012). Neben dem Neurogenese promovierenden Effekt, wirkt 7, 8-DHF auch stark antidepressiv (Liu et al., 2010). Wie BDNF, so ist auch 7, 8-DHF in der Lage Angiogenese zu stimulieren (Williams, 2011). In präklinischen Studien konnte gezeigt werden, dass 7, 8-DHF das emotionale Lernen erhöht (Andero et al., 2011). Hierbei überquert 7, 8-DHF die Blut-Hirn-Schranke und bindet selektiv an TrkB-Rezeptoren und aktiviert diese, auch in Abwesenheit von endogenem BDNF (D. C. Choi et al., 2010; Jang et al., 2010).

## 1.8 Glioblastom (Glioblastoma multiforme)

Astrozytome repräsentieren die am häufigsten vorkommende Form von Tumoren des zentralen Nervensystems (ZNS). Diese Tumore werden von der World Health Organization (WHO) histopathologisch in vier Stufen klassifiziert. Die Astrozytome der Stufe I und II werden als „low-grade astrocytomas“ bezeichnet, diese werden als benigne Tumore betrachtet. Bei den Tumoren der Stufen II, III und IV handelt es sich um infiltrierende Astrozytome, die in der Lage sind sich von einer niedrigeren Stufe in eine höhere Stufe zu entwickeln. Die Astrozytome der Stufe III und IV werden als maligne Tumore eingestuft. Die diffusen Tumore der Stufe III werden als anaplastische Astrozytome bezeichnet, sie sind im Gegensatz zu den Tumoren der Stufe IV durch eine fehlende vaskuläre Proliferation und Nekrose gekennzeichnet. Die Astrozytome der Stufe IV werden aufgrund der großen Vielfalt ihrer histopathologischen Erscheinungen auch als „Glioblastoma multiforme“ (GBM) oder Glioblastome bezeichnet. Sie zeichnen sich durch nekrotisierendes Gewebe aus, welches von anaplastischen Zellen und hyperplastischen Blutgefäßen umgeben ist. Außerdem sind GBM hoch mitotisch und invasiv. GBM ist die aggressivste Form von ZNS Tumoren mit einer schlechten Prognose, die Rate der Lebenserwartung für Patienten mit GBM liegt im Schnitt bei einem Jahr nach der Diagnose (Lo, 2010a; Schwartzbaum, Fisher, Aldape, & Wrensch, 2006; Selznick et al., 2008).

Die derzeitige Standardtherapie sieht bei der Diagnose von GBM die chirurgische Resektion gefolgt von Strahlen- und Chemotherapie mit Temozolomid (TMZ) vor, aber das erneute Auftreten der Erkrankung ist üblich (J. Clarke, Butowski, & Chang, 2010; J. Ho et al., 2013; Scaringi, Enrici, & Minniti, 2013; Stupp et al., 2005). Neben der Immunotherapie und Gentherapie existiert ein weites Feld der medizinischen Behandlungsoptionen. Alkylierende chemotherapeutische Agenzien sind Teil der heutigen Therapie, obwohl viele GBM Formen in der Lage sind Mechanismen für Resistenzen zu generieren (J. Clarke et al., 2010). Untersuchungen über die Biologie der GBM befähigen molekular gerichtete Agenzien aberrante Signalwege zu inhibieren. Einer dieser Signalwege ist der Ras/ERK/MAPK Signalweg, der in Glioblastoma Zellen hyperaktiviert vorliegt.

### 1.8.1 Isoprenoide, GTPasen und GBM

Die Veränderung der Ras-vermittelten Signaltransduktion stellte sich als zentraler Schritt in der molekularen Pathogenese der GBM heraus (End, 1999; Lo, 2010b; Eric K Rowinsky & Patnaik, 2000). Die Veränderung der Signalweiterleitung kann von onkogenen Mutationen, einerseits von den voran geschalteten Wachstumsfaktoren und ihren Rezeptoren oder von den nachgelagerten Komponenten der Signalkaskade wie beispielsweise Ras und Raf selbst herrühren. Studien belegen, dass die Aktivierung des Ras/ERK/MAPK Signalweges in Glioblastomen viel häufiger durch die erhöhte Zahl der Kopien von Ras, Raf und voran geschalteter Wachstumsfaktoren oder durch die Amplifizierung und Mutation der Wachstumsfaktor-Rezeptoren ausgelöst wird als durch die Aktivierung von Ras- oder Raf-Mutationen (Grzmil & Hemmings, 2010; Jeuken, van den Broecke, Gijzen, Boots-Sprenger, & Wesseling, 2007; B. Li et al., 2004). Daher stellt die Farnesylierung der Ras-Proteine eines der molekularen Targets für die therapeutischen Agenzien, die den Ras/ERK/MAPK Signalweg fokussieren, dar. Die posttranslationale Farnesylierung von H-Ras ist für die transformierende Aktivität der GBM, wie dem Signalisieren von Wachstum, Differenzierung und Apoptose, erforderlich (Eric K Rowinsky & Patnaik, 2000). Prenylierte Ras-Proteine aktivieren direkt nachgeschaltete Effektoren (Raf, MEK, ERK) und üben dadurch einen deutlichen Einfluss auf die Onkogenese und Tumorbilogie aus (Lo, 2010a).

Rac1 ist ein Mitglied der Familie der Rho-GTPasen und ist ebenfalls in die Prozesse der Proliferation und Migration involviert, die während der Gliomagenese über die Ras/MEK/ERK Kaskade stattfinden (Alexander & Friedl, 2012; X. Zhou et al., 2013). Rho-GTPasen werden bevorzugt mit GGPP durch die Transferase GGTase-I prenyliert (F. L. Zhang & Casey, 1996). Auf diese Weise wird Rac1 kovalent an einen GGPP-Rest gebunden, der wiederum als lipophiler Anker für die Befestigung in der Plasmamembran fungiert, die Lokalisation der Aktivierung und biologischen Funktion der GTPasen (Samuel & Hynds, 2010). FPP und GGPP stammen von Mevalonat ab, dessen Produktion durch die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) Reduktase katalysiert wird. Die HMG-CoA Reduktase ist der limitierende Faktor des gesamten Cholesterolsyntheseweges. Farnesyltransferase-Inhibitoren (FTI), Geranylgeranyltransferase-Inhibitoren (GGTI) und duale Prenyltransferase-Inhibitoren (DPTI) inhibieren die Farnesylierung und / oder Geranylgeranylierung von kleinen GTPasen und haben in vitro und in vivo Antitumor-Effekte gezeigt, jedoch in klinischen Studien nur

geringe Effizienz gezeigt (Fritz, 2009). Wie auch immer, die Ras-Aktivierung stört die Strahlen- und Chemotherapie und aus diesem Grund werden FTIs, GGTIs und DPTIs mehr für die kombinierte Therapie zur Reduzierung der Störung durch die Ras Hyperaktivierung in GBM berücksichtigt (Cengel & McKenna, 2005; Kim, Fernandes, Gupta, McKenna, & Bernhard, 2004; Messina et al., 2004).

### 1.8.2 Perillylalkohol

Perillylalkohol ist ein in der Natur vorkommender sekundärer Pflanzenstoff und gehört zur Familie der Monoterpene. Perillylalkohol ist eines der von Limonen abgeleiteten Monoterpene, die in der Lage sind die post-translationalen Isoprenylierung von Proteinen zu inhibieren und dadurch die Proliferation von Tumorzellen zu verringern (Crowell, 1999; Crowell, Chang, Ren, Elson, & Gould, 1991; Gelb et al., 1995; Schulz, Bühling, & Ansorge, 1994). Es besteht ein Zusammenhang zwischen der Struktur der Monoterpene und ihrer Aktivität als Inhibitoren der Protein-Isoprenylierung und Zellproliferation (Crowell, Ren, Lin, Vedejs, & Gould, 1994). Die relative Wirksamkeit der von Limonen abgeleiteten Monoterpene ist am stärksten bei den Monohydroxylen, Estern und Aldehyden ausgeprägt und zu diesen gehört auch der Perillylalkohol. So konnte gezeigt werden, dass Perillylalkohol die Geranylgeranyltransferase Typ I und Typ II in NIH3T3 Zellen inhibiert (Ren, Elson, & Gould, 1997). In immortalisierten humanen vaskulären glatten Muskelzellen induziert Perillylalkohol durch die Inhibition der Geranylgeranyltransferase Apoptose (Unlu, Mason, Schachter, & Hughes, 2000). Perillylalkohol inhibiert auch die Farnesyltransferase und beeinflusst dadurch den Ras-Signaltransduktionsweg und übt so eine chemopreventive Wirkung aus (End, 1999; Lantry et al., 2000). Jedoch gibt es Hinweise, dass Monoterpene in vitro das Tumorzellwachstum unabhängig vom Ras-Signaltransduktionsweg inhibieren (Karlson et al., 1996). So wurde zusätzlich zu der inhibitorischen Wirkung von Perillylalkohol auf die Farnesyltransferase gezeigt, dass Perillylalkohol die Synthese kleiner GTPasen und der HMG-CoA-Reduktase supprimiert (Mo & Elson, 2004). Ein hohes Potential für die Therapie maligner Tumore wird den Substanzen zugesprochen, die den Ras/Raf/ERK Signalweg inhibieren und hierzu gehört ebenfalls der Perillylalkohol (Lo, 2010b).

Dem Perillylalkohol werden pleiotrope Wirkungen zugeschrieben. Aus diesem Grund werden die Mechanismen, die für die antitumorale Wirkung des



Perillylalkohols verantwortlich sind kontrovers diskutiert. Neben dem Einfluss auf zahlreiche Proteine aus verschiedenen Signalkaskaden ist Perillylalkohol in der Lage den Zellzyklusstillstand hervorzurufen und mit einer selektiven Wirkung auf Tumorzellen Apoptose auszulösen. Diese selektive Wirkung auf Tumorzellen ist unter anderem darin begründet, dass verschiedene Monoterpene wie Perillylalkohol selektiv in Tumorgewebe transportiert werden, beziehungsweise dort akkumulieren. In vitro inhibiert Perillylalkohol die Migration von Tumorzellen und die Angiogenese.

So verringert Perillylalkohol die Freisetzung von VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) aus Karzinomzellen, jedoch bewirkt er eine erhöhte Freisetzung von Angiopoetin 2 aus Endothelzellen (Hübner, 2008). Ausserdem inhibiert Perillylalkohol die Na/K-ATPase in humanen Glioblastoma multiforme Zellen (D. G. Garcia et al., 2010). In humanen Glioblastoma multiforme Zellen induziert Perillylalkohol Apoptose (Fernandes, da Fonseca, Teixeira, & Gattass, 2005).

In klinischen Studien wurde jedoch festgestellt, dass die Glioblastoma Zellen in der Lage sind ein Chemo-resistentes Proteinexpressions-Muster auszubilden. Diese Resistenz bildete sich bei den GBM Patienten nach durchschnittlich sieben Monaten der Therapie mit Perillylalkohol aus. In vitro Versuche mit Perillylalkohol an A172 Glioblastoma Zellen bestätigen die Ausbildung eines Chemo-resistenten Proteinexpressionsprofils (de Saldanha da Gama Fischer et al., 2011). Bei Patienten mit rezidivierenden malignen Gliomen erhöht Perillylalkohol die durchschnittliche Lebenserwartung um acht Monate. Perillylalkohol wird bei klinischen Studien der Phase I und II intranasal verabreicht und erzielt gute Ergebnisse bei der Inhibition des in Glioblastoma multiforme hyperaktivierten Ras-Signalweges (Clovis O da Fonseca et al., 2011; Clovis Orlando da Fonseca, Schwartzmann, et al., 2008; Clovis Orlando da Fonseca, Linden, Futuro, Gattass, & Quirico-Santos, 2008).

### **1.8.3 Statine und Glioblastoma multiforme**

Statine sind kompetitive Inhibitoren der HMG-CoA-Reduktase. Dieses Enzym katalysiert die Umsetzung von HMG-CoA zu Mevalonat und bestimmt die Reaktionsgeschwindigkeit der gesamten Umsetzung des Mevalonat-Weges. Außer der Bildung von Cholesterol wird auch die Bildung zahlreicher Intermediate

des Cholesterolsyntheseweges wie FPP, GGPP, Ubichinon und Dolichol über dieses Enzym reguliert. Statine werden gegen Hypercholesterinämie eingesetzt, besitzen aber zahlreiche pleiotrope Effekte. Zu diesen gehören die Verbesserung der endothelialen Funktion, antithrombotische Erscheinungen und die Stabilisierung atherosklerotischer Plaques, antiproliferative Effekte, die Reduktion vaskulärer inflammatorischer Prozesse und antioxidative Effekte (Barone et al., 2013; Liao, 2002; Liao & Laufs, 2005). Die exakten Mechanismen dieser Effekte sind nicht vollständig aufgeklärt. Fakt ist jedoch, dass Mevalonat der Metabolit der HMG-CoA-Reduktase ist und auch der Ausgangsstoff von Cholesterol und den Isoprenoiden FPP und GGPP. Diese Isoprenoide sind essentiell für die post-translationalen Modifikation intrazellulärer kleiner GTPasen wie den Rho- und Ras-Proteinen. Die Rho- und Ras-GTPasen wiederum regulieren die Signaltransduktion verschiedener Membranrezeptoren, die kritisch für die Transkription von Genen sind, die in die Zell-Proliferation, Differenzierung und Apoptose involviert sind. Viele der pleiotropen Effekte der Statine sind vermutlich auf die Statin-induzierte Reduktion der Isoprenoide FPP und GGPP zurückzuführen (Liao & Laufs, 2005; Q. Zhou & Liao, 2010). Sowohl bei kardiovaskulären Erkrankungen, als auch bei neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer Demenz und bei verschiedenen Krebserkrankungen werden Statine mittlerweile erfolgreich zur Therapie eingesetzt.

Zahlreiche Studien belegen, dass Statine positive Effekte in der Prävention und Behandlung von Krebs erzielen, und das unabhängig von ihrem Effekt auf den Gehalt an Cholesterol im Serum (Demierre, Higgins, Gruber, Hawk, & Lippman, 2005; Graaf, Richel, van Noorden, & Guchelaar, 2004; Hindler, Cleeland, Rivera, & Collard, 2006). Hierbei spielt vielmehr die Wirkung der Statine auf essentielle zelluläre Funktionen wie der Proliferation und Differenzierung der Zellen eine Rolle (Bos, 1989; Casey, 1995a, 1995b).

Statine hemmen das Tumorstadium und induzieren Apoptose in einer Vielzahl von Krebszellen (Tapia-Pérez, Kirches, Mawrin, Firsching, & Schneider, 2011; W. W. L. Wong, Dimitroulakos, Minden, & Penn, 2002; H. Wu et al., 2009; Yanae et al., 2011). Hierzu gehören beispielsweise Melanoma, Glioma, Neuroblastoma und Leukämie-Zelllinien (Crick, Andres, Danesi, Macchia, & Waechter, 1998; Dimitroulakos et al., 2000; Girgert, Vogt, Becke, Bruchelt, & Schweizer, 1999; Hindler et al., 2006; Koyuturk, Ersoz, & Altioek, 2004; Shellman et al., 2005).

Für die Art der Wirkung von Statinen spielen sowohl die Dosierung als auch der Zelltyp eine essentielle Rolle. In Studien mit Krebszellen induzieren Statine

Apoptose, wohingegen in Studien mit nicht krebsartigen Zellen gegenteilige Effekte erzielt werden (W. W. L. Wong et al., 2002; Wood, Igbavboa, Muller, & Eckert, 2013). In niedriger Dosierung üben Statine eine anti-apoptotische Wirkung aus, jedoch induzieren sie bei einer hohen Dosierung Apoptose und verändern die Gehalte verschiedener Mitglieder der Bcl-2 Familie (Wood et al., 2013; Wood, Müller, & Eckert, 2014).

Bei circa 30% der humanen Krebsarten sind die Ras-Proteine hyperaktiviert, das heißt sie verbleiben dauerhaft im aktiven Zustand und leiten dadurch unkontrolliert Wachstumssignale weiter (E K Rowinsky, Windle, & Von Hoff, 1999). Das Ras-Protein wird nach der Synthese einigen post-translationalen Modifikationen unterzogen. Eine der wichtigsten dieser post-translationalen Modifikationen des Ras-Proteins ist die Prenylierung mit einem Farnesylrest. Diese Farnesylierung wird durch das Enzym Farnesyltransferase (FTase) katalysiert. Erst durch die Prenylierung kann das Ras-Protein an der Plasmamembran lokalisiert werden, wo es mit anderen Proteinen interagiert und aktiviert wird. Aus diesem Grund stellt die Farnesylierung ein wichtiges therapeutisches Target zur Unterbindung der Hyperaktivität der Ras-Proteine dar (Eric K Rowinsky & Patnaik, 2000). Eine therapeutische Möglichkeit liegt in der Inhibition des Enzyms FTase durch sogenannte FTase-Inhibitoren. Eine andere Möglichkeit ist die Verringerung von FPP über die Inhibition der HMG-CoA-Reduktase durch Statine.

Lovastatin ist das erste Statin, das zur Lipidsenkung eingesetzt und zugelassen wurde. Lovastatin ist ein natürlich vorkommendes Monacolin und wird von dem Schimmelpilz *Aspergillus terreus* und verschiedenen *Monascus* Spezies produziert (Fugmann, Lang-Fugmann, & Steglich, 2014). Bei Untersuchungen von Primärkulturen humaner Glioblastoma-Zellen reguliert Lovastatin sowohl die Proliferation als auch die Migration der Glioblastoma-Zellen herunter (Bouterfa et al., 2000). Bereits in frühen Studien mit Glioblastoma-Zellen konnte nachgewiesen werden, dass Lovastatin in diesen Zellen das Wachstum hemmt und Apoptose induziert (Jones et al., 1994; F. Schmidt, Groscurth, Kermer, Dichgans, & Weller, 2001). Hierbei sensibilisiert Lovastatin humane Glioblastoma-Zellen für die TRAIL-induzierte Apoptose (Chan, Chen, Poon, & Liu, 2008). Es bewirkt auch die Hochregulierung des BH3-only Proteins Bim und sorgt so für einen erhöhten Zelltod in Glioblastoma-Zellen (Jiang, Zheng, Lytle, Higashikubo, & Rich, 2004).

In einigen Tumoren sind die Tyrosinkinasen der EGFR-Familie (= Epidermal Growth Factor Receptor) überexprimiert. Eine Hemmung dieser Rezeptoren durch den Tyrosinkinase-Inhibitor Gefitinib verlangsamt das Tumorstadium und sorgt

für eine Tumorregression. Lovastatin ist in der Lage in Glioblastoma-Zellen die Aktivität von Gefitinib unabhängig von dem Status der Tyrosinkinase EGFRvIII und der Phosphatase PTEN (= Phosphatase and Tensin homolog) zu erhöhen (Cemeus, Zhao, Barrett, Lorimer, & Dimitroulakos, 2008).

In verschiedenen Tierstudien konnte in Mausmodellen mit Glioblastoma multiforme und in Nude-Mäusen mit H-Ras onkogen transformierten Zellen gezeigt werden, dass Lovastatin das Tumorwachstum inhibiert und die Nekrose und Apoptose erhöht (Bababegy et al., 2009; Sebt, Tkalcevic, & Jani, 1991).

In einer klinischen Studie der Phase I-II wurde der Effekt von hoch dosiertem Lovastatin mit und ohne Strahlentherapie auf Patienten mit anaplastischen Astrozytoma oder GBM getestet (Larner et al., 1998). In dieser Studie wurden die hohen Dosen Lovastatin in Kombination mit der Strahlentherapie gut toleriert und zeigten keine limitierende Neurotoxizität auf. Auch in der Neurochirurgie konnten mit Hilfe der Behandlung mit hoch dosierten Statinen der Zelltod von Glioma-Zellen induziert werden (Tapia-Pérez, Sanchez-Aguilar, & Schneider, 2010).

## 1.9 Zielsetzung der Arbeit

Im Zuge der vorliegenden Arbeit sollten drei Fragestellungen experimentell bearbeitet werden. Diese drei Fragestellungen beziehen sich auf die Veränderung der Lipidhomöostase im Zusammenhang mit der Gehirnalterung, mit der Pathophysiologie der Alzheimer Demenz und der Glioblastoma multiforme.

### 1.9.1 Zielsetzung der Arbeit im Zusammenhang mit der Gehirnalterung

Bei der Gehirnalterung finden zahlreiche molekulare Veränderungen statt, welche mit Schädigungen und Dysfunktionen von Synapsen, Axonen und Dendriten einhergehen. Die Rho-Familie der kleinen GTPasen spielt eine wichtige Rolle bei der neuronalen Homeostase und Signaltransduktion, da sie unter anderem das axonale Wachstum und die Synaptogenese regulieren. Bei den meisten Rho-GTPasen erfolgt eine Prenylierung mit dem Isoprenoid GGPP. Die Geranylgeranylierung der Rho-GTPasen wird durch die Geranylgeranyltransferase-I (GGTase-I) katalysiert. Diese post-translationale Modifikation bedingt die Insertion der GTPasen in zelluläre Membranen, die für ihre Funktion benötigt wird. In vitro führt die Verringerung der GGPP Gehalte zu einer Reduktion prenylierter GTPasen. Und im eigenen Arbeitskreis konnte nachgewiesen werden, dass die Gehalte der beiden Isoprenoide FPP und GGPP in murinem Hirngewebe im Alter signifikant erhöht vorliegen.

Aus diesem Grund liegt der Fokus der vorliegenden Arbeit auf der Untersuchung der Rho-GTPasen und deren Verteilung im Cytosol und den Membranen von Neuronen und murinem Hirngewebe. Zusätzlich sollten auch die Rab-GTPasen untersucht werden, deren Prenylierung durch die GGTase-II katalysiert wird. Als Modellsystem für die Untersuchung des Einflusses der Gehirnalterung auf die Gehalte von Rho- und Rab-GTPasen sollten männliche C57BL/6 Mäuse im Alter von 3 und 23 Monaten untersucht werden. Um Rückschlüsse auf die Aktivität und Funktionalität der Rho- und Rab-GTPasen zu erhalten sollte die zelluläre Lokalisation der Rho-GTPasen Rac1, RhoA und Cdc42 und auch der Rab-GTPasen Rab3A und Rab11B analysiert werden. Für diese Analysen sollten neben dem Gesamthomogenat des Hirngewebes der Versuchstiere auch Präparationen von Membran- und Cytosol-Fractionen herangezogen werden. Im Zuge dieser Arbeit sollte untersucht werden ob die Veränderung der Isoprenoide FPP und GGPP im gealterten murinen Gehirn die Konsequenz einer beeinträchtigten Funktion der GGTase-I und der GGTase-II darstellt.

Die pharmakologische Inhibition der GGTase-I mittels verschiedener spezifischer GGTase-I Inhibitoren sollte sowohl im Zellmodell der immortalisierten humanen neuroblastoma Zelllinie SH-SY5Y als auch im Tiermodell der NMRI Mäuse untersucht werden.

Das natürlich vorkommende 7, 8-Dihydroxyflavon (7, 8-DHF) fungiert als hoch affiner selektiver TrkB-Rezeptor-Agonist und bewirkt die Dimerisierung und Autophosphorylierung des TrkB-Rezeptors und dadurch die Aktivierung nachgeschalteter Signalwege. Somit besitzt 7, 8-DHF die gleichen neurotrophen Eigenschaften wie BDNF. So vermittelt 7, 8-DHF das Überleben von Neuronen, deren Differenzierung, synaptische Plastizität und Neurogenese.

Analog der Untersuchung des Einflusses der Gehirnalterung auf die Gehalte von Rho- und Rab-GTPasen sollte als Tiermodell für die Untersuchung des Einflusses des 7, 8-Dihydroxyflavons auf die Gehirnalterung männliche C57BL/6 Mäuse im Alter von 3 und 23 Monaten verwendet werden. Hierbei sollten die GGPP und Cholesterol-Gehalte untersucht werden. Die zelluläre Lokalisation der Rho-GTPase Rac1 und der Rab-GTPase Rab3A sollten untersucht werden, um Rückschlüsse auf die Aktivität und Funktionalität dieser Rho- und Rab-GTPasen zu erhalten. Hierfür sollten neben dem Gesamthomogenat des Hirngewebes der Versuchstiere auch Präparationen von Membran- Fraktionen analysiert werden.

### **1.9.2 Zielsetzung der Arbeit im Zusammenhang mit der Alzheimer Demenz**

Bei der amyloidogenen APP-Prozessierung spaltet zuerst die  $\beta$ -Sekretase das APP an seiner Ektodomäne, wobei ein N-terminales sekretiertes sAPP $\beta$  Fragment und ein membranständig C-terminales C99 Fragment entstehen. Bei der anschließenden heterogenen Spaltung des C99 durch die  $\gamma$ -Sekretase entstehen extrazelluläre A $\beta$ -Peptide verschiedener Länge und eine im Cytoplasma lokalisierte „APP intracellular domain“ (AICD). Die beiden Sekretasen  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase sind maßgeblich bei der APP-Prozessierung beteiligt und für die Bildung des  $\beta$ -Amyloid-Peptids verantwortlich. Um den Zusammenhang zwischen der Funktion der beiden Sekretasen und der Lipidhomöostase der Isoprenoide FPP und GGPP zu untersuchen, sollten Analysen an untransfizierten und transfizierten menschlichen embryonalen Nierenzellen, den "*Human Embryonic Kidney*"-Zellen (HEK293) durchgeführt werden. Um den Einfluss von

unterschiedlichen endogenen Gehalten des  $A\beta_{1-42}$  zu evaluieren, sollten neben untransfizierten (ut) HEK293 Zellen auch die APP überexprimierenden HEK293-APP695wt (APP695-transfiziert; APP Wildtyp = APPwt) und HEK293-APPsw (APPsw-transfiziert; schwedische Mutation = sw) Zellen untersucht werden.

Um den jeweiligen Einfluss der beiden Sekretasen  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase auf die Prenylierung verschiedener GTPasen zu analysieren, sollten der  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor VI und der  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor DAPT für die in vitro Untersuchungen verwendet werden.

Um die Spezifität der inhibitorischen Wirkung und ihren Einfluss auf die Funktionalität der GTPasen zu evaluieren sollten neben den Rho-GTPasen Rac1, RhoA und Cdc42 zusätzlich die Gehalte der Ras-GTPase H-Ras und der Rab-GTPase Rab3A im Gesamthomogenat, den Membran- und Cytosol-Präparationen der untransfizierten HEK293 Zellen, HEK293-APP695wt und HEK293-APPsw Zellen untersucht werden.

Außerdem sollte der Einfluss von exogenem oligomerisiertem  $A\beta$  auf die Isoprenoide FPP und GGPP, sowie auf die Cholesterol-Gehalte in untransfizierten HEK293 Zellen untersucht werden.

### **1.9.3 Zielsetzung der Arbeit im Zusammenhang mit der Glioblastoma multiforme**

Veränderungen der Ras/Rho-vermittelten Signaltransduktion, wie dem Ras-Raf-MEK-ERK Signalweg haben sich als zentraler Schritt in der molekularen Pathogenese der Glioblastoma multiforme (GBM) herausgestellt. Die Farnesyltransferase (FTase) katalysiert die Farnesylierung der Ras-GTPase H-Ras, und die GGTase-I katalysiert die Geranylgeranylierung der Rho-GTPase Rac1. Diese post-translationale Prenylierung ermöglicht den kleinen GTPasen die Insertion in zelluläre Membranen. Diese Lokalisation ist wiederum für die transformierende Aktivität der kleinen GTPasen notwendig, mit breitgefächerten Folgen für die Weiterleitung von Signalen, die das Wachstum, die Differenzierung und Apoptose der Zellen bewirken.

Ein Präkursor der beiden Isoprenoide FPP und GGPP im Cholesterinbiosytheseweg ist das Mevalonat, dessen Bildung von der

Enzymaktivität der 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA)-Reduktase abhängt. Die HMG-CoA-Reduktase ist das Geschwindigkeits-bestimmende Enzym des Cholesterinbiosytheseweges. Statine sind Inhibitoren der HMG-CoA-Reduktase, sie inhibieren die Proliferation und Migration von Gliomazellen und induzieren deren Apoptose in vitro und in vivo.

Eine weitere vielversprechende Substanz ist der Perillylalkohol (POH), ein in der Natur vorkommendes Monoterpen, das in der Lage ist die FTase und die GGTAse-I zu inhibieren. In einer frühen klinischen Studie mit rezidivierenden GBM Patienten verlängerte die Behandlung mit POH die Lebenserwartung der Patienten um mehrere Monate. Jedoch ist der zugrunde liegende Mechanismus des POH ungeklärt.

In der vorliegenden Arbeit sollten die Einflüsse von Lovastatin und POH auf die Gehalte der Isoprenoide FPP und GGPP und die Prenylierung der kleinen GTPasen H-Ras und Rac1 getestet werden um ihre Beteiligung über die Inhibition des Ras-Raf-MEK-ERK Signalweges auf onkogene Funktionen zu untersuchen. Für die Analysen sollten die beiden GBM Zelllinien U87 und U343 herangezogen werden. Um die funktionellen Einflüsse der beiden Substanzen in den Glioblastoma multiforme Zelllinien zu analysieren, sollte ihr Einfluss auf die Proliferation, die Migration und Invasion der Zellen untersucht werden.



## 2 Materialien

### 2.1 Allgemeine Chemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller/Bezugsquelle</b>
Acetonitril (ACN)	Carl Roth, Karlsruhe
Acrylamid	Bio - Rad, München
Agarose	Merck, Darmstadt
All-trans-Retinsäure	Sigma Aldrich, München
Ammoniumacetat	VWR International, Darmstadt
Ammoniumhydroxid (NH <sub>4</sub> OH) 28-30%	Alfa Aesar, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Bio - Rad, München
Amyloid-Beta Peptid	Bachem, Weil am Rhein
Aprotinin	Sigma Aldrich, München
Benzyl Alkohol	Fluka, Buchs
β-Skretase-Inhibitor IV	Millipore, Schwalbach
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma Aldrich, München
Brain derived neurotrophic factor (BDNF)	Peprtech, Hamburg
Brij 35	Sigma Aldrich, München
Cholesterol	Sigma Aldrich, München
Complete ® Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
D*-GCVLL (Dansyl gly-cys-val-leu-leu)	Calbiochem, Darmstadt
D*-GCVLS (Dansyl gly-cys-val-leu-ser)	Calbiochem, Darmstadt

## Materialien

DAPT	Sigma Aldrich, München
Dharmacon RNA Primer	Thermo Scientific, Bonn
Dharmacon Solaris qPCR Master Mix	Thermo Scientific, Bonn
7,8-Dihydroxyflavon	TCI Deutschland GmbH, Eschborn
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl- tetrazoliumbromid (MTT)	Sigma Aldrich, München
1,4 - Dithioerythritol (DTT)	Sigma Aldrich, München
Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe
Dulbecco`s Modified Eagle Medium GlutaMAX (DMEM + GlutaMAX)	Invitrogen, Karlsruhe
ECL Chemilumineszenz Reagenz	GE Healthcare, München
ECL Prime Chemilumineszenz Reagenz	GE Healthcare, München
Ethylendiamintetraessigsäure Natriumsalz (EDTA)	Sigma Aldrich, München
EGTA	Sigma Aldrich, München
Ethanol (EtOH)	Merck, Darmstadt
Farnesylpyrophosphat (FPP)	Sigma Aldrich, München
Farnesyltransferase (FTase)	Jena Bioscience, Jena
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Gentamycin Sulfat (G418)	Invitrogen, Karlsruhe
Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP)	Sigma Aldrich, München
Geranylgeranyltransferase I (GGTase I)	Jena Bioscience, Jena
GGTi 2133	Sigma Aldrich, München
GGTi 286	Sigma Aldrich, München

L – Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Glutaraldehyd (Grade II) 25 %	Sigma Aldrich, München
Glycin	Sigma Aldrich, München
Halt TM Phosphatase Inhibitor Cocktail	Thermo Scientific, Bonn
HEPES	Merck, Darmstadt
n-Hexan	Merck, Darmstadt
Hybond P PVDF Membran	GE Healthcare, München
Hygromycin B	Invitrogen, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma Aldrich, München
Kaliumhydroxid (KOH)	Sigma Aldrich, München
Kristallviolett	Sigma Aldrich, München
Leupeptin (Hemisulfatsalz)	Sigma Aldrich, München
Lovastatin	MSD Sharp & Dohme GmbH, Haar
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt
2 – Mercaptoethanol	Bio – Rad, München
Methanol (MeOH)	Merck, Darmstadt
Milli-Q Wasser	Millipore, Schwalbach
Minimum Essential Medium Eagle (MEM)	Sigma Aldrich, München
Mitomycin C	Merck, Darmstadt
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	VWR International, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumdeoxycholat	Sigma Aldrich, München
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Bio – Rad, München

## Materialien

Natriumfluorid (NaF)	Sigma Aldrich, München
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma Aldrich, München
Natriumpyrophosphat	Sigma Aldrich, München
Non-essential amino acids MEM (100x)	Invitrogen, Karlsruhe
Novex 4 % Tris-Glycin Gele	Invitrogen, Karlsruhe
Novex Tris – Glycin SDS Sample Buffer (2x)	Invitrogen, Karlsruhe
Novex Tris – Glycin Transfer Buffer (25x)	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE Antioxidant	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE 4-12 % Bis-Tris Gradientengele	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE MES SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE Reducing Agent (10x)	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE Sample Buffer (4x)	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE Transfer Buffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe
Octyl- $\beta$ -D-glucopyranosid	Sigma Aldrich, München
OptiMEM	Invitrogen, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich, München
Penicillin/Streptomycin (PenStrep)	Invitrogen, Karlsruhe
Pepstatin A	Sigma Aldrich, München
(S) – (-) - Perillylalkohol (POH)	Sigma Aldrich, München
Peroxidase (HRP) Konjugat	Bio-Rad, München
Phosphate Buffered Saline (10x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching
PhosStop ® Phosphatase Inhibitor	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Piperazin-N,N`-bis(2-Ethansulfonsäure) (PIPES)	Sigma Aldrich, München
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma Aldrich, München
Poly – L – Lysin	Sigma Aldrich, München
Precision Protein <sup>TM</sup> , Strep Tactin-Horse Radish	Bio-Rad, München
Precision Plus, WesternCTM, Protein Standard	Bio-Rad, München
Pyruvat (Natriumsalz) MEM	Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Simvastatin	Merck, Darmstadt
Simvastatin (Zocor ® 40 mg)	MSD Sharp & Dohme GmbH, Haar
Super Signal ® West Femto	Thermo Scientific, Bonn
TEMED	Bio – Rad, München
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Sigma Aldrich, München
Triton ® X - 100	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Sigma Aldrich, München
Trypsin - EDTA (1x)	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Sigma Aldrich, München
Urea	GERBU Biotechnik GmbH, Gaiberg
Vitaminlösung MEM (100x)	Invitrogen, Karlsruhe
Zinkchlorid (ZnCl <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt

## 2.2 Geräte und Materialien

### 2.2.1 Materialien

<b>Name</b>	<b>Hersteller/Bezugsquelle</b>
Combitips®	Eppendorf, Hamburg
Deckgläschen Superior	Merck Eurolab GmbH, Frankfurt
Falcon-Röhrchen (15 & 50ml)	Greiner, Frickenhausen
HPLC Ascentis ® Express C18 RP (100 x 2.1 mm, 2.7 µm)	Sigma Aldrich, München
HPLC Security guard column C18 (4 x 2.0 mm)	Phenomenex, Aschaffenburg
Kryoröhrchen Modell Cyro-S (2ml)	Greiner, Frickenhausen
sterile Zellkulturflaschen mit Filtertop (75 cm <sup>2</sup> & 175cm <sup>2</sup> )	Greiner, Frickenhausen
sterile Kunststoff-Pipettenspitzen (5 ml, 10 ml & 25 ml)	Greiner, Frickenhausen
Mikrotiterplatten (96 well)	Greiner, Frickenhausen
sterile Mikrotiterplatten (6 well, 24 well & 96 well)	Greiner, Frickenhausen
Oasis® HLB 3cc (60 mg) Flangeless Cartidges	Waters, Eschborn
Parafilm	Roth, Karlsruhe
Pasteurpipetten	Merck, Darmstadt
Pipettenspitzen (10 µl, 200µl & 1000 µl)	Greiner, Frickenhausen
PVDF-Membran	GE Healthcare, München & Roth, Karlsruhe
Nitrozellulose-Membran	GE Healthcare, München
Reaktionsgefäße (200µl, 1.5 & 2 ml)	Greiner, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen	Beckmann, München

### 2.2.2 Geräte

<b>Name</b>	<b>Hersteller/Bezugsquelle</b>
Autoflow, Hera Safe, Heraeus HS18	Heraeus-Instruments, Hanau
Bio-Rad Chemidoc XRS System	Bio-Rad Laboratories, München
Bio-Rad iQ5 Multicolor Real Time PCR	Bio-Rad Laboratories, München
Branson Sonifier, Cell Disrupter B15	Branson Ultrasonics, Danbury
Brutschrank CO <sub>2</sub> Inkubator	Heraeus-Instruments, Hanau
Elektrophoresekammer	
Novo Mini Cell X-Cell Sure Lock <sup>TM</sup>	Invitrogen, Karlsruhe
ELISA-Reader Digiscan	ASYS Hitech, Eugendorf (AUT)
Eppendorf Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf-Rack	Roth, Karlsruhe
Fluoreszenzspektrometer SLM	
Aminco Bowman Series 2	SLM Instruments, Urbana
Feinwaage AB204 & AT 261	Mettler, Gießen
Fluoreszenzmikroskop Nikon Eclipse E800	Nikon, München
Gefrierschränke (-20°C)	Liebherr-Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen
Gefrierschrank (-80°C)	Heraeus, -Instruments, Hanau
Gekühlte Kondensationsfalle	Savant/Thermo Scientific, Bonn
HPLC	Jasco, Gross-Umstadt
HPLC DG-1580-53 Degaser	Jasco, Gross-Umstadt
HPLC LG-980-02 Binary solvent mixer	Jasco, Gross-Umstadt
HPLC PU-980 Pump	Jasco, Gross-Umstadt
HPLC AS-851 Autosampler	Jasco, Gross-Umstadt

## Materialien

HPLC Column thermostat	W.O. electronics, Langenzersdorf
HPLC Gilson 122 Fluorometer	Gilson, Middleton (USA)
Inkubator, GFL 4010	GFL, Burgwedel
Kühlzentrifuge Modell GS-6R	Beckmann, München
Kühlzentrifuge Modell J2-HS	Beckmann, München
Kühlzentrifuge Mikrofuge R	Beckmann, München
Laminar Flow Bank, Hera Safe	Thermo Scientific, Bonn
Magnetrührer Modell Variomag	Mono, München
Manifold (24 Positionen)	Macherey - Nagel, Düren
Multipipette	Eppendorf, Hamburg
Nanodrop 100 Spektrometer	Thermo Scientific, Bonn
Neubauer-Zählkammer	LO-Laboroptik Ltd., Lancing (UK)
Odyssey Infrared Imaging System	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
pH-Meter Modell CG825	Schott, Hofheim
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipetus®-Classic	Hirschmann, Frankfurt
Potter mit Teflonpistell	Braun, Melsungen
Pottergläschen (5ml)	Braun, Melsungen
Quarzküvette Modell 101-QS 10mm	Helma, Mühlheim
Savant SC210A SpeedVac Concentrator	Savant/Thermo Scientific, Bonn
Sonifier, Cell Disrupter B15	Branson, Danbury (USA)
Ultraschallbad Sonorex Super RK510H	Schalltec, Mörfelden-Waldorf
Ultrazentrifuge Modell I8-70M	Beckmann, München



Vakuumpumpe, Diaphragmapumpe	Vaccubrand, Wertheim
Victor™ X3 2030 Multilabel Reader	Perkin Elmer, Rodgau- Jügesheim
Vortexer Modell Vortex-Genie 2	Roth, Karlsruhe
Wasserbad (mit Schüttelfunktion), GFL 1083	GFL, Burgwedel
Zentrifugen-Rotoren (JA-20.1, 70.1 Ti, SW-41, F241.5)	Beckmann, Münche

### 2.2.3 Software

<b>Name</b>	<b>Hersteller/Bezugsquelle</b>
Borwin 1.50	Jasco, Gross-Umstadt
GraphPad Prism 5.0 (USA)	GraphPad Software, La Jolla
MS Office Professional Plus 2007	Microsoft, Redmond (USA)
MS Office 2011	Microsoft, Redmond (USA)
Image Lab 4.0	Bio-Rad Laboratories, München
ImageJ 1.45s	NIH, Bethesda (USA)
Reference Manager Mendeley 1.10.1	Mendeley Inc., New York (USA)
BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)	NCBI, Bethesda (USA)
Primer3 4.0.0	MIT, Massachusetts (USA)

## 2.3 Western Blot Antikörper

### 2.3.1 Primärantikörper

Primärantikörper	kDa	Hersteller/Bezugsquelle	Katalognummer
anti-BDNF	17	Santa Cruz, Heidelberg	sc-546
anti-Cdc42	20	Santa Cruz, Heidelberg	sc-8401
anti-ERK (anti-p44/42 MAP kinase)	42	Cell Signaling, Frankfurt	9102S
anti-pERK (anti-phospho-p44/42 MAP kinase)	42	Cell Signaling, Frankfurt	9101S
anti-Flotillin-1	48	BD Biosciences, Heidelberg	610820
anti-FTase $\beta$ subunit	45	Millipore, Schwalbach	09-121-MI
anti-GAP43	48	Millipore, Schwalbach	AB5220
anti-GAPDH	38	Millipore, Schwalbach	MAB374
anti-GGTase I $\beta$ subunit	42	Santa Cruz, Heidelberg	sc-18994
anti-H-Ras	20	Santa Cruz, Heidelberg	sc-520
anti-Rab3A	31	Santa Cruz, Heidelberg	sc-308
anti-Rab11B	25	Santa Cruz, Heidelberg	sc-133937
anti-RabGDI $\alpha$	50	Thermo Scientific/Pierce, Schwerte	27498
anti-Rac1	20	Santa Cruz, Heidelberg	sc-95
anti-RhoA	20	Santa Cruz, Heidelberg	sc-418
anti-RhoGDI $\alpha$	26	Invitrogen, Karlsruhe	51-1000Z
anti-Synaptophysin	38	Millipore, Schwalbach	MAB5258
anti-Tiam1	200	Santa Cruz, Heidelberg	sc-872
anti-TrkB	95; 145	Santa Cruz, Heidelberg	sc-12

### 2.3.2 Sekundärantikörper

<b>Spezies</b>	<b>Hersteller/Bezugsquelle</b>
Anti-Maus (1:2000)	Calbiochem, Darmstadt
Anti-Kaninchen (1:2000)	Calbiochem, Darmstadt
Anti-Ziege (1:2000)	Santa Cruz, Heidelberg
IR Dye 800 CW anti- Maus (1:15000)	LI-COR Biosciences, Bad Homburg

### 2.4 Kits

<b>Name</b>	<b>Hersteller/Bezugsquelle</b>	<b>Katalognummer</b>
A $\beta$ (1-40) ELISA	Invitrogen, Karlsruhe	KHB3482
A $\beta$ (1-42) ELISA	Invitrogen, Karlsruhe	KHB3442
CHOL Cholesterol CHOD-PAP	Roche/Hitachi GmbH, Mannheim	12016630122
BD Bio Coat <sup>TM</sup> Matrigel Invasion Chamber	BD Bioscience, Heidelberg	B4-LB-354480 354480
Pierce <sup>®</sup> BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Bonn	23225
MTT-Kit (Cell Proliferation Kit I)	Roche/Hitachi GmbH, Mannheim	11465015001
ChargeSwitch <sup>®</sup> Kit	Invitrogen, Karlsruhe	CS14010
Verso cDNA synthesis <sup>®</sup> Kit	Thermo Scientific, Bonn	AB1453A

## 2.5 Zelllinien

<b>Zelllinie</b>	<b>Hersteller/Bezugsquelle</b>
SH-SY5Y-ut	Pharmakologisches Institut für Naturwissenschaftler, Goethe Universität Frankfurt (Deutschland)
SH-SY5Y-Mock	Pharmakologisches Institut für Naturwissenschaftler, Goethe Universität Frankfurt (Deutschland)
SH-SY5Y-APP695wt	Pharmakologisches Institut für Naturwissenschaftler, Goethe Universität Frankfurt (Deutschland)
HEK293-ut	Pharmakologisches Institut für Naturwissenschaftler, Goethe Universität Frankfurt (Deutschland)
HEK293-APP695wt	Pharmakologisches Institut für Naturwissenschaftler, Goethe Universität Frankfurt (Deutschland)
HEK293-APPsw	Pharmakologisches Institut für Naturwissenschaftler, Goethe Universität Frankfurt (Deutschland)
HA (humane Astrozyten) (#ATCC- CRL-8621)	Institut für Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Frankfurt am Main (Deutschland)
U87 (#ATCC-HTB-14)	Institut für Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Frankfurt am Main (Deutschland)
U343 (#ATCC-LN-229)	Institut für Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Frankfurt am Main (Deutschland)

## 2.6 Biologische Proben

Probe/Spezies	Bezugsquelle
Humane Hirn-Proben	Human Brain and Spinal Fluid Center, Los Angeles (USA)
C57BL/6- Mäuse	Centre d'Élevage R.Janvier, St Berthevin Cedex (Frankreich)
NMRI Mäuse	Charles River, Sulzbach (Deutschland)

## 2.7 Lösungen und Puffer

### 2.7.1 PBS-Puffer

Das PBS-Pufferkonzentrat (10x) wurde mit Millipore-Wasser verdünnt und vor jeder Verwendung wurde der pH-Wert von 7.4 bei 4°C eingestellt. Der Puffer wurde bei 4°C gelagert.

Für die Verwendung in der Zellkultur wurden sterile Bedingungen berücksichtigt.

### 2.7.2 Tris-HCl-Puffer

Puffer I	Tris-HCl 5 mM, pH = 7.4
Puffer II	Tris-HCl 50 mM, pH = 7.4
Puffer III	Tris-HCl 100 mM, pH = 8.5

### 2.7.3 Lösungen für die Cholesterin-Bestimmung

Emulgatorlösung	15% Brij35 in Puffer I
-----------------	------------------------

### 2.7.4 Lösungen für Isolierung der Isoprenoide aus Zellen

Extraktions-Mix I (v/v/v)	1-Butanol / NH <sub>4</sub> OH / EtOH	4 : 5 : 11
------------------------------	---------------------------------------	------------

### 2.7.5 Lösungen für die Isolierung der Isoprenoide aus Gewebe

Extraktions-Mix II (für Extrelut®)    1-Butanol / H<sub>2</sub>O / NH<sub>4</sub>OH    10 : 2 : 1  
(v/v/v)

Extraktions-Mix III (für SPE)    n-Hexan / 2-Propanol / NH<sub>4</sub>OH    12 : 7 : 1  
(v/v/v)

### 2.7.6 Lösungen und Puffer für die Probenderivatisierung der Isoprenoid-Bestimmung mittels HPLC

Die Zusammensetzung der Lösungen und Puffer basieren auf den Angaben von Hooff et al. (Hooff, Volmer, Wood, Müller, & Eckert, 2008)) und wurden entsprechend der nachfolgenden Beschreibungen adaptiert.

#### 2.7.6.1 Lösung zur Verdünnung der Isoprenoid-Standardkonzentrationen

Verdünnungslösung I    MeOH / 10 mM NH<sub>4</sub>OH    7 : 3 (v/v)

#### 2.7.6.2 Enzymverdünnungen für die Probenderivatisierung

FTase    100 ng/μl Puffer II

GGTaseI    100 ng/μl Puffer II

#### 2.7.6.3 Dansyl-Peptid-Verdünnungen für die Probenderivatisierung

FPP Substrat D\*-GCVLS    45 μM in Puffer II

GGPP Substrat D\*-GCVLL    45 μM in Puffer II

**2.7.6.4 Reaktionspuffer**

1,4 - Dithioerythritol	0.2 mM
MgCl <sub>2</sub>	20 mM
ZnCl <sub>2</sub>	40 µM
Octyl-β-D-glucoopyranosid	1.37 mM
Tris-HCl (pH = 7.4)	50 mM

**2.7.6.5 Stop-Lösung**

Stop-Lösung (v/v)	ACN / 10% HCl	10 : 1
----------------------	---------------	--------

Die Stop-Lösung wurde verwendet um die enzymatische Probenderivatisierung der Isoprenoide zu terminieren.

**2.7.7 Eluenten für die Isoprenoid-Bestimmung mittels HPLC**

Die Zusammensetzung der Eluenten basieren auf den Angaben von Hooff et al. (Hooff et al., 2008)) und wurden entsprechend der nachfolgenden Beschreibungen adaptiert.

**2.7.7.1 Eluent A**

60 % (v)	20 mM Ammoniumacetat in Millipore-H <sub>2</sub> O
40 % (v)	ACN

**2.7.7.2 Eluent B**

10 % (v)	20 mM Ammoniumacetat in Millipore-H <sub>2</sub> O
90 % (v)	ACN

## 2.7.8 Puffer und Lösungen für die Western Blot-Analyse

### 2.7.8.1 TBST-Lösung (1x)

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	2.42 g
NaCl	8 g
Tween 20	0.5 ml
HCl (konz.)	13 ml
H <sub>2</sub> O-Millipore	ad 1 Liter

Der pH-Wert wurde bei Raumtemperatur auf pH = 7.4 eingestellt.

### 2.7.8.2 Laufpuffer

NuPage MES SDS running buffer (20x)	50 ml
H <sub>2</sub> O-Millipore	950 ml
NuPage Antioxidant	1 ml

### 2.7.8.3 NuPAGE Transferpuffer (1 Gel)

NuPage transfer buffer	50 ml
Methanol	100 ml
H <sub>2</sub> O-Millipore	850 ml
NuPage Antioxidant	1 ml

### 2.7.8.4 NuPAGE Transferpuffer (2Gele)

NuPage transfer buffer	50 ml
Methanol	200 ml
H <sub>2</sub> O-Millipore	750 ml
NuPage Antioxidant	1 ml



**2.7.8.5 Novex Transferpuffer**

Novex Tris – Glycine transfer buffer	40 ml
Methanol	200 ml
H <sub>2</sub> O-Millipore	760 ml
NuPage Antioxidant	1 ml

**2.7.8.6 Blocker-Lösung**

fettfreies Milchpulver	750 mg
H <sub>2</sub> O-Millipore	10 ml

**2.7.8.7 Natriumazid-Lösung**

NaN <sub>3</sub> in H <sub>2</sub> O-Millipore	2 % (m/v)
--	-----------

Die Natriumazid-Lösung wurde verwendet um die Verdünnungen der Primärantikörper zu konservieren und das Wachstum von Mikroorganismen zu verhindern.

**2.7.8.8 Lösung für die Primärantikörperverdünnung**

<b>Lösung I</b>	BSA	100 mg
	NaN <sub>3</sub>	0.02 % (m/v)
	TBST (1x)	10 ml

**2.7.8.9 Lösung für die Sekundärantikörperverdünnung**

<b>Lösung II</b>	Sekundärantikörper	1,5 µl
	Strep-Tactin-HRP-Konjugat	1,5 µl
	TBST (1x)	3 ml

Alle Sekundärantikörper wurden 1:2000 verdünnt, soweit es nicht anders vermerkt ist (siehe Tabelle Sekundärantikörper).

### **2.7.9 Puffer für die Trennung von Membran- und cytosolischer Fraktion aus Zellen**

Die Zusammensetzung der Puffer basieren auf den Angaben von Ostrowski et al. (Ostrowski et al., 2007) und wurden entsprechend der nachfolgenden Beschreibungen adaptiert.

#### **2.7.9.1 Relaxationspuffer**

KCl	100 mM
NaCl	3 mM
MgCl <sub>2</sub>	3.5 mM
EDTA	1 mM
PIPES	10 mM

Der pH-Wert wurde bei 4°C auf pH = 7.3 eingestellt.

### 2.7.10 Puffer für die Trennung von Membran- und cytosolischer Fraktion aus Hirngewebe

Die Zusammensetzung der Puffer basieren auf den Angaben von Ma et al. (Ma et al., 2008) und wurden entsprechend der nachfolgenden Beschreibungen adaptiert.

#### 2.7.10.1 Puffer IV

Triton X-100	0.5% (m/v)
Natriumdeoxycholat	0.5% (m/v)
SDS	0.5% (m/v)
EDTA	1 mM
NaF	5 mM
Urea	6 M
Leupeptin	10 µg/ml
Pepstatin	10 µg/ml
PMSF	100 µM
Aprotinin in PBS (1x)	3 µg/ml
Natriumpyrophosphat	2.5 mM
aktiviertes Natrium- orthovanadat in PBS (1x)	1 mM

Der pH-Wert wurde bei 4°C auf pH = 7.3 eingestellt.

### 2.7.11 Puffer für die Präparation der cytosolischen Fraktion zur Bestimmung der GGTase-Aktivität aus Zellen oder Hirngewebe

Die Zusammensetzung der Puffer basieren auf den Angaben von Goossens et al. (Goossens, Deweer, Pommery, Hénichart, & Goossens, 2005) und wurden entsprechend der nachfolgenden Beschreibungen adaptiert.

**2.7.11.1 Puffer V (Puffer für die Präparation der cytosolischen Fraktion)**

HEPES	0.1 M
MgCl <sub>2</sub>	25 mM
1,4 – Dithioerythritol	10 mM

Der pH-Wert wurde bei 4°C auf pH = 7.4 eingestellt.

**2.7.11.2 Puffer zur Bestimmung der GGTase-Aktivität aus Zellen oder Hirngewebe mittels Fluoreszenzspektrometer**

<b>GGTase-Aktivitäts-Assay-Puffer</b>	1,4 – Dithioerythritol	5 mM
	MgCl <sub>2</sub>	12 mM
	ZnCl <sub>2</sub>	12 µM
	Octyl-β-D-glucopyranosid	0.2 % (m/v)
	Tris-HCl (pH = 7.4)	50mM
	D*-GCVLL	4 µM
	GGPP	6 µM

**2.7.12 Lösungen für den MTT-Assay**

MTT-Reagenz	MTT in PBS (1x)	5 mg/ml
Solubilisierungslösung	SDS in 0.01 M HCl	10 % (m/v)

**2.7.13 Lösungen für den Kristallviolett-Assay**

Glutaraldehyd-Lösung	Glutaraldehyd in PBS (1x)	0.1 % (m/v)
Kristallviolett-Lösung	Kristallviolett in PBS (1x)	0.1 % (m/v)
Detergenz-Lösung	Triton X-100 in PBS (1x)	0.2 % (v/v)

## 2.8 Zellkultur-Medien

### 2.8.1 SH-SY5Y-Zellen

#### 2.8.1.1 SH-SY5Y-ut (untransfiziert)

MEM	500ml
FCS	50 ml
L-Glutamin	5 ml
P/S	3 ml

#### 2.8.1.2 SH-SY5Y-APP695wt (APP695-transfiziert)

DMEM + GlutaMAX	500 ml
FCS	5 ml
nicht-essentielle AS	5ml
MEM Vitamine	5 ml
Pyruvat	5 ml
P/S	3 ml
Hygromycin B	3 ml

## 2.8.2 HEK293-Zellen

### 2.8.2.1 HEK293-ut (untransfiziert)

DMEM + GlutaMAX	500 ml
FCS	5 ml
P/S	3 ml

### 2.8.2.2 HEK293-APP695wt (APP695-transfiziert)

DMEM + GlutaMAX	500 ml
FCS	5 ml
P/S	3 ml
G418 (400 µg/ml)	1ml

### 2.8.2.3 HEK293-APPsw (APPsw-transfiziert)

DMEM + GlutaMAX	500 ml
FCS	5 ml
P/S	3 ml
G418 (400 µg/ml)	1ml

## 2.8.3 Humane Astrozyten

MEM	500 ml
FCS	50 ml
P/S	3 ml

## 2.8.4 Glioblastoma-Zelllinien

### 2.8.4.1 U87

DMEM	500 ml
FCS	50 ml
L-Glutamin	5 ml
P/S	3 ml

### 2.8.4.2 U343

DMEM + GlutaMAX	500 ml
FCS	50 ml
L-Glutamin	5 ml
P/S	3 ml

## 2.8.5 Medium zum Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren der Zellen wurde für alle Zelllinien ein Einfrier-Medium mit folgender Zusammensetzung verwendet.

### Einfrier-Medium:

20ml DMEM + GlutaMAX	40 % (v)
FCS	50 % (v)
DMSO (steril filtriert)	10 % (v)

### **2.8.6 Medium für die Zell-Behandlung mit Inhibitoren oder Modulatoren**

Zur Behandlung der Zellen wurde für alle Zelllinien ein Medium mit folgender Zusammensetzung verwendet.

OptiMEM	500 ml
P/S	3 ml



## **3 Methoden**

### **3.1 Zellkultur - Methoden**

#### **3.1.1 Passagieren**

##### **3.1.1.1 SH-SY5Y-Zellen**

Das Passagieren erfolgte bei den SH-SY5Y-ut (untransfiziert), SH-SY5Y-Mock (Leervektor-transfiziert) und SH-SY5Y-APP695wt (APP695-transfiziert) – Zellen auf die gleiche Art und Weise. Bei einer konfluenten Zelldichte von ca. 90 % wurde das vorhandene Medium abgesaugt und die Zellen mit sterilem PBS gewaschen. Danach wurde das PBS (1x) abgesaugt und 37°C warmes Trypsin auf die Zellen gegeben. Sobald die Zellen begannen sich abzulösen wurde sofort das entsprechende Kulturmedium zugegeben, um die Wirkung von Trypsin zu stoppen. Die Zellen wurden nun 10 Mal vereinzelt und in der gewünschten Verdünnung in eine neue Kulturflasche ausgesät.

##### **3.1.1.2 HEK293-Zellen**

Das Passagieren erfolgte bei den HEK293-ut (untransfiziert), HEK293-APP695wt (APP695-transfiziert) und HEK293-APPsw (APPsw-transfiziert) – Zellen auf die gleiche Art und Weise. Bei einer konfluenten Zelldichte von ca. 90 % wurde das vorhandene Medium abgesaugt und neues Medium auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden nun 10 Mal vereinzelt und in der gewünschten Verdünnung in eine neue Kulturflasche ausgesät.

##### **3.1.1.3 Humane Astrozyten**

Bei einer konfluenten Zelldichte von ca. 90 % wurde das vorhandene Medium abgesaugt und die Zellen mit sterilem PBS (1x) gewaschen. Danach wurde das PBS (1x) abgesaugt und 37°C warmes Trypsin auf die Zellen gegeben. Sobald die Zellen begannen sich abzulösen wurde sofort das entsprechende Kulturmedium zugegeben, um die Wirkung von Trypsin zu stoppen. Die Zellen wurden nun 10 Mal vereinzelt und in der gewünschten Verdünnung in eine neue Kulturflasche ausgesät.

#### **3.1.1.4 Glioblastoma-Zelllinien**

##### **U87**

Bei einer konfluenten Zelldichte von ca. 90 % wurde das vorhandene Medium abgesaugt und 37°C warmes Trypsin auf die Zellen gegeben. Sobald die Zellen begannen sich abzulösen wurde sofort das entsprechende Kulturmedium zugegeben, um die Wirkung von Trypsin zu stoppen. Die Zellen wurden nun 10 Mal vereinzelt und in der gewünschten Verdünnung in eine neue Kulturflasche ausgesät.

##### **U343**

Bei einer konfluenten Zelldichte von ca. 90 % wurde das vorhandene Medium abgesaugt und die Zellen mit sterilem PBS (1x) gewaschen. Danach wurde das PBS (1x) abgesaugt und 37°C warmes Trypsin auf die Zellen gegeben. Sobald die Zellen begannen sich abzulösen wurde sofort das entsprechende Kulturmedium zugegeben, um die Wirkung von Trypsin zu stoppen. Die Zellen wurden nun 10 Mal vereinzelt und in der gewünschten Verdünnung in eine neue Kulturflasche ausgesät.

#### **3.1.2 Einfrieren**

Das Einfrieren der Zellen erfolgte für alle verwendeten Zelllinien gleichermaßen. Die Zellen wurden bei Passage 2 und einer Konfluenz von ca. 90 % von der Kulturflasche abgelöst und in einem sterilen Falcon (15 ml) bei 1000 rpm für 3 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde abgesaugt. Das entstandene Zellpellet wurde in 1 ml 4°C temperiertem Einfrier-Medium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden in einer Einfrierbox für 24 Stunden bei -80°C gelagert und danach in den Stickstofftank, der mit flüssigem Stickstoff gefüllt ist, überführt.

### 3.1.3 Auftauen

Das Auftauen der Zellen wurde für alle verwendeten Zelllinien auf die gleiche Art und Weise durchgeführt. Die Kryoröhrchen wurden aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und auf Raumtemperatur erwärmt. Sofort nach dem Auftauen der Zellsuspension wurde diese in ein Falcon, das 37°C temperiertes Medium enthielt, überführt und bei 1000 rpm für 3 Minuten bei Raumpemperatur zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine Zellkulturflasche mit frischem Medium ausgesät.

### 3.1.4 Zellernte

Das Ernten der Zellen wurde für alle verwendeten Zellen in gleicher Weise bewerkstelligt. Zuerst wurde das alte Kulturmedium abgesaugt und die Zellen in 4°C temperiertem unsterilem PBS (1x) von der Kulturflasche abgelöst und vereinzelt. Die Zellsuspension wurde in ein Falcon (15 ml) überführt und bei 1000 rpm für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml unsterilem PBS (1x) mit Complete® Protease Inhibitor Cocktail (1 Tablette in 50 ml 1x PBS) aufgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Bei 1000 rpm wurde nun erneut für 10 Minuten und 4°C zentrifugiert. Das resultierte Zellpellet wurde nun bei -80°C eingefroren oder direkt für die entsprechende Analyse verwendet.

### 3.1.5 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde das alte Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit frischem Medium von der Kulturflasche abgelöst und vereinzelt. Die Zellsuspension wurde in ein Falcon (15 ml) überführt und bei 1000 rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml frischem Medium resuspendiert. 10 µl dieser Zellsuspension wurden mit 90 µl 0.4 % (m/v) Trypanblau-Lösung vermischt. Von dieser Lösung wurden 10 µl in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop ausgezählt.

### 3.1.6 Präparation des Kulturmediums für die A $\beta$ -Bestimmung

Zur Bestimmung von sekretiertem A $\beta_{1-40}$  bzw. A $\beta_{1-42}$  wurde das Serum-freie Kulturmedium nach 24h Sekretion entnommen, mit 1  $\mu$ M PMSF versetzt und bei -20 °C gelagert.

### 3.1.7 Inhibitor-Inkubationsprotokolle

Für die Behandlung der verschiedenen Zelllinien mit Inhibitoren und Modulatoren des Mevalonat-Weges muss eine Beeinflussung der zellulären Cholesterin-Homöostase durch exogenes Cholesterin ausgeschlossen werden. In den standardmäßig verwendeten Kulturmedien für die jeweiligen Zelllinien ist FCS enthalten, welches von den Zellen aufgenommen werden kann um ein Cholesterin-Defizit zu kompensieren. Aus diesem Grund wurde für die Inkubation mit verschiedenen Inhibitoren und Modulatoren des Mevalonat-Weges das Serum-freie OptiMEM, lediglich mit dem Zusatz von Penicillin/Streptomycin, verwendet.

## Inhibitoren und Modulatoren

### Inhibitoren

Name	Enzymtarget	Lösungsmittel	Konzentration
GGTI 2133	Geranylgeranyltransferase I	DMSO	10 $\mu$ M; 25 $\mu$ M
GGTI 286	Geranylgeranyltransferase I	DMSO	2 $\mu$ M
Lovastatin	HMG-CoA-Reduktase	EtOH	10 $\mu$ M
Perillylalkohol	Farnesyltransferase	EtOH	250 $\mu$ M
DAPT	$\gamma$ -Sekretase	DMSO	1 $\mu$ M
$\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV	$\beta$ -Sekretase	DMSO	1 $\mu$ M

## Modulatoren

### Oligomerisierung des Amyloid-Beta Peptids

Die Oligomerisierung des Amyloid-Beta Peptids wurde angelehnt an die Methode von Cernescu et al. (Cernescu et al., 2012) durchgeführt.

Das Amyloid-Beta Peptid wurden als lyophilisiertes Pulver bis zur Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Das Resuspendieren erfolgte auf Eis und unter Verwendung von gekühlten Materialien, um eine vorzeitige Aggregation zu verhindern. Um die Oligomerisierung der Peptide zu erreichen wurde 1mg des lyophilisierten Pulvers in 200 $\mu\text{l}$  HFIP gelöst, da HFIP die alpha-helikale Struktur stabilisiert und dadurch die Ausbildung von Oligomeren begünstigt. Die erhaltene Stammlösung von 500 $\mu\text{M}$  wurde in Aliquoten à 10 $\mu\text{l}$  in Eppendorfgefäße aufgeteilt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. 24 Stunden vor Beginn der geplanten Inkubation wurde der Peptidfilm in 2 $\mu\text{l}$  DMSO resuspendiert und mit Millipore- $\text{H}_2\text{O}$  auf eine Konzentration von 100 $\mu\text{M}$  eingestellt. Der Ansatz wurde dann für 24 Stunden bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

### Inkubationszeiten

Die Inhibitoren und Modulatoren wurden bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  je nach Substanz für die folgende Dauer inkubiert:

<b>Name</b>	<b>Dauer und Bedingung der Inkubation</b>
GGTI 2133	48h Behandlung an folgenden Zeitpunkten: 0h, 24h
Lovastatin	24h Einmal-Behandlung
DAPT	24h Einmal-Behandlung
$\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV	24h Einmal-Behandlung
Oligomerisiertes A $\beta$	24h Einmal-Behandlung

## **3.2 Biologische Proben**

### **3.2.1 Humane Hirn-Proben von Patienten mit Alzheimer Demenz**

Die humanen post mortem Hirn-Proben stammen von dem Human Brain and Spinal Fluid Center (HBSFRC, Los Angeles, USA). Die Proben wurden auf Trockeneis verschickt und bis zur Analyse bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Für die Präparation bestimmter Hirnregionen wurde das Hirn auf Eis seziiert und anschließend entsprechend der Verwendung je nach Analyse aufgearbeitet.

Bei den humanen post mortem Hirn-Proben handelt es sich um Schnitte aus dem frontalen Kortex von männlichen Patienten mit Alzheimer Demenz und Kontrollen passenden Alters. Die männlichen Patienten mit Alzheimer Demenz waren bei Eintritt des Todes im Schnitt  $80,4 \pm 4,8$  Jahre alt, die post mortem Intervalle lagen bei  $16,5 \pm 5,0$  Stunden. Die männlichen Kontrollpersonen waren zum Zeitpunkt des Todes im Alter von  $77,8 \pm 3,5$  Jahren und die post mortem Intervalle lagen bei  $15,0 \pm 4,4$  Stunden. Die Patienten wurden nach Eintritt des Todes anhand der Standards des Consortium to Establish a registry for Alzheimers Disease (CERAD) als neurologisch gesund oder als an Alzheimer Demenz erkrankt klassifiziert. Das CERAD hat bestimmte Standards etabliert, nach welchen die klinische Diagnose zur Klassifizierung des Schweregrades der Alzheimer Demenz bei Patienten erfolgt (Rossetti, Munro Cullum, Hynan, & Lacritz, 2010).

### **3.2.2 Murine Hirn-Proben**

#### **Versuchstierhaltung**

Die Mäuse wurden in Käfigen (Makrolon, Typ II, Altromin GmbH, Deutschland) gehalten, in jedem Käfig befand sich außer dem Einstreu eine Plastikröhre und Zellulosetücher. Die Haltung der Tiere erfolgte bei  $23^{\circ}\text{C}$ , einer konstanten relativen Luftfeuchtigkeit (45 bis 65%) und einem hell-dunkel-Zyklus von 12 Stunden. Futter (Standarddiät Ratte/Maus 1320, Altromin GmbH, Deutschland) und Wasser wurden ad libitum gefüttert. Einmal wöchentlich wurden die Käfige gewechselt, gereinigt und desinfiziert. Alle Experimente dieser Arbeit wurden in Übereinstimmung mit dem aktuellen Tierschutzgesetz (TierSchG) und den Leitlinien für die Unterbringung und Pflege von Tieren, die für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendet werden (2007/526/EG) durchgeführt. Für die Experimente wurden nur gesunde Tiere eingesetzt, Tiere mit sichtbaren

Hautläsionen oder Tumoren wurden ausgeschlossen. Die Anzahl der verwendeten Versuchstiere wurde anhand des Studiendesigns und den statistischen Anforderungen festgelegt. Die Studien wurden nach dem Absolvieren der Trainings-Kurse entsprechend FELASA Kategorie B und C durchgeführt.

### **C57BL/6 Mäuse**

Bei den C57BL/6 Mäusen handelt es sich um einen verbreiteten Inzucht-Stamm von Labor-Mäusen. 1921 wurden die C57BL/6 Mäuse von C.C. Little am Bussey Institute for Research in Applied Biology durch die Paarung des Weibchens N°57 mit dem Männchen N°52 des kommerziellen Zuchtbetriebs von Miss Abby Lathrop in den USA entwickelt. Die Kolonie wurde in zwei Sub-Stämme geteilt, bevor 1937 die beiden Stämme C57BL/6 und C57BL/10 resultierten. 1948 wurde der C57BL/6 Stamm am Jackson Laboratory und 1951 an den National Institutes of Health eingeführt.

Die Versuchstiere wurden von dem Centre d'Élevage R.Janvier, St Berthevin Cedex (Frankreich) bezogen.

### **NMRI Mäuse (Naval medical research Institute Mäuse)**

Bei den NMRI Mäusen handelt es sich um einen verbreiteten Auszucht-Stamm von Labor-Mäusen. Die ursprüngliche Kolonie von Swiss Mäusen waren Auszuchtmäuse, die 1926 von Clara Lynch aus Lausanne in der Schweiz stammen. Diese wurden 1937 Poiley übersendet, durch Inzucht bis zu F51 wurden die sogenannten NIH/PI Mäuse erzeugt. Dann wurden die Tiere dem Naval Medical Research Institute übergeben. 1955 wurden sie bei der Bundes-Forschungsanstalt für Viruskrankheiten und 1958 am Zentralinstitut für Versuchstierzucht in Hannover eingeführt.

Die Versuchstiere wurden von Charles River, Sulzbach (Deutschland) bezogen.

### **Altersstudie C57/Bl6 Mäuse**

Die Altersstudie wurde an C57BL/6 Mäusen durchgeführt. Die Versuchstiere wurden von dem Centre d'Élevage R.Janvier, St Berthevin Cedex (Frankreich) bezogen. Für diese Studie wurden männliche Tiere im Alter von 3 und 23 Monaten verwendet.

### **Fütterungsstudie mit 7,8 Dihydroxyflavon**

Kontroll-Lösung	0,2% Agarose in H <sub>2</sub> O
7,8-Dihydroxyflavon-Lösung	75 mg 7,8-Dihydroxyflavon in 3 ml Kontroll-Lösung

Die Fütterungsstudie mit 7,8-Dihydroxyflavon wurde an C57BL/6 Mäusen durchgeführt. Die Versuchstiere wurden von dem Centre d'Élevage R.Janvier, St Berthevin Cedex (Frankreich) bezogen. Futter (Standarddiät Ratte/Maus 1320, Altromin GmbH, Deutschland) und Wasser standen den Versuchstieren während der gesamten Fütterungsstudie ad libitum zur Verfügung.

Die Tiere wurden mit Hilfe einer Schlundsonde einmal täglich zur gleichen Tageszeit mit 100 mg 7,8-Dihydroxyflavon / kg Körpergewicht der Maus für insgesamt 21 Tage gavagiert. Die Tiere wurden vor jeder Fütterung gewogen und mit dem entsprechenden Volumen der 7,8-Dihydroxyflavon-Lösung gavagiert. Bei den Kontroll-Tieren wurde auf gleiche Weise die Kontroll-Lösung gavagiert. Während der gesamten Fütterungsstudie wurden die Gewichte der Versuchstiere einmal täglich ermittelt und protokolliert, um den körperlichen Zustand der Tiere zu überwachen.



Für diese Studie wurden männliche und weibliche Tiere im Alter von 3 und 23 Monaten verwendet. Die Studie wurde in sechs Versuchstiergruppen unterteilt. Diese Versuchstiergruppen wurden nach den Kriterien Alter, Geschlecht und Art der Fütterung unterschieden und wurden wie folgt festgelegt:

<b>Versuchstiergruppe</b>	<b>Alter</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Fütterung</b>
Gruppe 1	3 Monate	männlich	Kontroll-Lösung
Gruppe 2	3 Monate	weiblich	Kontroll-Lösung
Gruppe 3	23 Monate	männlich	Kontroll-Lösung
Gruppe 4	23 Monate	weiblich	Kontroll-Lösung
Gruppe 5	23 Monate	männlich	7,8 Dihydroxyflavon-Lösung
Gruppe 6	23 Monate	weiblich	7,8 Dihydroxyflavon-Lösung

### **3.2.3 Präparation von Gewebe**

Direkt nach der Tötung des Versuchstieres durch Überstrecken und der anschließenden Dekapitation wurde das Hirn auf Eis sezirt und in die beiden Hemisphären (ohne Kleinhirn und Hirnstamm) geteilt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C bis zur Aufarbeitung gelagert.

Alle anderen verwendeten Organe (Leber, Milz, Niere, Testes) wurden ebenfalls direkt nach der Tötung des Versuchstieres durch Überstrecken und der anschließenden Dekapitation entnommen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C bis zur Aufarbeitung gelagert.

### **3.3 Methoden zur biochemische Charakterisierung**

#### **3.3.1 BCA Proteinbestimmung**

Der Gesamt-Proteingehalt wurde unter Verwendung des Pierce® BCA Protein Assay Kits (Thermo Scientific, Bonn) durchgeführt. Die Bestimmung basiert auf der Methode von Smith et al. (Smith et al.1985). Bei der zu Grunde liegenden Reaktion läuft im basischen Milieu die sogenannte Biuret-Reaktion statt, hierbei wird  $\text{Cu}^{2+}$  von den Proteinen (u.a. Cystein, Tryptophan, Tyrosin) stöchiometrisch zu  $\text{Cu}^{+}$  reduziert.  $\text{Cu}^{+}$  lagert sich in das 2,2`-Bichinolin-4,4`-dicarbonsäure-Molekül (bicinchoninic acid=BCA) ein und bildet einen violetten Farbkomplex, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen wird.

Zur Quantifizierung wurde BSA (Bovines Serum Albumin) in den Konzentrationen 0.1, 0.2, 0.33, 0.5 und 1.0 mg/ml als Standardsubstanz verwendet. In eine 96-well-Platte (Sorensen et al., 1986) wurden jeweils 10 µl des verwendeten Puffers (Leerwert), der verschiedenen Standardkonzentrationen (0.1mg/ml bis 1.0 mg/ml BSA) und der zu bestimmenden Proben-Lösungen in der entsprechenden Verdünnung pipettiert. In jedes well wurden 200 µl Arbeitslösung (Kit-Reagenz A : Kit-Reagenz B; 50 : 1 (v/v)) des Pierce® BCA Protein Assay Kits (Thermo Scientific, Bonn) zupipettiert. Da die Biuret-Reaktion Zeit- und Temperatur-abhängig verläuft, wurde die verwendete 96-well-Platte bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 570 nm mittels ELISA-Reader (Modell Digiscan, Firma HighTech) gemessen. Alle Werte wurden als Triplets gemessen.

#### **3.3.2 Gesamtcholesterin-Bestimmung**

Der Gesamtcholesteringehalt wurde nach der CHOD – PAP - Methode (Cholesteroxidase Peroxidase Aminophenazon Phenol-Methode) unter Verwendung der CHOL Cholesterol CHOD-PAP – Lösung (Roche/Hitachi GmbH, Mannheim) durchgeführt. Bei dieser Analyse werden Cholesterin-Ester durch die Cholesterin-Esterase in freies Cholesterin und Fettsäure gespalten. Das freie Cholesterin wird durch die Cholesterin-Oxidase (CHOD) unter Sauerstoff-Verbrauch zu 4-Cholesten-3-on und Wasserstoffperoxid umgesetzt. Katalysiert von der (Meerrettich-) Peroxidase (POD) bildet das entstandene Wasserstoffperoxid mit 4-Aminophenazon (PAP) und Phenol den roten Farbstoff 4-(p-Benzochinonmonoimino)-phenazon. Die Farbintensität ist der Konzentration

an freiem Cholesterin direkt proportional und wird bei 492nm photometrisch gegen einen Leerwert gemessen. Als Standardsubstanz wurde Cholesterin in den Konzentrationen 50, 100, 200, 300 und 400 µg/ml verwendet. Alle Proben und Standards wurden als Triplets gemessen. Es wurden 10µl Leerwert, Standard oder Probe in einer 96-well Platte aufgetragen. Zur Erhöhung der Sensitivität wurde das Testmaterial zunächst für 15 Minuten mit 5µl einer 15%igen Brij35-Lösung (nicht-ionische Emulgatorlösung) inkubiert. Im Anschluss wurden 200µl Kit-Reagenzlösung zupipettiert. Der Ansatz wurde für 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert und anschließend bei 492nm mittels ELISA-Reader (Modell Digiscan, Firma HighTech) vermessen. Die erhaltenen Cholesterinwerte wurden auf den Proteingehalt der Probe normiert.

### **3.3.3 Bestimmung von A $\beta$ (1-42) mittels ELISA**

Die quantitative Bestimmung von A $\beta$  (1-42) wurde mittels human A $\beta$  42 ELISA-Kit (Invitrogen, Karlsruhe) bestimmt. Zur Bestimmung des sekretierten A $\beta$  (1-42) wurden die Proben wie unter „Präparation des Kulturmediums für die A $\beta$ -Bestimmung“ beschrieben gesammelt. Die Durchführung des Assays erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Die Absorption der entsprechenden Standards und Proben wurde hierfür bei 450 nm mittels VICTORTMX3 gemessen. Die erhaltenen A $\beta$  (1-42)-Messwerte wurden auf den Proteingehalt der entsprechenden Zell-Probe normiert.

### **3.3.4 Trennung von Membran – und cytosolischer Fraktion**

#### **Trennung von Membran – und cytosolischer Fraktion aus Zellen**

Die Methode zur Trennung von Membran – und cytosolischer Fraktion aus Zellen basiert auf den Angaben von Ostrowski et al. (Ostrowski et al., 2007) und wurden entsprechend der nachfolgenden Beschreibungen adaptiert.

Nach dem Ernten der Zellen wurden sie lysiert, indem sie in Relaxationspuffer für 15 Minuten auf Eis inkubiert wurden. Nach der Inkubation wurden die Proben durch 10 Pulse am Sonifier homogenisiert und für 5 Minuten bei 500 g bei 4°C zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde anschließend bei 110000 g bei 4°C für 60 Minuten in einer Beckmann – Ultrazentrifuge erneut zentrifugiert. Der

entstandene Überstand (cytosolische Fraktion) wurde abgenommen und das Membran-Pellet in Relaxationpuffer resuspendiert (Membranfraktion).

### **Trennung von Membran – und cytosolischer Fraktion aus Hirngewebe**

Die Methode zur Trennung von Membran – und cytosolischer Fraktion aus Hirngewebe basiert auf den Angaben von von Ma et al. (Ma et al., 2008) und wurden entsprechend der nachfolgenden Beschreibungen adaptiert.

Das Hirngewebe wurde mittels Potter (Braun, Melsungen) bei 800 rpm auf Eis in Puffer II unter Zugabe von Halt® und Phosstop® Phosphatase – Inhibitor homogenisiert. Das Homogenat wurde unter Verwendung einer Beckmann – Ultrazentrifuge bei 100000 g und 4°C für 20 Minuten zentrifugiert. Der entstandene Überstand (cytosolische Fraktion) wurde abgenommen und das Pellet in Puffer IV resuspendiert. Nach 10 Pulsen am Sonifier wurde erneut in der Beckmann – Ultrazentrifuge bei 100000 g und 4°C für 20 Minuten zentrifugiert um den Überstand (Membranfraktion) zu erhalten.

### 3.3.5 Western Blot – Analyse

#### Probenvorbereitung

Nach Bestimmung des Proteingehalts mittels BCA Proteinbestimmung wurden die zu analysierenden Proben auf den gewünschten Proteingehalt eingestellt und mit Puffer II wurden die Volumina der Proben auf ein einheitliches Volumen angeglichen.

#### Elektrophorese und Transfer für Proteine bis zu 100 kDa

Proteine mit einer Molekülmasse bis zu 100 kDa wurden unter Verwendung von NuPAGE 4-12 % Bis-Tris Gradientengelen und NuPAGE Sample Buffer (4x) aufgetrennt. Nach dem Einstellen der Proteinmenge wurden die Proben mit den entsprechenden Volumenteilen NuPAGE Sample Buffer (4x) und NuPAGE Reducing Agent (10x) versetzt und für 10 Minuten bei 95°C in einem Thermomixer inkubiert. Um die entstandenen Kondensationströpfchen vom Deckel des Probengefäßes wieder der Lösung zuzuführen, wurden die Proben bei 3000 rpm und 4°C kurz zentrifugiert. Je nach Antikörper wurden nun 10 bis 80 µg Protein je Probe in die Geltaschen des NuPAGE 4-12 % Bis-Tris Gradientengels pipettiert. Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurde das XCell IITMBlot Modul, Precision Plus WesternCTM Protein Standard und der Laufpuffer verwendet. Für die Sammelphase wurde an den Gelen eine elektrische Spannung von 60 Volt für 8 Minuten angelegt. Anschließend erfolgte die Trennphase bei einer Spannung von 190 Volt für 40 Minuten.

Für den Transfer der Proteine wurde ebenfalls das XCell IITMBlot Modul und der NuPAGE Transferpuffer verwendet. Je nach Detektions-Methode wurden PVDF - oder Nitrozellulose – Membranen ausgewählt. Zum Aktivieren der PVDF – Membran wurde diese für 10 Minuten in Methanol eingelegt, die Nitrozellulose – Membran wurde für 10 Minuten in Millipore-Wasser aktiviert. Anschließend wurden die Membranen bei Raumtemperatur in Transferpuffer bis zur Verwendung eingeweicht. Der Transfer der Proteine auf die entsprechende Membran erfolgte unter Verwendung des Transferpuffers bei einer Spannung von 30 Volt für 90 Minuten.

### **Elektrophorese und Transfer für Proteine bis zwischen 100 und 200 kDa**

Für die Elektrophorese von Proteine mit einer Molekülmasse zwischen 100 und 200 kDa wurden unter Verwendung von Novex 4% Tris - Glycin Gele und Novex Sample Buffer (2x) verwendet. Nach dem Einstellen der Proteinmenge wurden die Proben mit den entsprechenden Volumenteilen Novex Sample Buffer (2x) und NuPAGE Reducing Agent (10x) versetzt und für 2 Minuten bei 85°C in einem Thermomixer inkubiert. Die entstandenen Kondensationströpfchen wurden bei 3000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Danach wurden 20 µg Protein je Probe in die Geltaschen des Novex 4% Tris - Glycin Gels pipettiert. Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurde das XCell IITMBlot Modul, Precision Plus WesternCTM Protein Standard und der Laufpuffer verwendet. Die Sammelphase erfolgte bei einer Spannung von 60 Volt für 8 Minuten, die darauffolgende Trennphase bei einer Spannung von 125 Volt für 60 Minuten.

Für den Transfer der Proteine wurde das XCell IITMBlot Modul, der Novex Transferpuffer und PVDF – Membranen verwendet. Zum Aktivieren der PVDF – Membran wurde diese für 10 Minuten bei Raumtemperatur in Methanol und danach in Transferpuffer bis zur Verwendung eingelegt. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte bei einer Spannung von 25 Volt für 120 Minuten.

### **Blocken**

Um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers auf der Membran zu vermeiden wurde diese im Anschluss an den Transfer für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler mit 10 ml Blocker-Lösung inkubiert. Danach wurde die Membran in Millipore-Wasser gewaschen und bis zur Inkubation mit dem Primär-Antikörper in TBST-Lösung (1x) bei 4°C gelagert.

### **Inkubation mit dem Primärantikörper**

Folgende Primärantikörper wurden in den angegebenen Konzentrationen und Zeiten für die Inkubation der Membranen verwendet:

<b>Primärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Inkubationszeit</b>	<b>Temperatur</b>
anti-BDNF	1 : 500	über Nacht	4°C
anti-Cdc42	1 : 1000	über Nacht	4°C
anti-ERK (anti-p44/42 MAP kinase)	1 : 2000	über Nacht	4°C
anti-pERK (anti-phospho-p44/42 MAP kinase)	1 : 2000	über Nacht	4°C
anti-Flotillin-1	1 : 500	30 Minuten	RT
anti-FTase $\beta$ subunit	1 : 4000	über Nacht	4°C
anti-GAP43	1 : 5000	über Nacht	4°C
anti-GAPDH	1 : 300	15 Minuten	RT
anti-GGTase I $\beta$ subunit	1 : 5000	über Nacht	4°C
anti-H-Ras	1 : 1000	über Nacht	4°C
anti-Rab3A	1 : 1000	über Nacht	4°C
anti-Rab11B	1 : 1000	über Nacht	4°C
anti-RabGDI $\alpha$	1 : 1000	30 Minuten	RT
anti-Rac1	1 : 1000	über Nacht	4°C
anti-RhoA	1 : 1000	über Nacht	4°C
anti-RhoGDI $\alpha$	1 : 250	30 Minuten	RT
anti-Synaptophysin	1 : 5000	über Nacht	4°C
anti-Tiam1	1 : 500	60 Minuten	RT
anti-TrkB	1 : 500	über Nacht	4°C

### **Inkubation mit dem Sekundärantikörper**

Nach dem Blocken erfolgte das Waschen der Membran und die Inkubation mit dem Sekundärantikörper unter Verwendung des Snap i.d protein detection system. Die Membranen wurden nach der Inkubation mit dem Primärantikörper mit jeweils 50 ml TBST-Lösung (1x) gewaschen und anschließend für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 3 ml des entsprechenden Sekundärantikörpers (Verdünnungen siehe Tabelle) inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran erneut mit 50 ml TBST-Lösung (1x) gewaschen und bis zur Detektion in dieser Lösung aufbewahrt. Die Sekundärantikörper wurden in den folgenden Verdünnungen verwendet:

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>
Anti-Maus IgG-HRP	1 : 2000
Anti-Kaninchen IgG-HRP	1 : 2000
Anti-Ziege IgG-HRP	1 : 2000
IR Dye 800 CW anti- Maus IgG-HRP	1:15000

### **Western Blot Detektion**

Für die Detektion der Proteine wurden ECL Chemilumineszenz Reagenz, ECL Prime Chemilumineszenz Reagenz oder Super Signal ® West Femto gemäß der Herstellerangaben verwendet. 1 ml des jeweiligen Detektions-Reagenzes wurden mit 0.5 ml TBST-Lösung (1x) verdünnt und die Membran mit dieser Lösung zwischen 30 Sekunden und 5 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Banden wurden mittels Bio-Rad Chemidoc XRS System detektiert und die Intensität mit der Image Lab 4.0 Software ausgewertet.



### 3.3.6 RNA Isolierung, Reverse Transkription, Primer Design und qRT-PCR

Die RNA wurde mittels der Trizol-Methode aus dem Hirngewebe des präfrontalen Kortex isoliert und mit Hilfe des ChargeSwitch® Kits (Invitrogen, Karlsruhe) aufgereinigt. Die Durchführung der Aufreinigung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Die aufgearbeitete RNA wurde in Abhängigkeit von der Größe des Pellets in 50 bis 100 µl ChargeSwitch® Elution Buffer aufgenommen. Die Konzentration der RNA wurde durch die Messung der Absorptionsrate bei 260/280 nm und 260/230 nm mit einem Nanodrop 100 Spektrometer (Thermo Scientific, Bonn) gemessen. 500 ng der RNA wurden jeweils unter Verwendung des Verso cDNA synthesis® Kits (Thermo Scientific, Bonn) mittels Bio-Rad iQ5 Multicolor Real Time PCR transkribiert, die Durchführung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers.

Interne Primer wurden für jedes Traget entworfen. Die NCBI's Entrez Gene database wurde als Quelle der Nukleotidsequenzen jedes Gens herangezogen. Unter Verwendung des Programms BLAST wurden die Intron/Exon Grenzen identifiziert und die Primer wurden so entworfen, dass die Amplifizierung um diese Regionen die Eliminierung der Amplifikation der genomischen DNA der gewünschten cDNA bevorzugt. Die Primer-Sequenz wurde mit dem MIT Programm „Primer3“ generiert. Die folgenden Primer wurden verwendet:

GGTase Iβ:	links	5'- ATC CAG GAG GTT TCA GTT C -3'
	rechts	5'- CTC TGC AAA ATG AGC CTT GGT -3'
GAPDH:	links	5'- GAA ATC CCA TCA CCA TCT TCC -3'
	rechts	5'- ATG GTT CAC ACC CAT GAC G -3'

Die RNA Primer und der Master Mix wurden von Dharmacon bezogen. Die relativen Mengen der mRNA wurden durch real-time Analyse unter Verwendung von Solaris qPCR Master Mix durchgeführt. Die Temperaturzyklen wurden gemäß den Angaben des Herstellers programmiert. Jeder Reaktionsansatz bestand aus einem Volumen von 25 µl und enthielt 250 ng des cDNA Templates und den erforderlichen Gehalt der Forward und Reverse Primer. GAPDH wurde

als Referenz-Gen zur Normierung der experimentellen Daten genutzt und dafür wurde die Genexpressionsanalyse unter Durchführung der  $\Delta\Delta\text{CT}$  Berechnung durchgeführt.

### **3.3.7 Isolierung der Isoprenoide aus Zellen**

Die Extraktion der Isoprenoide Farnesylpyrophosphat (FPP) und Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) wurde angelehnt an die Methode von Tong et al. (Tong, Holstein, & Hohl, 2005) und Hooff et al. (Hooff, Peters, et al., 2010) durchgeführt.

Nach der Zellernte wurden die Zellen in 4°C temperiertem Puffer II aufgenommen und durch 10 Pulse am Sonifier homogenisiert. Im Anschluss wurde der Proteingehalt der Proben mittels BCA Proteinbestimmung ermittelt. Für die Extraktion der Isoprenoide wurden die Proben auf einen Proteingehalt von 600 µg Protein eingestellt und mit 70°C temperiertem Extraktions - Mix I versetzt und für eine Minute auf dem Vortexer geschüttelt und danach für 20 Minuten im Thermomixer bei 70°C und einer Schüttelfrequenz von 10 Sekunden bei 350 rpm pro Minute inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die Proben auf 4°C abgekühlt und bei 15000 rpm und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der entstandene Überstand (Extrakt 1) wurde abgenommen und das Pellet erneut in mit 70°C temperiertem Extraktions - Mix I versetzt. Nach 10 Pulsen am Sonifier wurde erneut im Thermomixer bei 70°C und einer Schüttelfrequenz von 10 Sekunden bei 350 rpm pro Minute inkubiert und der entstandene Überstand (Extrakt 2) mit dem Extrakt 1 vereinigt. Das Lösemittel-Gemisch der vereinigten Proben-Extrakte wurde nun unter reduziertem Druck bei einer Temperatur von ca. 70°C in der SpeedVac Zentrifuge 2 Stunden bis zur völligen Trockene abgezogen.

### 3.3.8 Isolierung der Isoprenoide aus Gewebe

Die Extraktion der Isoprenoide Farnesylpyrophosphat (FPP) und Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) wurde angelehnt an die Methode von Hooff et al. (Hooff et al., 2008) durchgeführt.

Für die Isolierung der Isoprenoide FPP und GGPP wurde das zu untersuchende Gewebe in 1.2 ml Puffer III gegeben und jeweils 10µl Halt Phosphatase-Inhibitor und 10µl PhosStop Phosphatase-Inhibitor hinzugefügt und am Potter bei 800 rpm mit 10 Hüben homogenisiert. Alle verwendeten Lösungen und Puffer wurden vor und während dem Homogenisieren auf Eis gekühlt. 1 ml des entstandenen Homogenats wurde auf eine mit Extrelut gepackte Säule gegeben und bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde dreimal mit jeweils 2 ml Extraktions-Mix II eluiert und bei 4°C und 15.000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde abdekantiert und unter reduziertem Druck bei einer Temperatur von ca. 70°C in der SpeedVac Zentrifuge 2 Stunden bis zur völligen Trockene abgezogen. Die Probengefäße wurden im Anschluss auf Raumtemperatur gebracht und mit jeweils 186,5 ml Methanol versetzt und gevortext. Im Anschluss wurde je je 3,5 ml Millipore-H<sub>2</sub>O zugegeben und nach erneutem Vortexen für 10 Minuten in das Ultraschall-Bad gestellt. Nach 10 Pulsen am Sonifier wurde die Probe dann auf eine mit n-Hexan, Isopropanol, Methanol und Millipore-H<sub>2</sub>O konditionierte SPE Säule gegeben. Nachdem die Probe über die Säule gelaufen war wurde diese mit 2% igem Methanol gewaschen und die gebundenen Isoprenoide mit jeweils 2 ml Extraktions-Mix III eluiert. Der entstandene Extrakt wurde unter reduziertem Druck bei einer Temperatur von ca. 70°C in der SpeedVac Zentrifuge 2 Stunden bis zur völligen Trockene abgezogen.

### **3.3.9 Proben-Derivatisierung für die Isoprenoidbestimmung mittels HPLC**

Für die Proben-Derivatisierung wurde nun der getrocknete Probenrückstand mit jeweils 20 µl Puffer II und 11 µl Reaktionspuffer versetzt, für 1 Minuten gevortext und danach für 3 Minuten in das Ultraschallbad gestellt. Danach wurden jeweils 4.5 µl des D\*-GCVLS und D\*-GCVLL (fluoreszenzaktive Dansyl-Peptide), je 500 ng FTase und GGTase I zugegeben und dieses Gemisch 90 Minuten im Thermomixer bei 37°C und einer Schüttelfrequenz von 10 Sekunden bei 350 rpm pro Minute inkubiert. Durch Zugabe von jeweils 50µl Stop-Lösung wurde die Proben-Derivatisierung nach Ablauf der Inkubation beendet und die Proben für 10 Minuten und 4°C bei 15000 rpm zentrifugiert. Der entstandene Überstand jeder Probe wurde abgenommen und in ein Gals-Vial überführt und in den 4°C temperierten Autosampler der HPLC zum vermessen gestellt.

### **3.3.10 Derivatisierung der Standards für die Isoprenoidbestimmung mittels HPLC**

Die Standardsubstanzen FPP und GGPP wurden in Verdünnungslösung I auf die Konzentrationen 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 und 800 ng/ml verdünnt und bei -20°C bis zur Verwendung gelagert. Zum Erstellen der externen Standardgeraden wurden jeweils 10µl FPP- und GGPP-Standardverdünnung der gleichen Konzentration in ein Probengefäß pipettiert. Daraufhin folgte die Zugabe von jeweils 11 µl Reaktionspuffer , je 4.5 µl des D\*-GCVLS und D\*-GCVLL (fluoreszenzaktive Dansyl-Peptide), je 500 ng FTase und GGTase I und dieses Gemisch wurde für 90 Minuten im Thermomixer bei 37°C und einer Schüttelfrequenz von 10 Sekunden bei 350 rpm pro Minute inkubiert. Durch Zugabe von jeweils 50µl Stop-Lösung wurde die Derivatisierung nach Ablauf der Inkubation beendet und die Standards für 5 Minuten und 4°C bei 15000 rpm zentrifugiert. Der entstandene Überstand jedes Standards wurde abgenommen und in ein Gals-Vial überführt und in den 4°C temperierten Autosampler der HPLC zum vermessen gestellt.

### **3.3.11 Chromatographische Konditionen des HPLC-FD-Systems für die Isoprenoidbestimmung**

Die chromatographische Trennung der Isoprenoide FPP und GGPP wurde an einem Jasco HPLC-System mittels Gradienten-Elution an einer analytischen Ascentis® Express C-18 reversed phase Säule von Supelco (100×2.1 mm, 2.7 µm), geschützt mit einer Phenomenex Security guard column (C-18, 4×2.0 mm) Vorsäule durchgeführt. Für die Gradientenelution wurden zwei Laufmittel als mobile Phase verwendet: Eluent A und Eluent B. Der Gradient wurde für 1.5 Minuten mit 35% Eluent B begonnen und danach innerhalb von 6.5 Minuten linear auf 100% Eluent B gesteigert. Die Zusammensetzung wurde dann für 6 Minuten bei 100% Eluent B gehalten und anschließend innerhalb von 2 Minuten auf 35% Eluent B gesenkt. Die komplette Laufzeit betrug 20 Minuten bei einer konstanten Fluss-Rate von 0.5 ml/min und 35°C Säulenofen-Temperatur. Die Detektion der Analyten erfolgte durch einen Gilson Fluoreszenz-Detektor mit einer Excitation von 340 nm und einer Emission von 525 nm. Die Retentionszeiten der fluoreszenz-gelabelten Analyten betrug ca. 4.1 Minute für FPP und 11.0 Minuten für GGPP.

### **3.3.12 Bestimmung der relativen GGTase-Aktivität aus Zellen oder Hirngewebe**

Die Bestimmung der GGTase-Aktivität wurde mittels Fluoreszenzspektrometer angelehnt an die Methode von Goossens et al. (Goossens et al., 2005) durchgeführt.

Zusätzlich wurde die Inhibition der Geranylgeranyltransferase mittels Fluoreszenzspektroskopie überprüft. Das Dansyl-Peptid D<sup>\*</sup>-GCVLL verfügt über ein spezifisches CaaX-Motiv (GCVLL). Die aktive GGTase-I katalysiert spezifisch die Prenylierung mit GGPP an den Cystein-Rest in der CaaX-Sequenz des Dansyl-Moleküls, was zu dessen Fluoreszenzaktivität führt. Anders als bei der GGTase-I sind kurze Peptide wie die Dansyl-Peptide keine Substrate der GGTase-II (Rab-GGTase) (Seabra, Goldstein, et al., 1992; Taylor et al., 2003). Durch die Bestimmung der Fluoreszenz kann somit ein direkter Rückschluss auf die Enzymaktivität der GGTase-I getroffen werden. Die Inhibition des Enzyms kann analog über die abgeschwächte Fluoreszenzaktivität in Folge der Verwendung eines spezifischen GGTase-Inhibitors nachgewiesen werden.

### **Preparation der cytosolischen Fraktion aus Zellen oder Hirngewebe zur Bestimmung der GGase-Aktivität**

Zur Preparation der cytosolischen Fraktion wurde die Hemisphäre (siehe Preparation von Gewebe) oder das Zellpellet (siehe Zellernte) in eiskaltem Puffer V aufgenommen und am Potter bei 800 rpm mit 10 Hüben homogenisiert. Das Homogenat wurde nun für 30 Minuten und 4°C bei 10000 g zentrifugiert. Der hierbei entstandene Überstand wurde dann für 60 Minuten und 4°C bei 100000 g zentrifugiert und der hierbei entstandene Überstand aliquotiert und bis zur Verwendung im GGase-Aktivitäts-Assay bei -80°C gelagert.

Im Anschluss erfolgte die Proteinbestimmung der Proben (siehe BCA Proteinbestimmung).

### **GGase-Aktivitäts-Assay**

Die GGase-Aktivität wurde durch die Fluoreszenzmessung bei einer Excitation von 340 nm und einer Emission von 505 nm unter Verwendung des Bowman II Aminco Spectrofluorometers (SLM Aminco, Urbana, USA) bestimmt. Für Bestimmung der GGase-Aktivität wurde der GGase-Aktivitäts-Assay-Puffer in der Küvette bei 37°C vortemperiert und der Leerwert vermessen. Direkt vor der Enzymaktivitäts-Messung wurden 100µg Protein der cytosolischen Fraktion einer Probe in die Küvette zupipettiert und vermessen. Alle Werte wurden als Triplets gemessen.

### **3.3.13 MTT-Assay**

Zur Quantifizierung des Zellviabilität und Zytotoxizität nach der Behandlung mit bestimmten Inhibitoren wurden MTT- und Kristallviolett-Assay durchgeführt.

Der MTT-Assay wurde unter Verwendung des MTT-Kit „Cell Proliferation Kit I“ (Roche/Hitachi GmbH, Mannheim) nach den Herstellerangaben durchgeführt. Bei diesem Assay verursachen verschiedene Enzyme, die am Elektronentransfer in der mitochondrialen Atmungskette beteiligt sind, aber auch eine Reihe von NADH- bzw. NADPH-abhängigen Redoxenzymen die reduktive Spaltung des Tetrazoliumsalzes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) zu einem farbigen Formazansalz, welches in Lösung bei einer Absorption von 570nm gemessen werden kann. Aus diesem Grund läuft die beschriebene

Reaktion nur in metabolisch aktiven Zellen ab und wird zur Bestimmung von Zellviabilität und Zytotoxizität verwendet.

Da die Dichte der ausgesäten Zellen einen großen Einfluss auf die Reproduzierbarkeit des Assays hat, wird für jede Zelllinie eine definierte Zellzahl ausgesät. Für die Durchführung des MTT-Assays wurden je nach Zelllinie folgende Zellzahlen in eine 96-well-Platte in dem entsprechenden Vollmedium ausgesät:

<b>Zelllinie</b>	<b>Zellzahl pro well</b>
U87	10000
U343	20000

Nach 12 Stunden wurde das Medium vollständig abgesaugt und durch das Serum-freie Inkubationsmedium (siehe Inhibitor-Inkubationsprotokolle) mit der entsprechenden Inhibitor-Konzentration (siehe Inhibitoren und Modulatoren) für die entsprechende Inkubationszeit (siehe Inkubationszeiten) inkubiert. Der Blank enthielt nur das Serum-freie Medium und die Kontrollen enthielten das Serum-freie Medium und die entsprechende Menge an reinem Lösungsmittel. Zwei Stunden vor Ende der Inkubationszeit wurden in jedes well 20 µl MTT-Reagenz zupipettiert und die Inkubation fortgesetzt. Nach Ende der Inkubation wurden in jedes well 100 µl Solubilisationslösung hinzugegeben. Die bei der Reaktion gebildeten Formazankristalle wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gelöst und am darauffolgenden Tag bei einer Absorption von 570 nm am ELISA-Reader vermessen. Alle Werte wurden als Triplets gemessen.

### 3.3.14 Kristallviolett-Assay

Zur Quantifizierung der Zellviabilität und Zytotoxizität nach der Behandlung mit bestimmten Inhibitoren wurden MTT- und Kristallviolett-Assay durchgeführt.

Die Bestimmung der Zellviabilität bzw. der Zytotoxizität mittels Kristallviolett-Assay wurde angelehnt an die Methode von Gillies et al. (Gillies, Didier, & Denton, 1986) durchgeführt.

Der bei diesem Assay verwendete Farbstoff Kristallviolett bindet an DNA-assoziierte Nukleoproteine in den Zellen und sorgt so für das Anfärben der Zellen. Auch bei der Durchführung des Kristallviolett-Assays spielt die Zellzahl für die Reproduzierbarkeit des Assays eine große Rolle. Aus diesem Grund wurde für jede Zelllinie eine definierte Zellzahl für den Assay in Vollmedium in eine 24-well-Platte ausgesät:

<b>Zelllinie</b>	<b>Zellzahl pro well</b>
U87	50000
U343	100000

Nach 12 Stunden wurde das Medium vollständig abgesaugt und durch das Serumfreie Inkubationsmedium (siehe Inhibitor-Inkubationsprotokolle) mit der entsprechenden Inhibitor-Konzentration (siehe Inhibitoren und Modulatoren) für die entsprechende Inkubationszeit (siehe Inkubationszeiten) inkubiert. Die Kontrollen enthielten das Serumfreie Medium und die entsprechende Menge an reinem Lösungsmittel. Nach Ende der Inkubation wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde in jedes well 250 µl Glutaraldehyd-Lösung zugegeben und diese für 30 Minuten bei RT auf dem Schüttler inkubiert um die Zellen zu fixieren. Nach dem Fixieren der Zellen wurde die Glutaraldehyd-Lösung abgesaugt und erneut mit PBS-Puffer gewaschen. Daraufhin wurden jedes well mit 250 µl Kristallviolett-Lösung für 30 Minuten bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde das nicht-gebundene Kristallviolett durch Waschen mit Millipore-H<sub>2</sub>O für 10 Minuten entfernt. Um nun das gebundene Kristallviolett zu quantifizieren, wurden jeweils 200 µl Detergenz-Lösung pro well zupipettiert, welches dafür sorgt, dass die Zellen lysieren und das Kristallviolett in Lösung geht. Nach einer Inkubation von 1 Stunde bei RT wurden



jeweils 100 µl in eine 96-well-Platte überführt und die Extinktion der Proben photometrisch bei einer Absorption von 570 nm am ELISA-Reader vermessen. Die Extinktion der vermessenen Lösung korreliert direkt mit der Zellmasse und wurde deshalb zum Nachweis von Zellviabilität und Zytotoxizität verwendet. Alle Werte wurden als Triplets gemessen.

### 3.3.15 Migrations-Assay

Die in vitro Bestimmung des Migrations-Verhaltens wurde angelehnt an die Methode nach Liang et al. (Liang CC, Park AY, 2007) durchgeführt.

Bei dem sogenannten „Scratch-Assay“, der auch „wound healing Assay“ genannt wird, wird in einer konfluente Zellschicht eine zellfreie Spur (der „Scratch“) erzeugt um dann anhand der Beobachtung dieser zellfreien Stelle das Migrations-Verhalten der Zellen in einem bestimmten Zeitintervall zu beobachten.

Zur reproduzierbaren Durchführung des Assays wurde für jede Zelllinie eine definierte Zellzahl in Vollmedium in eine 6-well-Platte ausgesät:

<b>Zelllinie</b>	<b>Zellzahl pro well</b>
U87	300000
U343	600000

Nach 24 Stunden wurde das Medium vollständig abgesaugt und durch das Serum-freie Inkubationsmedium (siehe Inhibitor-Inkubationsprotokolle) mit der entsprechenden Inhibitor-Konzentration (siehe Inhibitoren und Modulatoren) für die entsprechende Inkubationszeit (siehe Inkubationszeiten) inkubiert. Die Kontrollen enthielten das Serum-freie Medium und die entsprechende Menge an reinem Lösungsmittel. Nach 6 Stunden wurden 10 µg/ml Mitomycin C zugegeben. Mitomycin C ist ein zytostatisch wirksames Antibiotikum, welches nach enzymatischer Aktivierung mit DNA-Strängen interkaliert und hierdurch ihre Dissoziation während der Replikation und Transkription gehemmt ist. Diese DNA-Schäden lösen über Aktivierung von Signalkaskaden einen Zellzyklus-Arrest aus

und verhindern so die weitere Zellteilung. Nach weiteren 2 Stunden, also 8 Stunden nach Behandlungsbeginn, wurde der Scratch mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze gezogen. Direkt nach dem Scratch wurde mit einer Nikon Eclipse TE2000-S Kamera ein Bild von dem Scratch aufgenommen. Nach weiteren 16 Stunden wurde erneut ein Bild von dem Scratch aufgenommen. Ein Gittersystem wurde verwendet um bei den gleichen Koordinaten direkt nach dem Scratch und nach Ablauf der Inkubationszeit ein weiteres Bild von der Selben Stelle zu generieren. Für die quantitative Analyse wurde das erste und zweite Bild korreliert und die in den Scratch migrierten Zellen gezählt. Alle Proben wurden als Quadruplets gemessen.

### **3.3.16 Invasions-Assay**

Die in vitro Bestimmung des Invasions-Verhaltens wurde angelehnt an die Methode von Albini et al. (Albini et al., 1987) unter Verwendung von BD Bio Coat™ Matrigel Invasion Chamber (BD Bioscience, Heidelberg) nach den Herstellerangaben durchgeführt.

Das BD Bio Coat™ Matrigel Invasion Chamber beinhaltet eine PET-Membran mit 8 µm großen Poren, die in einer Matrigel Matrix. Die Matrigel Matrix stellt eine rekonstituierte in vitro Basismembran dar, die die Poren der PET-Membran verschließt und so nicht invasive Zellen von der Migration durch die Poren der PET-Membran abhält. Im Gegensatz dazu sind invasive Zellen in der Lage sich von der Matrigel-Schicht zu lösen und durch diese Matrigel-Schicht und die Poren der PET-Membran zu wandern. Dieses invasive Verhalten kann mittels Lichtmikroskop beobachtet werden.

Für die Durchführung des Assays wurden 24-well-Platten verwendet. In jedes well wurden 500 µl Medium für die zu untersuchende Zelllinie (siehe Zellkultur-Medien) vorgelegt und das Boyden Chamber eingesetzt. In jedes Boyden Chamber wurden nun 25000 Zellen in 500 µl Serum-freiem Inkubationsmedium (siehe Inhibitor-Inkubationsprotokolle) mit der entsprechenden Inhibitor-Konzentration (siehe Inhibitoren und Modulatoren) für die entsprechende Inkubationszeit (siehe Inkubationszeiten) inkubiert. Die Kontrollen enthielten das Serum-freie Medium und die entsprechende Menge an reinem Lösungsmittel. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen oberhalb der Matrigel-Schicht vorsichtig entfernt. Die invasiven Zellen auf der Unterseite der PET-Membran wurden durch eine Inkubation mit Methanol für 2 Minuten fixiert und anschließend mit Kristallviolett-

Lösung angefärbt. Das überschüssige Kristallviolett wurde durch zweifaches Waschen mit Millipore-H<sub>2</sub>O entfernt. Anschließend wurde die Membran getrocknet und mit einer Nikon Eclipse TE2000-S Kamera ein Bild von der Membran aufgenommen um die Zellen zu quantifizieren. Mit Hilfe eines Gittersystems wurden jeweils 10 Quadranten eines Boyden Chambers ausgezählt und gemittelt.

### 3.4 Statistik

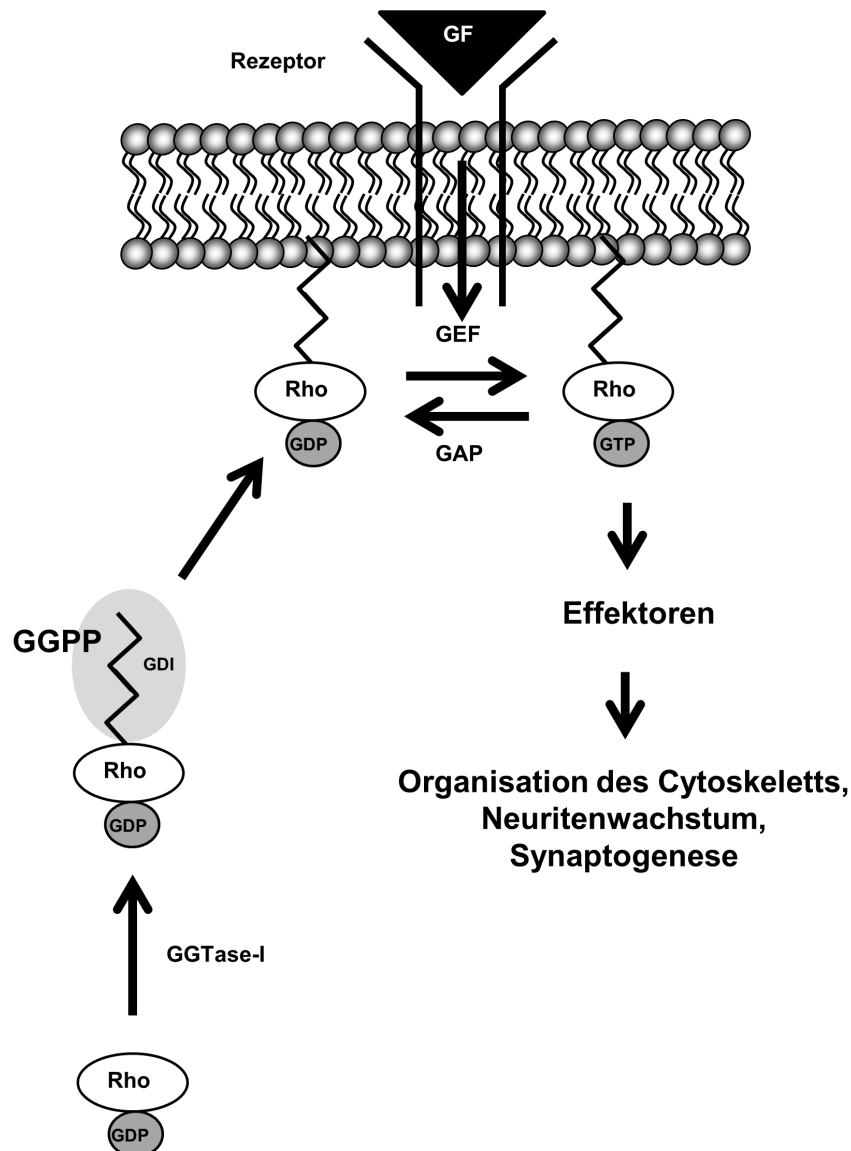
Die Messdaten sind als arithmetische Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen ( $\pm$  SEM) angegeben. n bezeichnet die Anzahl der Einzelwerte aus unabhängigen Experimenten. Ein P-Wert kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant festgelegt. Hierbei galt \* =  $P < 0,05$ , \*\* =  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$  und ns = nicht signifikant. Der statistische Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde mit dem Student's paired t-test ermittelt. Um signifikante Unterschiede der relativen GGTase-Aktivität bei einer Wellenlänge zwischen 400 nm und 600 nm zu überprüfen, wurden die Daten mittels One-Way Analysis of Variance (ANOVA) analysiert. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Programms GraphPad Prism (Version 5.00, GraphPad Software, La Jolla, USA). Für die Ergebnisse der Western Blot Analysen ist jeweils ein repräsentatives Bild abgebildet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Gehirnalterung

Bei der zerebralen Alterung finden zahlreiche molekulare Veränderungen statt, welche mit Veränderung von Synapsen, Axonen und Dendriten einhergehen. Die Beeinträchtigung des alternden Gehirns erfolgt noch vor dem Verlust der Neurone durch die Schädigung und Dysfunktion der Synapsen (Jellinger & Attems, 2013). Die Rho-Familie der kleinen GTPasen spielt eine wichtige Rolle bei der neuronalen Homöostase und Signaltransduktion (Feltri, Suter, & Relvas, 2008).

Die Rho-GTPasen regulieren das axonale Wachstum und die Synaptogenese (Spillane & Gallo, 2014; Um et al., 2014). Bei den meisten Rho-GTPasen erfolgt eine Prenylierung mit dem Isoprenoid GGPP. Die Geranylgeranylierung wird katalysiert durch die Geranylgeranyltransferase-I (GGTase-I). Diese post-translationalen Modifikation bedingt die Insertion der GTPasen in zelluläre Membranen (Wright & Philips, 2006), die für ihre Funktion benötigt wird (Samuel & Hynds, 2010). Die Gehalte der beiden Isoprenoide FPP und GGPP in murinen Gehirngewebe sind im Alter signifikant erhöht (Hooff et al., 2012). Zudem führt die Verringerung der GGPP Gehalte zu einer Reduktion prenylierter GTPasen (Ostrowski et al., 2007; Rilling et al., 1993). Aus diesem Grund liegt der Fokus der vorliegenden Arbeit auf der Untersuchung der Rho-GTPasen und deren Verteilung im Cytosol und den Membranen von Neuronen und murinem Hirngewebe.



**Abbildung 6. Vereinfachte Darstellung des Signalweges, der maßgeblich die Organisation des Cytoskeletts, das Neuritenwachstum und die Synaptogenese reguliert.** Im Cytosol werden inaktive GDP-gebundene Rho-GTPasen bevorzugt mit GGPP prenyliert, katalysiert durch die Geranylgeranyl-Transferase-I (GGTase-I). Rab-GTPasen werden mit GGPP durch die Geranylgeranyl-Transferase-II (GGTase-II) prenyliert. Diese Prenylierung ist erforderlich für die Insertion der GTPasen in Membranen, wo sie durch GEFs (guanine nucleotide exchange factors) aktiviert werden. Die GEFs werden ihrerseits nach der Bindung von Wachstumsfaktoren (growth factor = GF) an den adequate Rezeptor aktiviert. Die Aktivierung der GDP-gebundenen GTPase erfolgt durch Phosphorylierung zum GTP-gebundenen Stadium. Die aktive GTPase kann durch GAPs (GTPase-activating proteins) deaktiviert werden. Im Cytosol halten GDIs (guanidine nucleotide-dissociation inhibitors) die GDP-gebundenen GTPase im inaktiven Stadium. Aktive Rho-GTPasen, vor allem Rac1, können über diverse Effektoren nachgelagerte Signalkaskaden aktivieren, die letztendlich zur Organisation des Cytoskeletts, zum Neuritenwachstum und zur Synaptogenese führen.

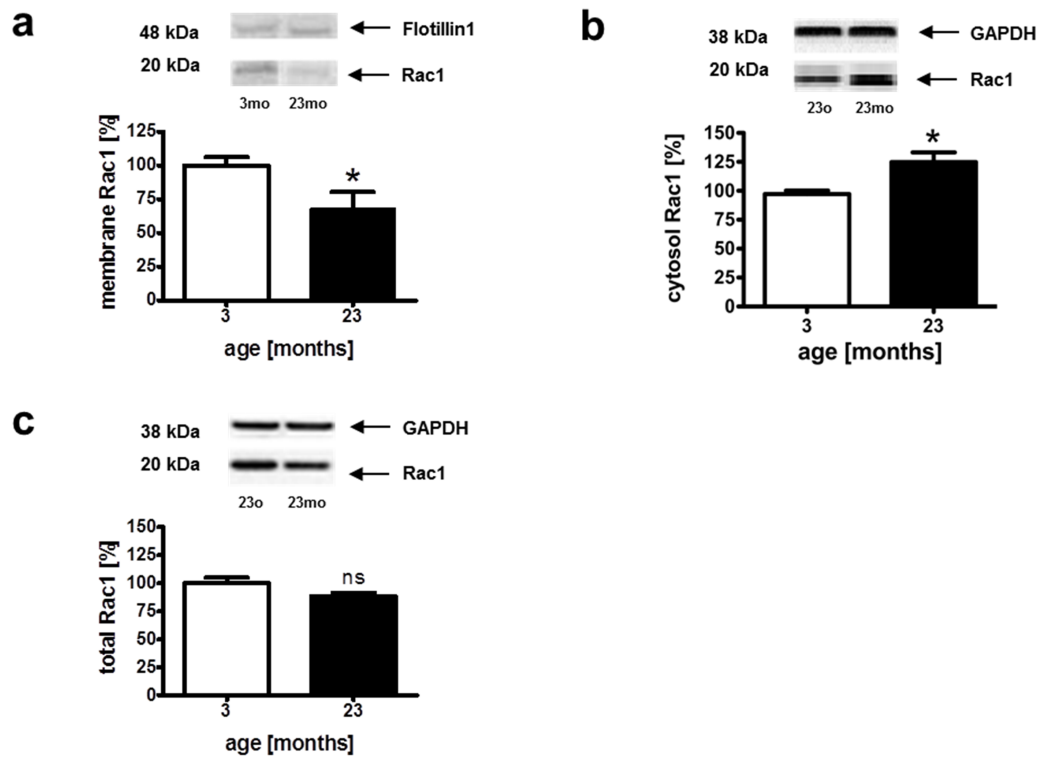
#### **4.1.1 Zelluläre Verteilung von Rho- und Rab-GTPasen in Hirngewebe junger und alter C57BL/6 Mäuse**

Als Modellsystem für die Untersuchung des Einflusses der Gehirnalterung auf die Gehalte von Rho- und Rab-GTPasen wurden männliche C57BL/6 Mäuse im Alter von 3 und 23 Monaten verwendet. Um Rückschlüsse auf die Aktivität und Funktionalität der Rho- und Rab-GTPasen zu erhalten wurde die zelluläre Lokalisation der Rho-GTPasen Rac1, RhoA und Cdc42 und auch der Rab-GTPasen Rab3A und Rab11B untersucht. Hierfür wurden neben dem Gesamthomogenat des Hirngewebes der Versuchstiere auch Präparationen von Membran- und Cytosol-Fractionen des Hirngewebes analysiert.

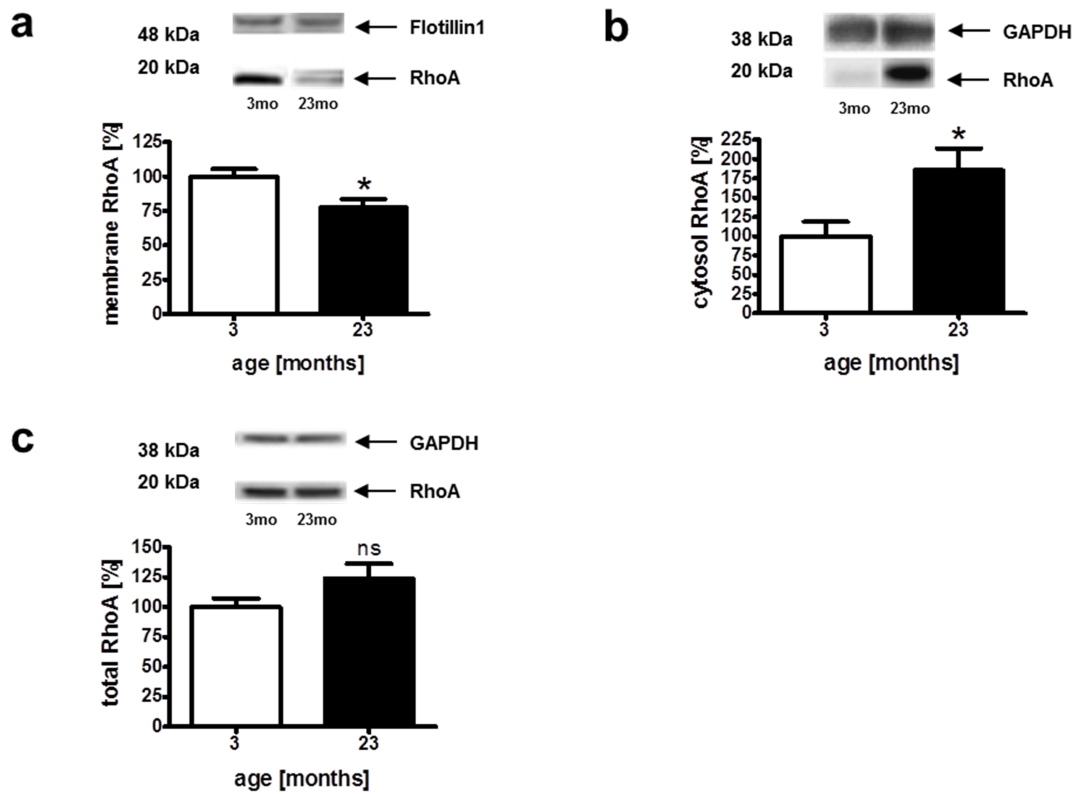
Basierend auf den erhöhten Gehalten an GGPP in Hirngewebe alter Mäuse (Hooff et al., 2012) wurde im Zuge dieser Arbeit untersucht, ob diese Erhöhung die Konsequenz einer beeinträchtigten Funktion der GGTase-I und der GGTase-II, im Sinne der Substratakkumulation, darstellt.

Membran-gebundenes prenyliertes Rac1 zeigte eine signifikante Reduktion in Hirngewebe 23 Monate alter C57BL/6 Mäuse im Vergleich zu den 3 Monate alten Tieren. Diese Reduktion war verbunden mit einer signifikanten Erhöhung des im Cytosol lokalisierten Rac1, wobei aber die Gehalte von Rac1 im Gesamthomogenat zwischen dem Hirngewebe der 23 Monate alten und dem der 3 Monate alten C57BL/6 Mäuse keinen Unterschied aufwiesen. Dies deutet darauf hin, dass im Alter eine verminderte Prenylierung von Rac1 vorliegt.

Analog den Untersuchungsergebnissen der Rho-GTPase Rac1, wiesen die Gehalte der Rho-GTPasen RhoA und Cdc42 die gleichen Effekte auf. Auch hier konnte weder für RhoA noch für Cdc42 ein Unterschied der Proteingehalte im Gesamthomogenat zwischen dem Hirngewebe der beiden Altersgruppen detektiert werden. Während im Hirngewebe der 23 Monate alten C57BL/6 Mäuse für RhoA und ebenso für Cdc42 die Gehalte an Membran-gebundenem prenylierten Protein im Vergleich zu den 3 Monate alten Mäusen signifikant erniedrigt waren, lag eine Erhöhung der Proteingehalte in den Präparationen des Cytosols aus dem Hirngewebe der 23 Monate alten Mäuse vor. Diese Daten lassen vermuten, dass insgesamt die Gehalte an prenylierten Rho-GTPasen im gealterten Gehirn reduziert sind.

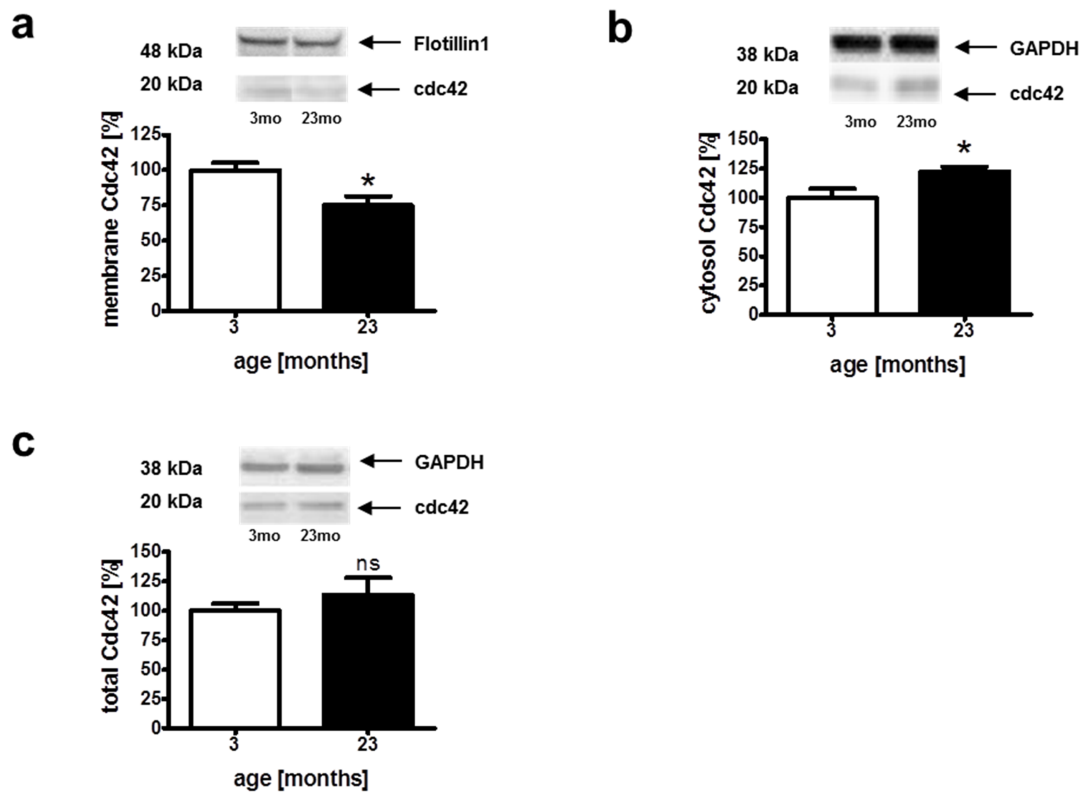


**Abbildung 7. Proteingehalte der Rho-GTPase Rac1 im Hirngewebe der C57BL/6 Mäuse.** Die WesternBlot Analyse von Membranpräparationen (a), Cytosolpräparationen (b) und von Gesamthomogenat (c) aus Hirngewebe junger (3 Monate alter = 3 mo) und gealterter (23 Monate alter = 23 mo) C57BL/6 Mäuse wurde verwendet um die Prenylierung der Rho-GTPase Rac1 (a, b, c) zu charakterisieren. Die Proteingehalte der Membran-gebundenen geranylgeranylierten Rho-GTPase Rac1 (membrane Rac1) wurden auf den Membran-Marker Flotillin-1 normiert. Die Proteingehalte der Cytosolpräparationen (cytosol Rac1) und der Gesamthomogenate (total Rac1) wurden auf GAPDH normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei den jeweiligen Graphen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p < 0.05$ ; ns=not significant),  $n=6$ .



**Abbildung 8. Proteingehalte der Rho-GTPase RhoA im Hirngewebe der C57BL/6 Mäuse.** Die WesternBlot Analyse von Membranpräparationen (a), Cytosolpräparationen (b) und von Gesamthomogenat (c) aus Hirngewebe junger (3 Monate alter = 3 mo) und gealterter (23 Monate alter = 23 mo) C57BL/6 Mäuse wurde verwendet um die Prenylierung der Rho-GTPase RhoA (a, b, c) zu charakterisieren. Die Proteingehalte der Membran-gebundenen geranylgeranylierten Rho-GTPase RhoA (membrane RhoA) wurden auf den Membran-Marker Flotillin-1 normiert. Die Proteingehalte der Cytosolpräparationen (cytosol RhoA) und der Gesamthomogenate (total RhoA) wurden auf GAPDH normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei den jeweiligen Graphen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ; ns=not significant),  $n=6$ .



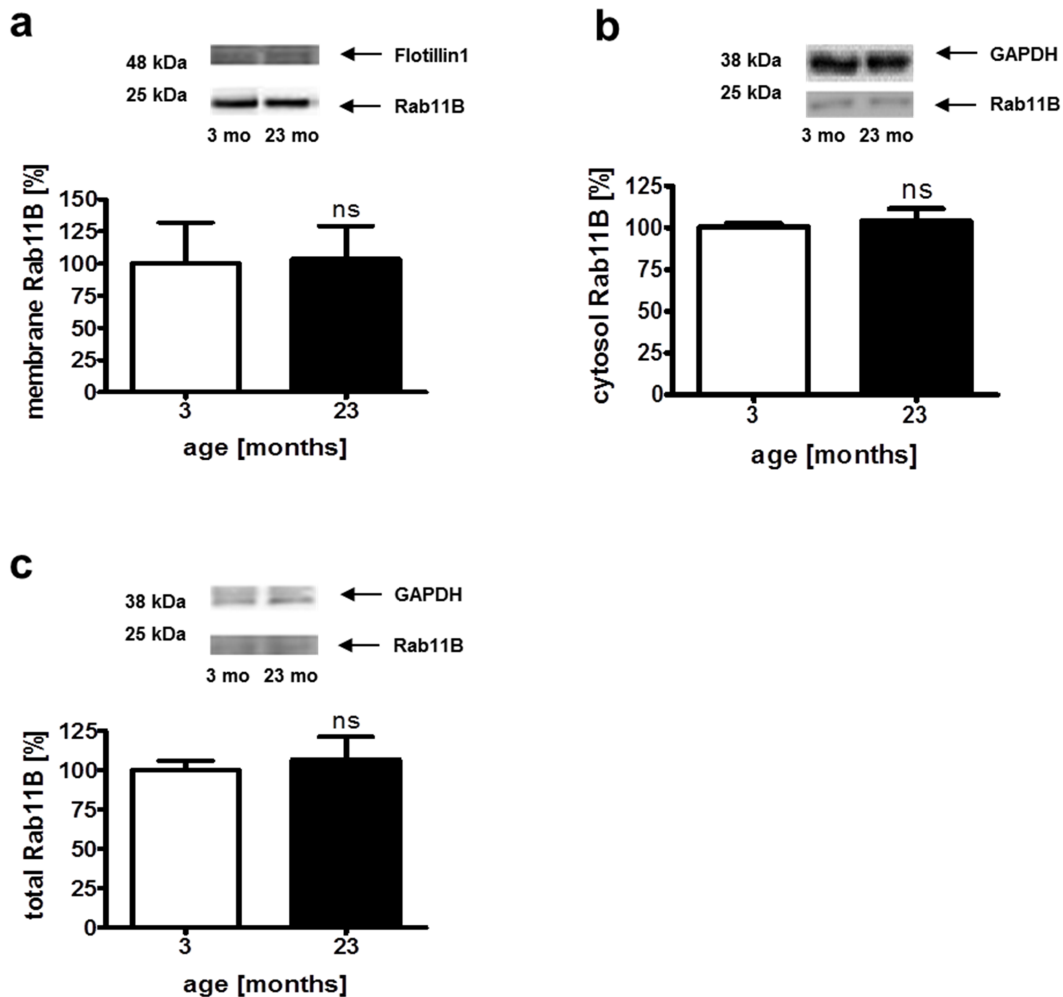


**Abbildung 9. Proteingehalte der Rho-GTPase Cdc42 im Hirngewebe der C57BL/6 Mäuse.** Die WesternBlot Analyse von Membranpräparationen (a), Cytosolpräparationen (b) und von Gesamthomogenat (c) aus Hirngewebe junger (3 Monate alter = 3 mo) und gealterter (23 Monate alter = 23 mo) C57BL/6 Mäuse wurde verwendet um die Prenylierung der Rho-GTPase Cdc42 (a, b, c) zu charakterisieren. Die Proteingehalte der Membran-gebundenen geranylgeranylierten Rho-GTPase Cdc42 (membrane Cdc42) wurden auf den Membran-Marker Flotillin-1 normiert. Die Proteingehalte der Cytosolpräparationen (cytosol Cdc42) und der Gesamthomogenate (total Cdc42) wurden auf GAPDH normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei den jeweiligen Graphen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ; ns=not significant),  $n=6$ .

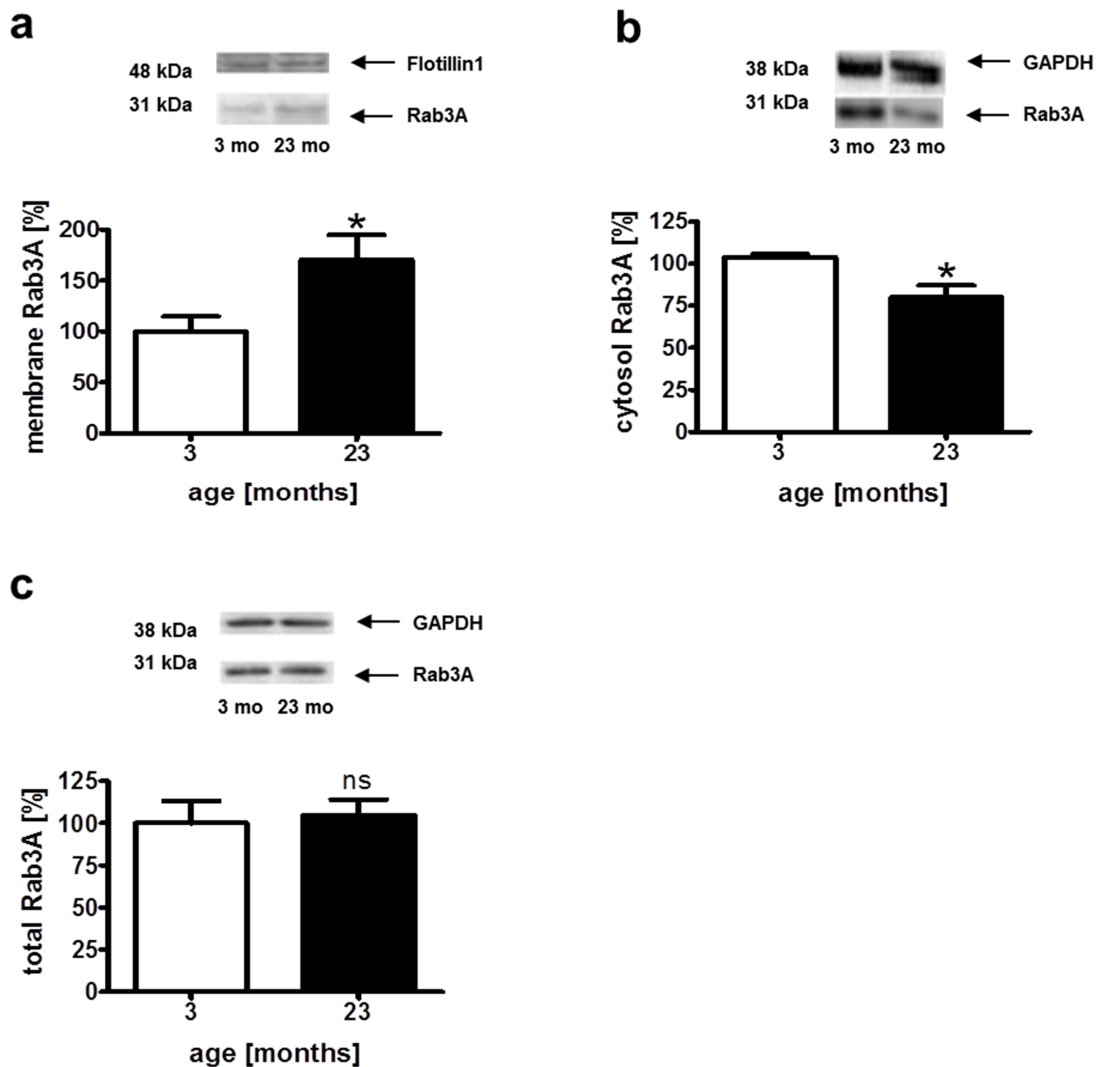
Die Prenylierung der Rho-GTPasen erfordert die Aktivität der Transferase GGTase-I (Casey, 1992), die Prenylierung der Familie der Rab-GTPasen wird durch die GGTase-II katalysiert (Anant et al., 1998; Seabra, Goldstein, et al., 1992).

Um herauszufinden ob die altersbedingte Reduktion der Membran-gebundenen Rho-GTPasen Rac1, RhoA und Cdc42 spezifisch bei Proteinen auftritt, die katalysiert von der GGTase-I prenyliert werden, wurden nun die Gehalte verschiedener Rab-GTPasen ermittelt. Die Proteine Rab3A und Rab11B gehören zu der Familie der Rab-GTPasen und werden im zentralen Nervensystem exprimiert (Kelly et al., 2012; Stenmark & Olkkonen, 2001). Auch ihre Gehalte wurden in Hirnen von 3 und 23 Monate alten C57BL/6 Mäusen gemessen. Im Gesamthomogenat des Hirngewebes der beiden Altersgruppen wurden für die

beiden Rab-GTPasen Rab3A und Rab11B keine Unterschiede detektiert. Rab11B zeigte auch in den Präparationen der Membran- und Cytosol-Fractionen aus den Gehirnen der 3 und 23 Monate alten Versuchstiere keine Veränderungen. Jedoch ergab die Untersuchung der Gehalte an Membran-gebundenem Rab3A in den Gehirnen der 23 Monate alten Mäuse eine signifikante Erhöhung im Vergleich zu den 3 Monate alten Mäusen. In den cytosolischen Präparationen der Mäusehirne wurde eine altersbedingte Reduktion der Rab3A-Gehalte detektiert.



**Abbildung 10. Proteingehalte der Rab-GTPase Rab11B im Hirngewebe der C57BL/6 Mäuse.** Die WesternBlot Analyse von Membranpräparationen (a), Cytosolpräparationen (b) und von Gesamthomogenat (c) aus Hirngewebe junger (3 Monate alter = 3 mo) und gealterter (23 Monate alter = 23 mo) C57BL/6 Mäuse wurde verwendet um die Prenylierung der Rab-GTPase Rab11B (a, b, c) zu charakterisieren. Die Proteingehalte der Membran-gebundenen geranylgeranylierten Rab-GTPase Rab11B (membrane Rab11B) wurden auf den Membran-Marker Flotillin-1 normiert. Die Proteingehalte der Cytosolpräparationen (cytosol Rab11B) und der Gesamthomogenate (total Rab11B) wurden auf GAPDH normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei den jeweiligen Graphen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test (ns=not significant), n=6.



**Abbildung 11. Proteingehalte der Rab-GTPase Rab3A im Hirngewebe der C57BL/6 Mäuse.** Die WesternBlot Analyse von Membranpräparationen (a), Cytosolpräparationen (b) und von Gesamthomogenat (c) aus Hirngewebe junger (3 Monate alter = 3 mo) und gealterter (23 Monate alter = 23 mo) C57BL/6 Mäuse wurde verwendet um die Prenylierung der Rab-GTPase Rab3A (a, b, c) zu charakterisieren. Die Proteingehalte der Membran-gebundenen geranylgeranylierten Rab-GTPase Rab3A (membrane Rab3A) wurden auf den Membran-Marker Flotillin-1 normiert. Die Proteingehalte der Cytosolpräparationen (cytosol Rab3A) und der Gesamthomogenate (total Rab3A) wurden auf GAPDH normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei den jeweiligen Graphen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ; ns=not significant),  $n=6$ .

Im Cytosol blockieren die guanine dissociation inhibitors (GDIs) den Nucleotidaustausch der kleinen GTPasen und halten diese dadurch in der inaktiven GDP-gebundenen Form in einem löslichen Komplex (DerMardirossian & Bokoch, 2005). Auf diese Weise wird die Membranassoziation der kleinen GTPasen reguliert und über ihre Lokalisation wird wiederum ihre Funktionalität gesteuert (Jacqueline Cherfils & Zeghouf, 2013). Spezifische Rho- und RabGDIs erkennen den Geranylgeranylrest der Rho- und Rab-GTPasen. Gegenstand aktueller Diskussionen ist die Möglichkeit, dass RhoGDIs auch prenylierte

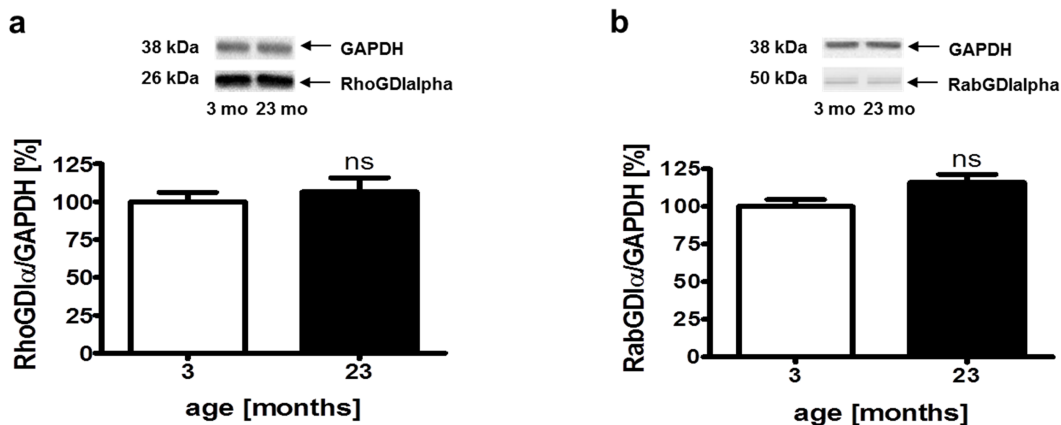
## Ergebnisse

GTPasen in ihrer aktiven GTP-gebundenen Form im Cytosol komplexieren (Samuel & Hynds, 2010). Die Bindung der Rho-GDIs an den Rho-GTPasen stellt eine mögliche Erklärung für die altersbedingten Unterschiede in der zellulären Verteilung der GTPasen dar.

RhoGDI- $\alpha$  bindet spezifisch Rac1, RhoA und Cdc42 (Olofsson, 1999; Wennerberg & Der, 2004), wohingegen die beiden weiteren Rho-GDIs RhoGDI- $\beta$  und RhoGDI- $\gamma$  keine oder nur eine sehr geringe Affinität zu Rac1, RhoA und Cdc42 besitzen (Adra et al., 1997; Dovas & Couchman, 2005; Zalzman et al., 1996). Die Untersuchung der Gehalte an RhoGDI- $\alpha$  in den Gesamthomogenaten der Gehirne der 3 und 23 Monate alten Mäuse zeigte keine Unterschiede zwischen den beiden Altersgruppen.

Von den drei Isoformen der RabGDIs die sowohl im menschlichen als auch im murinen Organismus exprimiert werden (S. K. Wu et al., 1996) ist RabGDI- $\alpha$  im Gehirn angereichert, wobei die beiden Rab-GDIs RabGDI- $\beta$  und RabGDI- $\gamma$  ubiquitär exprimiert werden (Alory & Balch, 2001; S. Pfeffer & Aivazian, 2004).

Es gab auch keinerlei altersbedingte Veränderung der Proteingehalte von RabGDI- $\alpha$  im Hirnhomogenat der 3 und 23 Monate alten Versuchstiergruppen.



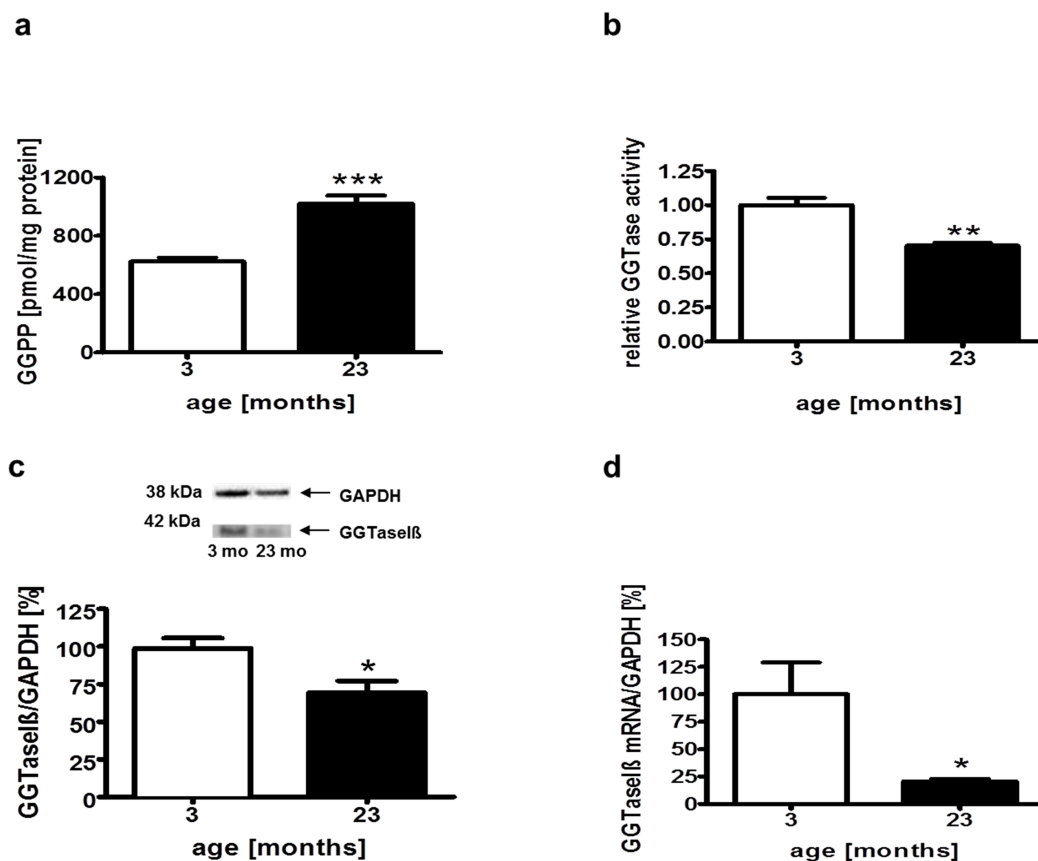
**Abbildung 12. Proteingehalte von RhoGDI- $\alpha$  und RabGDI- $\alpha$  im Hirngewebe der C57BL/6 Mäuse.** Die WesternBlot Analyse von Cytosolpräparationen (a, b) aus Hirngewebe junger (3 Monate alter = 3 mo) und gealterter (23 Monate alter = 23 mo) C57BL/6 Mäuse wurde verwendet um die Funktion von RhoGDI- $\alpha$  und RabGDI- $\alpha$  zu charakterisieren. Die Proteingehalte der Cytosolpräparationen (RhoGDI $\alpha$ /GAPDH und RabGDI $\alpha$ /GAPDH) wurden auf GAPDH normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei den jeweiligen Graphen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test (ns=not significant), n=4.

Die Proteingehalte der Rho-GTPasen Rac1, RhoA und Cdc42 und auch der Rab-GTPasen Rab3A und Rab11B wiesen keinen Unterschied zwischen dem Gesamthomogenat des Gehirngewebes von 3 und 23 Monate alten C57BL/6 Mäusen auf. Jedoch konnte bei allen drei Rho-GTPasen festgestellt werden, dass die Membran-gebundenen prenylierten Proteine des Gehirngewebes der 23 Monate alten Mäuse im Vergleich zu den 3 Monate alten Tieren signifikant erniedrigt waren. Außerdem lagen in den Präparationen des Cytosols aus dem Hirngewebe der 23 Monate alten Mäuse im Vergleich zu den 3 Monate alten Tieren die Rho-GTPasen signifikant erhöht vor. Eine andere zelluläre Lokalisation zeigte sich bei den untersuchten Rab-GTPasen. Während die Membran- und Cytosol-Präparationen keinerlei Unterschiede zwischen den Altersgruppen bei der Rab-GTPase Rab11B zeigte, konnte eine signifikante Erhöhung der Gehalte an Membran-gebundenem Rab3A und eine signifikante Erniedrigung des cytosolischen Rab3A in den Gehirnen der 23 Monate alten Mäuse im Vergleich zu den 3 Monate alten Mäusen detektiert werden. Diese Befunde beruhen jedoch nicht auf einer unterschiedlichen Expression der spezifischen GDIs RhoGDI- $\alpha$  und RabGDI- $\alpha$ , da diese keine altersbedingten Unterschiede zwischen den Versuchstiergruppen zeigten.

#### **4.1.2 GGPP, GGTase-Aktivität, GGTase-I $\beta$ -Protein- und Gen-Expression in Hirngewebe junger und alter C57BL/6 Mäuse**

Die Gehalte der Membran-gebundenen Rho-GTPasen Rac1, RhoA und Cdc42 waren in den Hirnen alter Versuchstiere reduziert, jedoch nicht die der Rab-GTPasen Rab3A und Rab11B. Die Proteinfamilien der Rho- und der Rab-GTPasen benötigen GGPP für ihre Prenylierung. Der Grund für die altersbedingte Reduktion der prenylierten Rho-GTPasen kann nicht durch einen Mangel an GGPP erklärt werden. Denn im Vergleich zu den 3 Monate alten C57BL/6 Mäusen lagen die Gehalte an GGPP in den Hirnen der 23 Monate alten Tiere signifikant erhöht vor. Das Enzym GGTase-I ist ein Heterodimer, welches aus einer  $\alpha$ -Untereinheit und einer  $\beta$ -Untereinheit aufgebaut ist. Die  $\alpha$ -Untereinheit der GGTase-I ist identisch zu der  $\alpha$ -Untereinheit der Farnesyltransferase (FTase). Die  $\beta$ -Untereinheit der GGTase-I reguliert die Bindung von GGPP an Rac1, RhoA, Cdc42 und anderen Rho-GTPasen (Casey & Seabra, 1996; Taylor et al., 2003). Die Proteingehalte der GGTase-I $\beta$  im Gesamthomogenat aus den Hirnen der 23

Monate alten C57BL/6 Mäuse waren verglichen mit denen der jungen Kontrolltiere signifikant erniedrigt. Die Reduktion der Proteingehalte der GGTase-I $\beta$  war zudem mit einer altersbedingten stark ausgeprägten Reduktion der GGTase-I $\beta$  mRNA Expression assoziiert. Die erniedrigten Werte auf Ebene der mRNA und der des Proteins GGTase-I $\beta$  korrelieren direkt mit der zusätzlich untersuchten relativen GGTase-Aktivität, die ebenfalls in den Hirnen der alten Tiere reduziert vorlag.



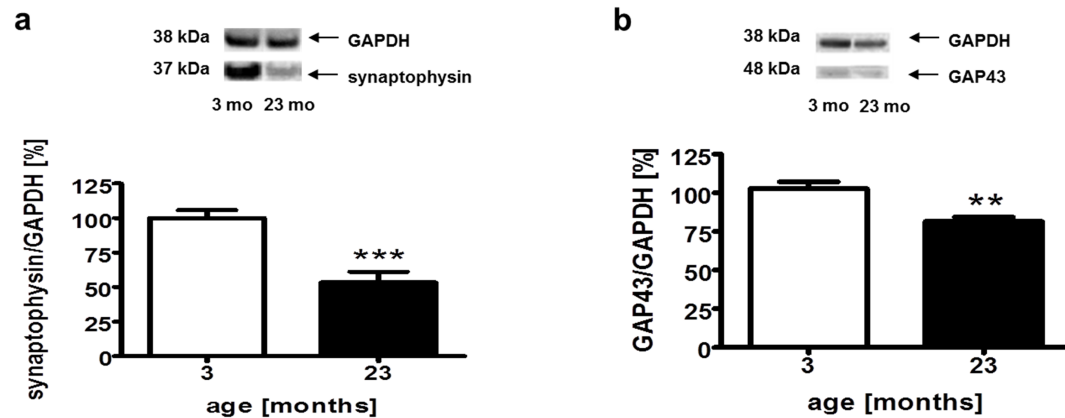
**Abbildung 13. GGPP, relative GGTase-Aktivität, Proteingehalt und mRNA-Expression der GGTase-I $\beta$  im Hirngewebe der C57BL/6 Mäuse.** Die Analysen des Hirngewebes junger (3 Monate alter = 3) und gealterter (23 Monate alter = 23) C57BL/6 Mäuse wurde verwendet um die Funktion der GGTase-I zu charakterisieren. Die Gehalte des Isoprenoids GGPP (a) wurden mittels HPLC-FD Methode quantifiziert. Die relative GGTase-Aktivität (b) (relative GGTase activity) wurde mittels Fluorimetrie bestimmt. Die Proteingehalte (c) (GGTaseI $\beta$ /GAPDH) wurden mittels WesternBlot Analyse und die mRNA-Expression (d) (GGTaseI $\beta$  mRNA/GAPDH) mittels qRT-PCR der GGTase-I $\beta$  im Gesamthomogenat gemessen auf GAPDH normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei dem Graphen (c) dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ;  $p^{**} < 0.01$ ;  $p^{***} < 0.001$ ),  $n=8$  (GGPP),  $n=4$  (relative GGTase-Aktivität),  $n=6$  (GGTase-I $\beta$  Protein- und mRNA-Expression).

Bei der Untersuchung des Gehirngewebes der beiden Altersgruppen der C57BL/6 Mäuse lagen die Gehalte an GGPP in den 23 Monate alten Tieren signifikant höher vor als bei den 3 Monate alten Mäusen. Andererseits zeigte sich eine altersbedingte Reduktion der Protein- und mRNA Expression der GGTase-I $\beta$ . Weiterhin lag die relative GGTase-Aktivität in den Hirnen der alten Tiere im Vergleich zu den jungen Kontrolltieren ebenfalls reduziert vor. Diese Untersuchungsergebnisse deuten darauf hin, dass die altersbedingte Veränderung der Prenylierung und damit verbundenen Lokalisation der Rho-GTPasen Rac1, RhoA und Cdc42 eine direkte Konsequenz der altersbedingten Reduktion der GGTase-I darstellen könnten.

#### **4.1.3 Synaptische Markerproteine Synaptophysin und GAP-43 in Hirngewebe junger und alter C57BL/6 Mäuse**

Synaptophysin, ein Glycoprotein presynaptischer Vesikelmembranen und das (growth-associated protein) GAP-43, eine Membrankomponente des neuronalen Wachstumskegels, werden einzig in Synapsen exprimiert und verteilt. Aus diesem Grund finden die beiden Proteine Synaptophysin und GAP-43 einen verbreiteten Nutzen als synaptische Markerproteine (Benowitz, Perrone-Bizzozero, Finklestein, & Bird, 1989; Benowitz & Routtenberg, 1997; Y. C. Chen, Chen, Lei, & Wang, 1998; Dickey et al., 2003; Jahn, Schiebler, Ouimet, & Greengard, 1985; Navone et al., 1986; Saito et al., 1994; Sherriff, Bridges, Gentleman, Sivaloganathan, & Wilson, 1994; Snipes et al., 1987; Wiedenmann & Franke, 1985; Xiong & Chen, 2010).

Beide synaptischen Marker, Synaptophysin und GAP-43, lagen im Gehirngewebe der 23 Monate alten C57BL/6 Mäuse verglichen mit den 3 Monate alten Kontrolltieren signifikant reduziert vor. Diese Befunde lassen auf eine altersbedingte Regression der Synapsen schließen.



**Abbildung 14. Proteingehalte von Synaptophysin und GAP-43 im Hirngewebe der C57BL/6 Mäuse.** Die WesternBlot der Gesamthomogenate aus Hirngewebe junger (3 Monate alter = 3 mo) und gealterter (23 Monate alter = 23 mo) C57BL/6 Mäuse wurde verwendet um die Proteingehalte der beiden synaptischen Marker Synaptophysin (a) und GAP-43 (b) zu bestimmen. Die Proteingehalte wurden auf GAPDH normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei den jeweiligen Graphen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^{**}<0.01$ ;  $p^{***}<0.001$ ),  $n=6$ .

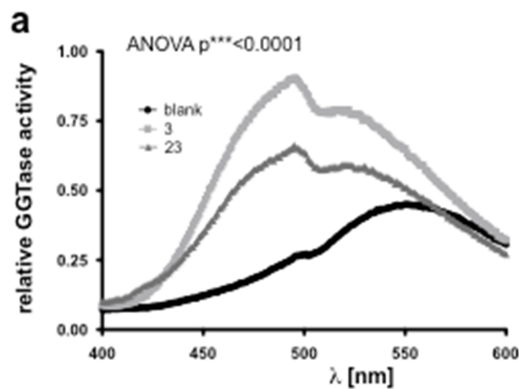
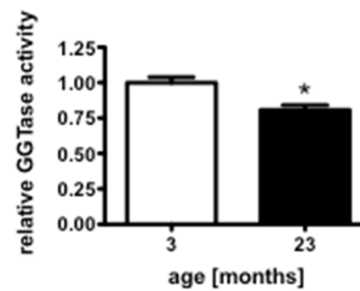
#### 4.1.4 Relative GGTase-Aktivität in Hirngewebe junger und alter NMRI-Mäuse, Inhibition der GGTase-I mittels GGTI-286

Die Enzymaktivität der GGTase-I wurde in einem weiteren Tiermodell überprüft. Hierfür wurden NMRI Mäuse herangezogen. Im Hirngewebe gealterter (23 Monate alter) NMRI Mäuse lag im Vergleich zu den jungen (3 Monate alten) Kontrolltieren die GGTase-Aktivität analog der Enzymaktivität im Hirngewebe der C57BL/6 Mäuse signifikant reduziert vor. Die Cholesteringehalte im Hirngewebe wiesen keinen Unterschied zwischen den 3 und 23 Monate NMRI Mäusen auf. Außerdem konnte die Aktivität der GGTase-I durch  $2\mu\text{M}$  des spezifischen GGTase-I-Inhibitors GGTI-286 in beiden Altersgruppen signifikant gesenkt werden.

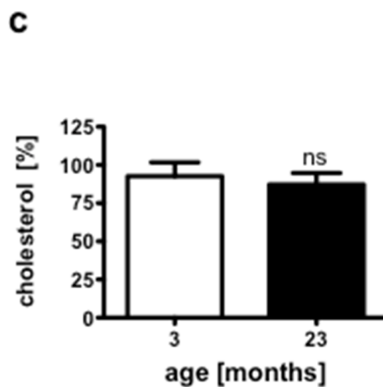
So wurde der Befund der altersbedingten Reduktion der relativen GGTase-Aktivität auch in einer zweiten murinen Spezies bestätigt und konnte durch die pharmakologische Inhibition mittels des spezifischen GGTase-I-Inhibitors GGTI-286 in beiden Altersgruppen (3 und 23 Monate) der NMRI Mäuse reduziert werden.



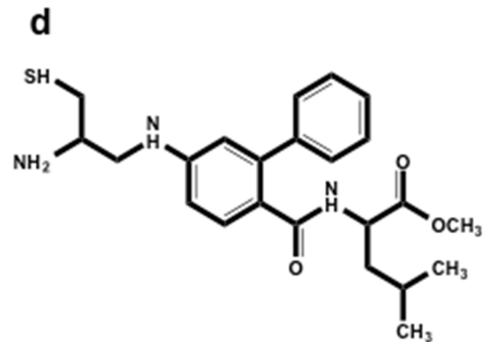
## NMRI

**b**

## NMRI



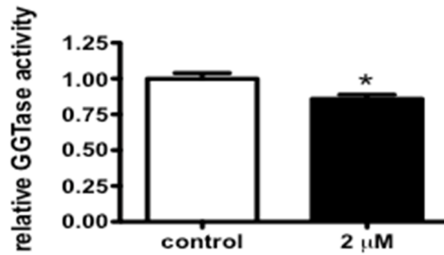
## GGTI-286



**Abbildung 15. Relative GGase-Aktivität im Hirngewebe der NMRI Mäuse.** Die Analysen des Hirngewebes junger (3 Monate alter = 3) und gealterter (23 Monate alter = 23) NMRI Mäuse wurde durchgeführt um die Funktion der GGase-I näher zu charakterisieren. Die relative GGase-Aktivität (a, b) (relative GGase activity) wurde mittels Fluorimetrie bestimmt. Abbildung (a) zeigt neben dem Leerwert (blank) das Emissionsspektrum der relativen Enzymaktivität der GGase-I isoliert aus dem Hirngewebe junger (3 Monate alter = 3) und gealterter (23 Monate alter = 23) NMRI Mäuse. Die Messung erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm und der Emission von 400 nm bis 600 nm. Abbildung (b) zeigt die relative GGase-Aktivität gemessen bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm und der Emission von 505 nm. Die Cholesterolgehalte (cholesterol) aus dem Hirngewebe der beiden Altersgruppen der NMRI Mäuse (c) wurden enzymatisch anhand der CHOD-PAP Methode ermittelt. Die chemische Strukturformel des spezifischen GGase-I-Inhibitors GGTI-286 ist in Abbildung (d) dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^*<0.05$ ; ns=not significant), 1way ANOVA ( $p^{***}<0.0001$ ),  $n=3$ .

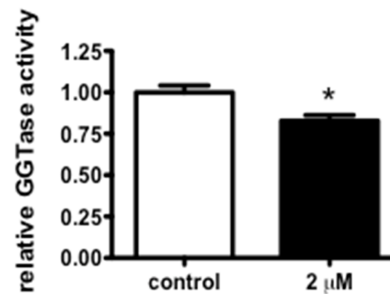
## NMRI 3 months GGTI-286

a



## NMRI 23 months GGTI-286

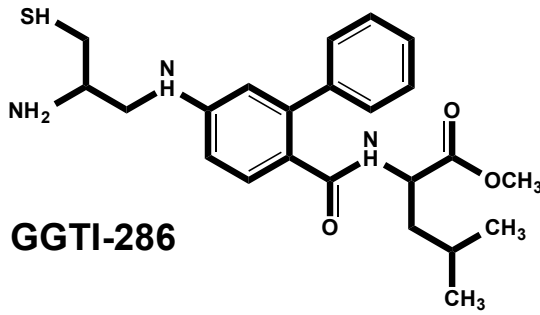
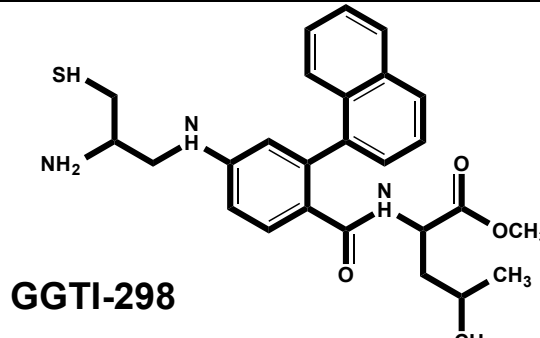
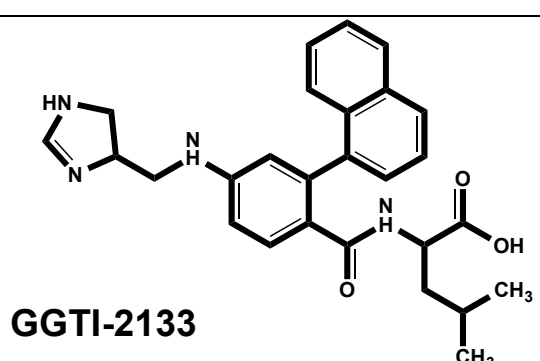
b



**Abbildung 16. Effekt des GGTase-Inhibitors GGTI-286 auf die relative GGTase-Aktivität im Hirngewebe der NMRI Mäuse.** Die Analysen des Hirngewebes junger (3 Monate alter = 3) und gealterter (23 Monate alter = 23) NMRI Mäuse wurde durchgeführt um die Funktion der GGTase-I näher zu charakterisieren. Die relative GGTase-Aktivität (a, b) (relative GGTase activity) wurde mittels Fluorimetrie bestimmt. Die Graphen (a, b) zeigen die relative GGTase-Aktivität gemessen bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm und der Emission von 505 nm. Die isolierte GGTase-I aus dem Hirngewebe der jungen (a) und auch der gealterten (b) NMRI Mäuse wurde durch 2  $\mu$ M GGTI-286 inhibiert. Die isolierten Enzyme, die statt dem Inhibitor mit dem Solvent DMSO versetzt wurden, dienen als Kontrollen (control) für die Analysen mittels Fluorimetrie. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ),  $n=3$ .

Die GGTase-I ist ein Bisubstrat-Enzym, welches entweder das Isoprenylsubstrat GGPP oder die C-terminale Sequenz CAAL selektiert. Es existiert eine Vielzahl von strukturell unterschiedlichen GGTase-I-Inhibitoren. Neben einigen natürlich vorkommenden Inhibitoren der GGTase-I, gibt es die Gruppe der peptidomimetischen Inhibitoren. Bei diesen ist die zentrale aliphatische Dipeptideinheit der CAAL-Sequenz durch einen sogenannten „hydrophoben Spacer“ ersetzt, wodurch auch die ursprüngliche Peptidbindung durch eine Aminbindung ausgetauscht wurde (El Oualid, Cohen, van der Marel, & Overhand, 2006). Zu dieser Gruppe gehören die Inhibitoren GGTI-286, GGTI-298 und GGTI-2133. Strukturell sind diese sehr ähnlich aufgebaut, sie unterscheiden sich jedoch stark in ihrer Selektivität. So ist der Inhibitor GGTI-286 zwar ein sehr potenter, aber wenig selektiver Inhibitor der GGTase-I. Während für den Inhibitor GGTI-298 bislang keine in vitro Daten zu seiner Selektivität vorliegen, zeichnet sich der Inhibitor GGTI-2133 auch im Vergleich zu den anderen bekannten Vertretern der peptidomimetischen GGTase-I-Inhibitoren durch seine hohe Wirksamkeit und sehr hohe Selektivität aus (El Oualid et al., 2006; Vasudevan et al., 1999). Aus diesem Grund wurden die weiteren in vitro Experimente dieser Arbeit mit dem GGTase-I-Inhibitor GGTI-2133 durchgeführt.

Tabelle 1 Mittlere inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) ausgewählter peptidomimetischer GGTase-I-Inhibitoren auf die GGTase-I, die FTase und verschiedene kleine GTPasen nach Qian et al. und Vasudevan et al. (Qian, Vogt, Vasudevan, Sebti, & Hamilton, 1998; Vasudevan et al., 1999). (nd = nicht definiert).

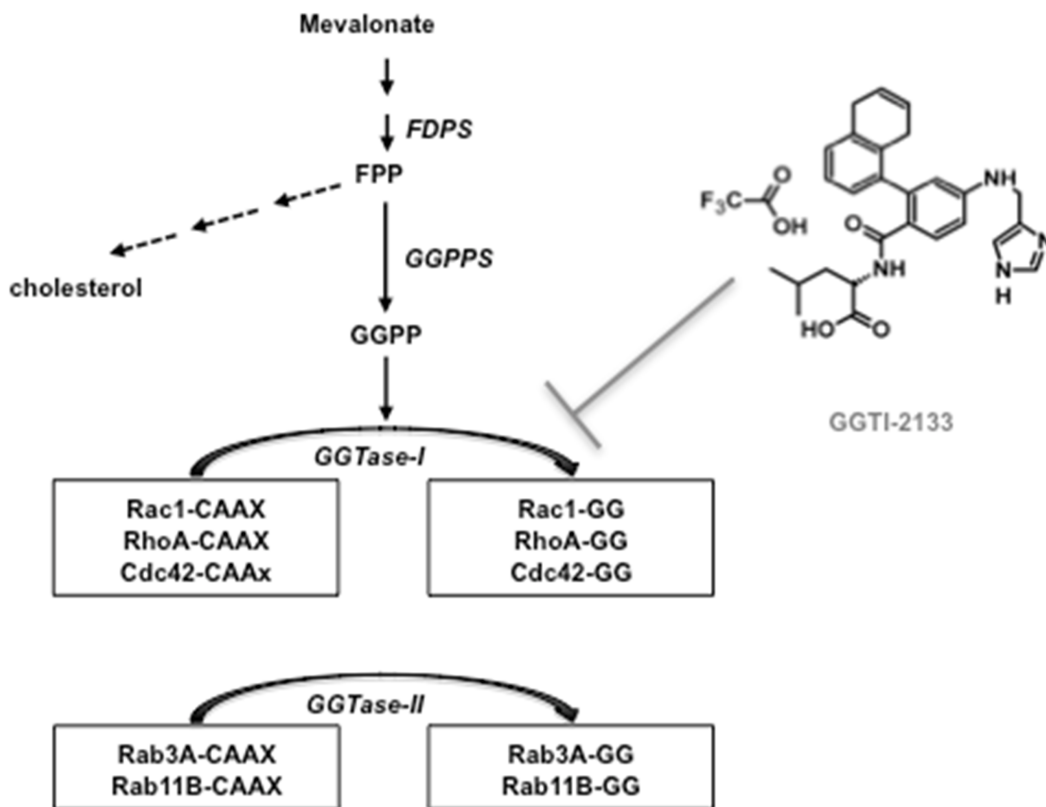
GGTase-Inhibitor	$IC_{50}$ in vitro GGTase-I	$IC_{50}$ in vitro FTase	$IC_{50}$ in vitro (Zellkultur)
 <p><b>GGTI-286</b></p>	240 ± 65 nM	183 ± 104 nM	H-Ras: 1000 nM  K-Ras: 2 µM  Rap1A: 2000 nM
 <p><b>GGTI-298</b></p>	nd	nd	H-Ras: >2000 nM  Rap1A: 3000 nM
 <p><b>GGTI-2133</b></p>	38 ± 9 nM	5400 ± 750 nM	H-Ras: >30000 nM  Rap1A: 10000 nM

#### 4.1.5 Inhibition der GGTase-I mittels GGTI-2133 in SH-SY5Y Zellen

Die relative GGTase-Aktivität, die Protein- und mRNA-Expression der GGTase-I $\beta$  im Hirngewebe alter Mäuse verglichen mit jungen Mäusen wies eine signifikante Verringerung auf, obwohl die Gehalte des Isoprenoids GGPP eine altersbezogene Erhöhung zeigten. Die Veränderungen der GGTase-I waren verbunden mit einer Verschiebung der zellulären Proteinlokalisierung der Rho-GTPasen Rac1, RhoA und Cdc42 (Kapitel 4.1.1). Die altersbedingt veränderte zelluläre Lokalisation

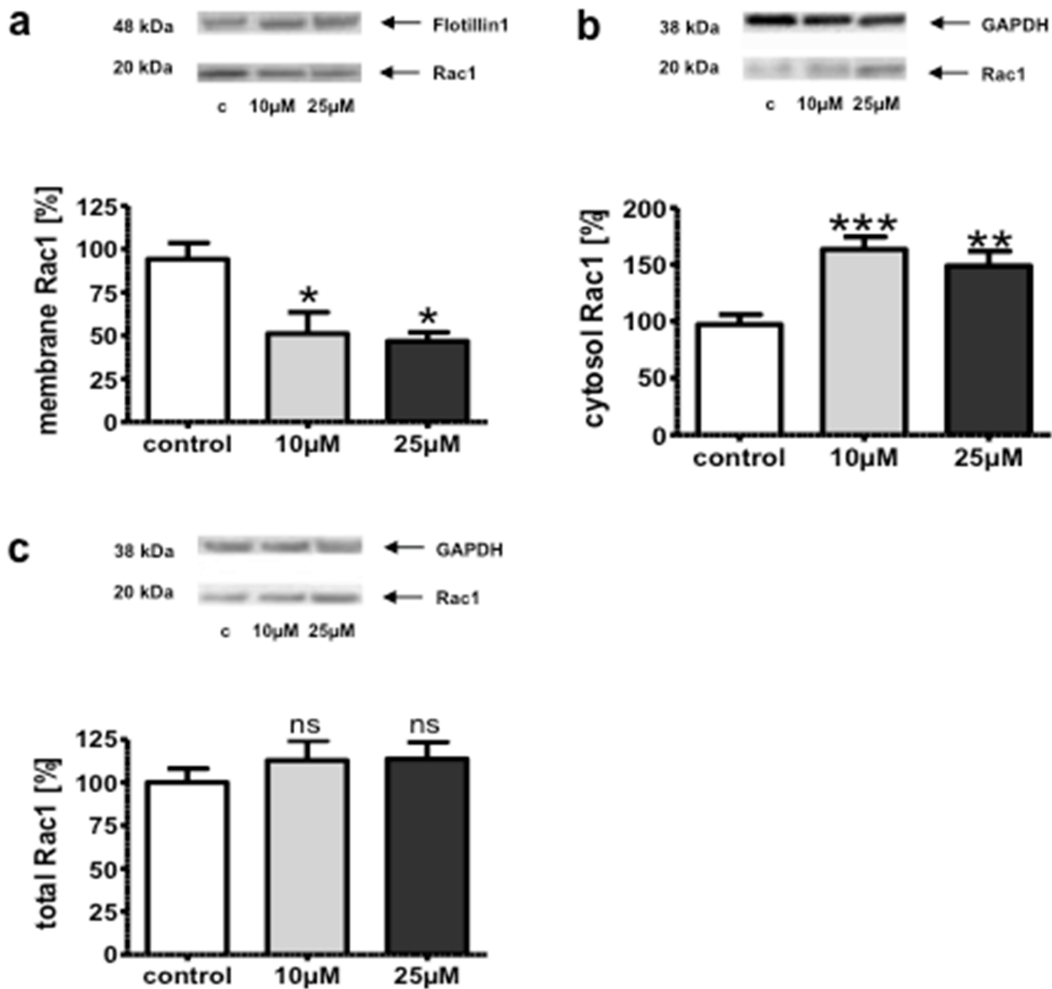
dieser Rho-GTPasen im Hirngewebe drückte sich in der Reduktion des Membran- gebundenen prenylierten Proteins Rac1, RhoA und Cdc42 aus.

Um die Rolle der GGTase-I in diesem Kontext näher zu untersuchen, wurde das humane neuronale Zellmodell der immortalisierten neuroblastoma Zelllinie SH- SY5Y herangezogen. SH-SY5Y Zellen wurden hierfür mit dem spezifischen GGTase-I-Inhibitor GGTI-2133 behandelt.

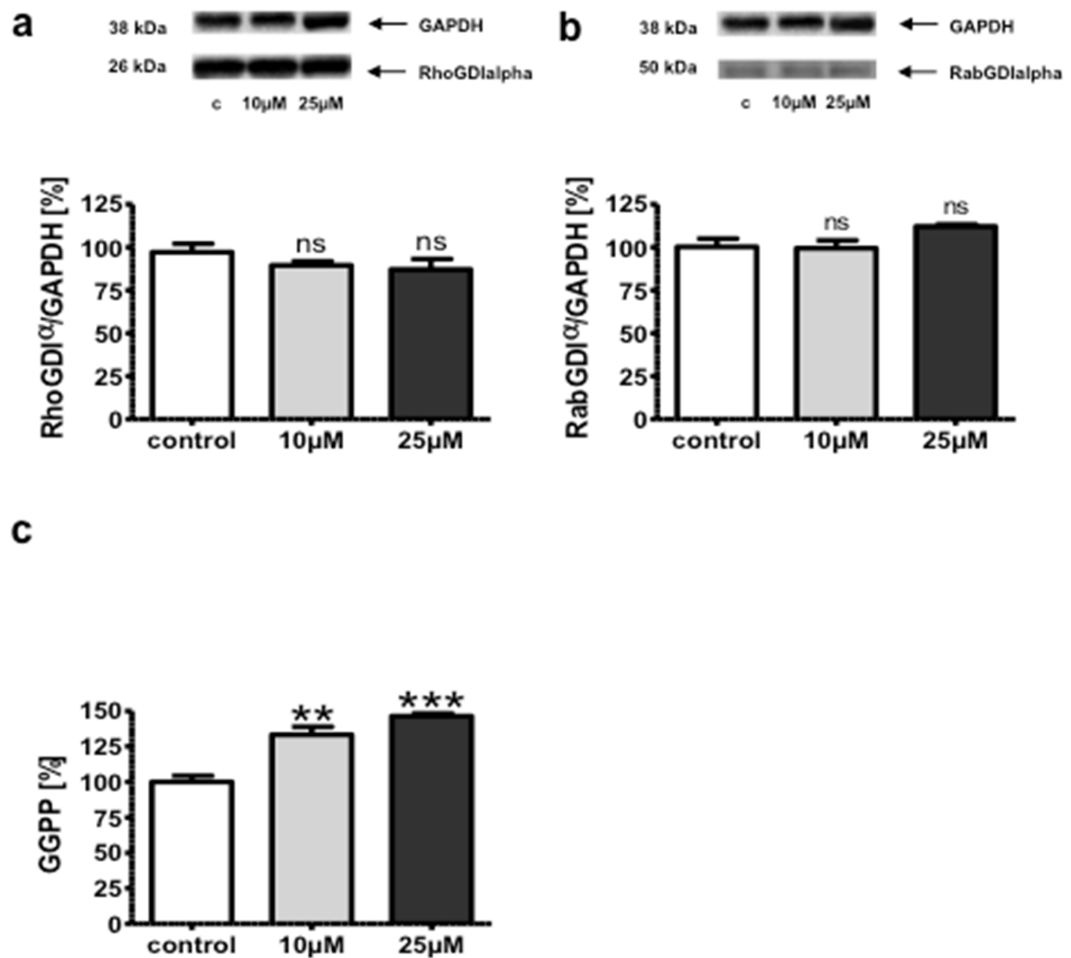


**Abbildung 17. Verkürzter Mevalonat-/Isoprenoid-/Cholesterol-Biosyntheseweg.** Der Mevalonatweg ist ein entscheidender Stoffwechselprozess in eukaryotischen Zellen, bei welchem das Mevalonat den Präkursor verschiedener Intermediate wie dem Farnesylpyrophosphat (FPP), dem Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) und dem Cholesterin darstellt. Die Synthese von FPP wird katalysiert durch die Farnesylpyrophosphat-Synthase (FDPS) und die Geranylgeranylpyrophosphat-Synthase (GGPPS) katalysiert die Synthese von GGPP. GGPP ist das Substrat der posttranslationalen Geranylgeranylierung kleiner GTPasen. Die Geranylgeranylierung der Rho-GTPasen wird die durch die GGTase-I katalysiert, die Geranylgeranylierung der Rab-GTPasen erfolgt durch die katalytische Wirkung der GGTase-II. Diese posttranslationale Geranylgeranylierung (-GG) der kleinen GTPasen ist kritisch für ihre Lokalisation an Membranen und somit für die optimale Funktion. GGTI-2133 ist ein spezifischer Inhibitor der GGTase-I, dessen chemische Strukturformel in dieser Abbildung dargestellt ist.

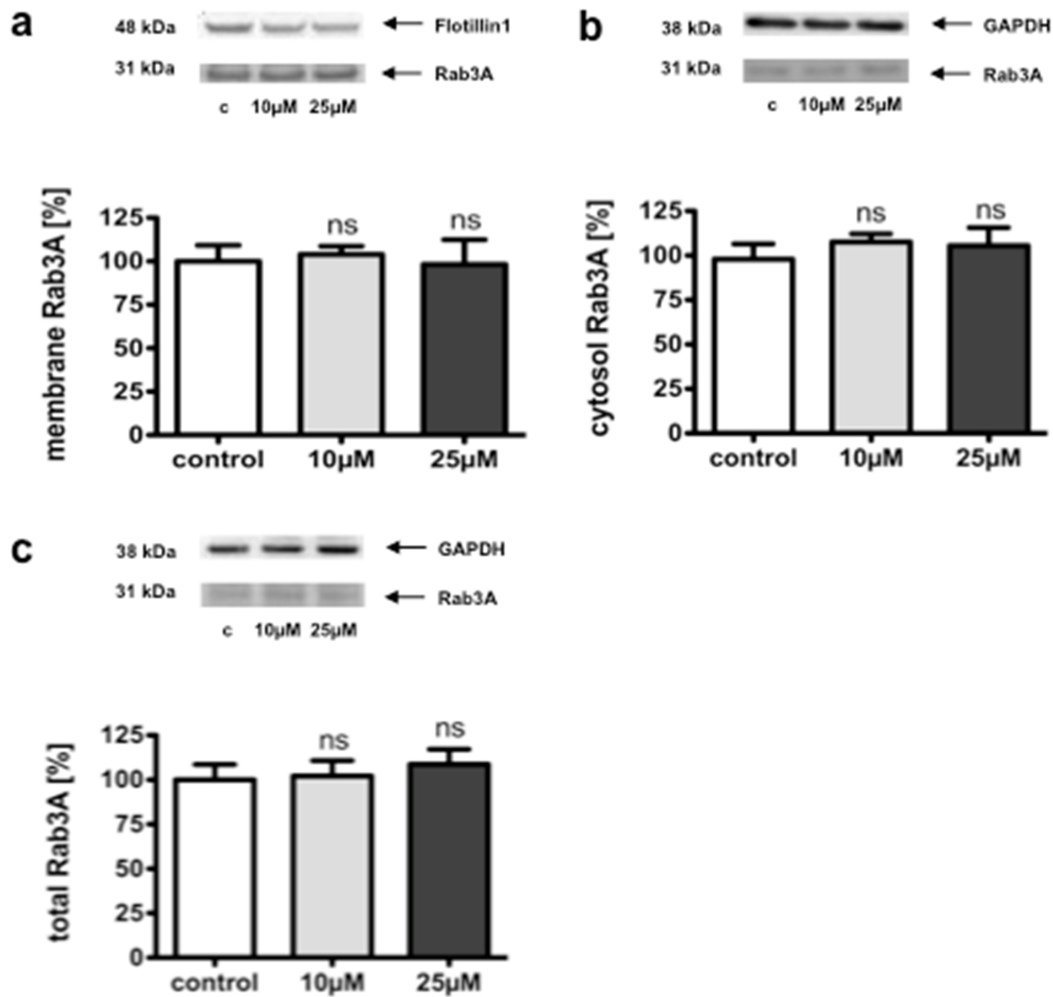
Der Fokus der Analysen war verbunden mit der Fragestellung zu dem Einfluss der GGTase-I auf den Gehalt des prenylierten Membran-gebundenen Proteins Rac1. Die Ergebnisse dieser *in vitro* Experimente sind ähnlich zu den Untersuchungsergebnissen bei der Altersstudie mit den C57BL/6 Mäusen. Die Inhibition der GGTase-I durch die Inkubation der SH-SY5Y Zellen mit den beiden Konzentrationen 10  $\mu$ M und 25  $\mu$ M GGTI-2133 induzierte die Verschiebung der zellulären Lokalisation hin zu einer Abnahme des Proteingehaltes an prenyliertem Membran-gebundenem Rac1 und einer Zunahme an Rac1 im Cytosol. Der Proteingehalt an Rac1 im Gesamthomogenat der behandelten SH-SY5Y Zellen wies keinen Unterschied zu den Kontrollzellen auf. Auch die Proteingehalte an cytosolischem RhoGDI- $\alpha$  und RabGDI- $\alpha$  zeigten keine Veränderung zwischen den mit GGTI-2133 inkubierten SH-SY5Y Zellen und den Kontrollen. Durch die Inhibition der GGTase-I mittels GGTI-2133 wurde jedoch nicht die Prenylierung und Lokalisation der Rab-GGTase Rab3A beeinflusst. Die Behandlung mit dem GGTase-I-Inhibitor GGTI-2133 führte in den SH-SY5Y Zellen zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme des Isoprenoids GGPP, wobei Gehalte von FPP und Cholesterin keine Unterschiede zwischen den mit GGTI-2133 behandelten SH-SY5Y Zellen und den Kontrollen zeigten. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Daten aus der Altersstudie mit den C57BL/6 Mäusen und bestätigt die Auswirkung der verringerten Expression und Aktivität der GGTase-I im neuronalen Zellmodell.



**Abbildung 18. Effekte der GGTase-I-Inhibition mittels GGTI-2133 in den humanen Neuroblastomazellen SH-SY5Y.** Die SH-SY5Y Zellen wurden mit jeweils 10 und 25  $\mu\text{mol/L}$  GGTI-2133 für 48 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent DMSO behandelt wurden, dienten als Kontrollen (control) für die Analysen mittels WesternBlot und HPLC-FD Methode. Die WesternBlot Analyse von Membranpräparationen (a), Cytosolpräparationen (b) und vom Gesamthomogenat (c) aus den mit GGTI-2133 behandelten SH-SY5Y Zellen wurde verwendet um die Prenylierung der Rho-GTPase Rac1 (a, b, c) zu charakterisieren. Die Proteingehalte des Membran-gebundenen geranylgeranylierten Rac1 (membrane Rac1) wurden auf den Membran-Marker Flotillin-1 normiert. Die Proteingehalte der Cytosolpräparationen (cytosol Rac1) und der Gesamthomogenate (total Rac1) wurden auf GAPDH normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei den jeweiligen Graphen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ;  $p^{**} < 0.01$ ;  $p^{***} < 0.001$ ; ns=not significant),  $n=3$  (Proteingehalte des Membran-gebundenen Rac1 in SH-SY5Y Zellen, die mit 25  $\mu\text{mol/L}$  GGTI-2133 behandelt wurden),  $n=5$  (Proteingehalte des Membran-gebundenen Rac1 in SH-SY5Y Zellen, die mit 10  $\mu\text{mol/L}$  GGTI-2133 behandelt wurden und der Kontrollen; Proteingehalte des Rac1 im Cytosol; Gesamtproteingehalt von Rac1).

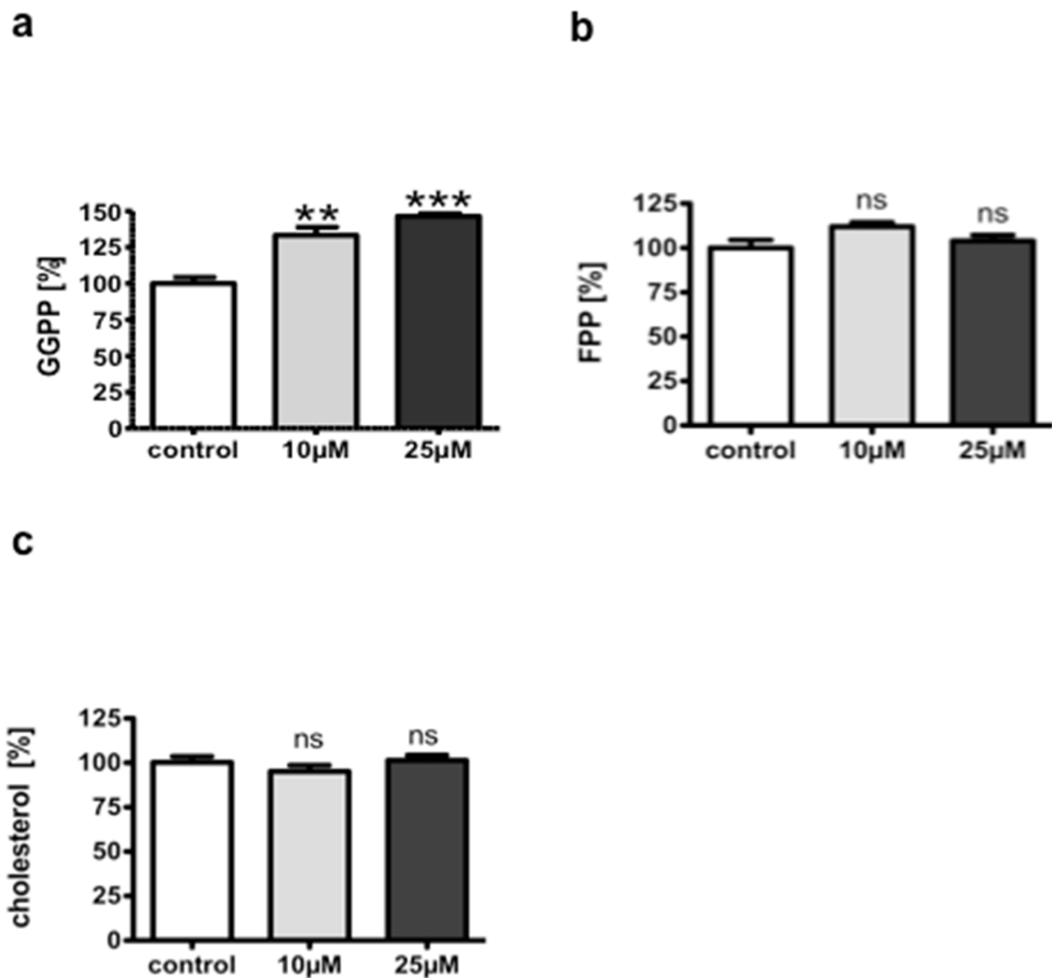


**Abbildung 19. Effekte der GGTase-I-Inhibition mittels GGTI-2133 in den humanen Neuroblastomazellen SH-SY5Y.** Die SH-SY5Y Zellen wurden mit jeweils 10 und 25  $\mu\text{mol/L}$  GGTI-2133 für 48 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent DMSO behandelt wurden, dienen als Kontrollen (control) für die Analysen mittels WesternBlot und HPLC-FD Methode. Um Aufschluss über die Funktion der beiden GDIs RhoGDI- $\alpha$  (a) und RabGDI- $\alpha$  (b) zu erhalten, wurden diese in Cytosolpräparationen der behandelten Zellen mittels WesternBlot Analyse untersucht. Die Proteingehalte der Cytosolpräparationen (RhoGDIalpha, RabGDIalpha) wurden auf GAPDH normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei den jeweiligen Graphen dargestellt. Die Gehalte des Isoprenoids GGPP (c) wurden mittels HPLC-FD Methode quantifiziert. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^{**}<0.01$ ;  $p^{***}<0.001$ ; ns=not significant),  $n=5$ .



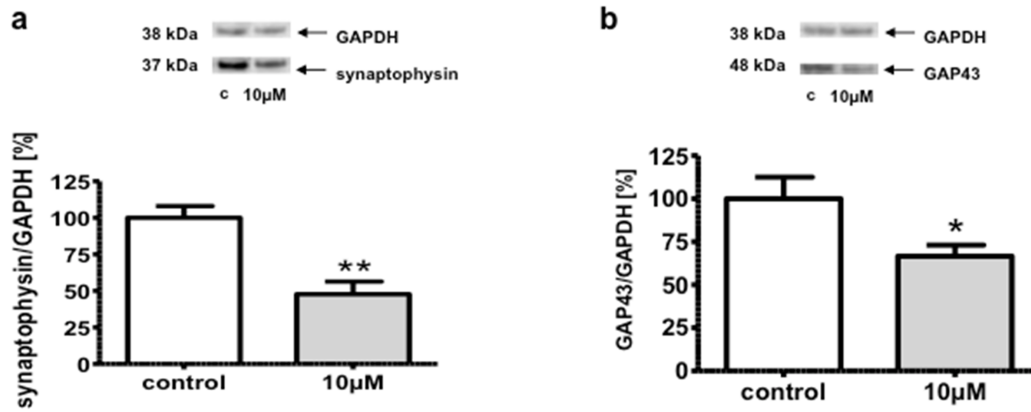
**Abbildung 20. Effekte der GGTase-I-Inhibition mittels GGTI-2133 in den humanen Neuroblastomazellen SH-SY5Y.** Die SH-SY5Y Zellen wurden mit jeweils 10 und 25  $\mu\text{mol/L}$  GGTI-2133 für 48 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent DMSO behandelt wurden, dienten als Kontrollen (control) für die Analysen mittels WesternBlot Methode. Die WesternBlot Analyse von Membranpräparationen (a), Cytosolpräparationen (b) und vom Gesamthomogenat (c) aus den mit GGTI-2133 behandelten SH-SY5Y Zellen wurde verwendet um die Prenylierung der Rab-GTPase Rab3A (a, b, c) zu charakterisieren. Die Proteingehalte des Membran-gebundenen geranylgeranylierten Rab3A (membrane Rab3A) wurden auf den Membran-Marker Flotillin-1 normiert. Die Proteingehalte der Cytosolpräparationen (cytosol Rab3A) und der Gesamthomogenate (total Rab3A) wurden auf GAPDH normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei den jeweiligen Graphen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test (ns=not significant), n=5.





**Abbildung 21. Effekte der GGTase-I-Inhibition mittels GGTI-2133 in den humanen Neuroblastomazellen SH-SY5Y.** Die SH-SY5Y Zellen wurden mit jeweils 10 und 25 µmol/L GGTI-2133 für 48 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent DMSO behandelt wurden, dienen als Kontrollen (control) für die Analysen mittels HPLC-FD Methode. Die Gehalte der Isoprenoide GGPP (a) und FPP (b) wurden mittels HPLC-FD Methode quantifiziert. Der Cholesterolgehalt (cholesterol) in den SH-SY5Y Zellen (c) wurde enzymatisch anhand der CHOD-PAP Methode ermittelt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^{**}<0.01$ ;  $p^{***}<0.001$ ; ns=not significant), n=5.

Die Behandlung der SH-SY5Y Zellen mit GGTI-2133 führte außerdem zu einer Abnahme der Proteinexpression der synaptischen Markerproteine Synaptophysin und GAP-43.



**Abbildung 22. Proteingehalte von Synaptophysin und GAP-43 in SH-SY5Y Zellen nach der Behandlung mit GGTI-2133.** Die SH-SY5Y Zellen wurden mit jeweils 10 μmol/L GGTI-2133 für 48 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent DMSO behandelt wurden, dienen als Kontrollen (control) für die Analysen mittels WesternBlot. Die WesternBlot Analyse der Gesamthomogenate aus den mit GGTI-2133 behandelten SH-SY5Y Zellen wurde durchgeführt um die synaptischen Marker Synaptophysin (a) und GAP-43 (b) zu bestimmen. Die Proteingehalte wurden auf GAPDH normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei den jeweiligen Graphen dargestellt. Mittelwert ± SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ;  $p^{**} < 0.01$ ),  $n=5$ .

Da auch die in vitro Daten der SH-SY5Y Zellen nach der Behandlung mit GGTI-2133 direkt mit der detektierten altersbedingten Abnahme der synaptischen Markerproteine im Hirngewebe der C57BL/6 Mäuse korrelieren, manifestieren diese Ergebnisse die Spekulation, dass ein Defizit der GGTase-I zu einem Verlust von Synapsen im Gehirn gealterter Mäuse führt.

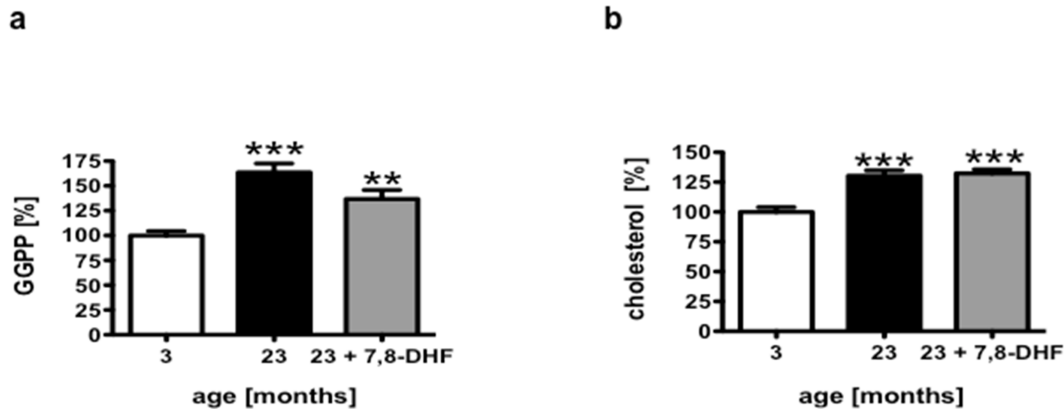
## **4.2 7,8-Dihydroxyflavon (7, 8-DHF)**

Das natürlich vorkommende 7, 8-DHF fungiert als hoch affiner selektiver TrkB-Rezeptor-Agonist und bewirkt die Dimerisierung und Autophosphorylierung des TrkB-Rezeptors und dadurch die Aktivierung nachgeschalteter Signalwege (Jang et al., 2010). Somit besitzt 7, 8-DHF die gleichen neurotrophen Eigenschaften wie BDNF. Das Flavon 7, 8-DHF überquert die Blut-Hirn-Schranke, bindet selektiv an TrkB-Rezeptoren und aktiviert diese, auch in Abwesenheit von endogenem BDNF (D. C. Choi et al., 2010; Jang et al., 2010). So vermittelt 7, 8-DHF das Überleben von Neuronen, deren Differenzierung, synaptische Plastizität und Neurogenese (Liu et al., 2010; Tsai et al., 2013; Zeng et al., 2011; Zeng, Lv, et al., 2012; Zeng, Liu, et al., 2012; Z. Zhang et al., 2014).

### **4.2.1 Pharmakologische Wirkung von 7, 8-Dihydroxyflavon in Hirngewebe junger und alter C57BL/6 Mäuse**

Analog der Untersuchung des Einflusses der Gehirnalterung auf die Gehalte von Rho- und Rab-GTPasen wurden als Tiermodell für die Untersuchung des Einflusses des 7, 8-Dihydroxyflavons auf die Gehirnalterung männliche C57BL/6 Mäuse im Alter von 3 und 23 Monaten verwendet.

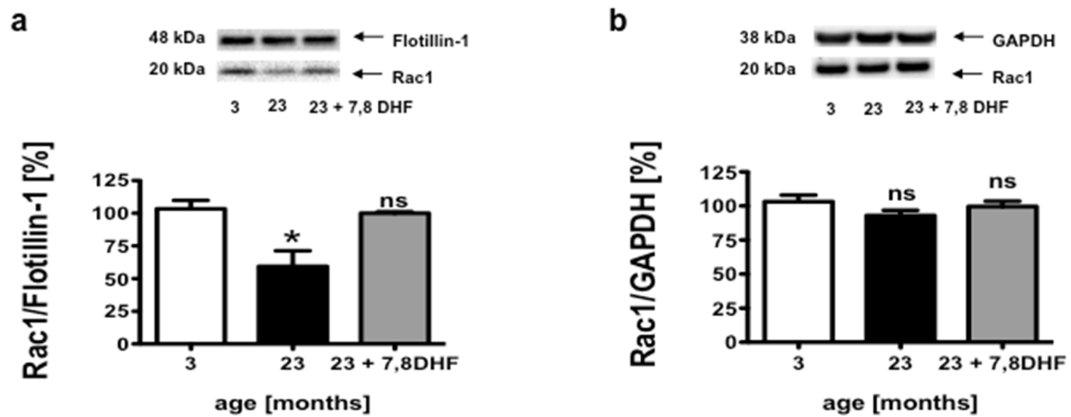
Im Vergleich zu den 3 Monate alten C57BL/6 Mäusen lagen die Gehalte an GGPP in den Hirnen der 23 Monate alten Tiere signifikant erhöht vor. Die Fütterung der C57BL/6 Mäuse mit 7, 8-Dihydroxyflavon führte in den Hirnen der gealterten Tiere zu einer Abnahme des Isoprenoids GGPP. Der Cholesteringehalt in den Hirnen der 23 Monate alten Tiere lag im Vergleich zu den Hirnen der 3 Monate alten C57BL/6 Mäuse ebenfalls signifikant erhöht vor. Jedoch bewirkte die Fütterung der gealterten Tiere mit 7, 8-Dihydroxyflavon keine Veränderung des Cholesteringehaltes in deren Gehirnen verglichen mit den 23 Monate alten Kontrolltieren.



**Abbildung 23. Einfluss von 7, 8-DHF auf GGPP und Cholesterol im Hirngewebe der C57BL/6 Mäuse.** Die Analysen des Hirngewebes junger (3 Monate alter = 3), gealterter (23 Monate alter = 23) und gealterter C57BL/6 Mäuse, die mit 7, 8-DHF gefüttert wurden, diente dazu den Effekt des 7, 8-DHFs auf die Gehirnalterung zu charakterisieren. Die Gehalte des Isoprenoids GGPP (a) wurden mittels HPLC-FD Methode quantifiziert. Die Cholesterolgehalte (cholesterol) aus dem Hirngewebe der C57BL/6 Mäuse (b) wurden enzymatisch anhand der CHOD-PAP Methode ermittelt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^{**}<0.01$ ;  $p^{***}<0.001$ ),  $n=8$ .

Die zelluläre Lokalisation der Rho-GTPase Rac1 und der Rab-GTPase Rab3A wurden untersucht, um Rückschlüsse auf die Aktivität und Funktionalität dieser Rho- und Rab-GTPasen zu erhalten. Hierfür wurden neben dem Gesamthomogenat des Hirngewebes der Versuchstiere auch Präparationen von Membran- Fraktionen analysiert.

Das Membran-gebundene prenylierte Rac1 wies eine signifikante Reduktion in Hirngewebe 23 Monate alter C57BL/6 Mäuse im Vergleich zu den 3 Monate alten Tieren auf. Zwischen dem Gehalt von Rac1 im Gesamthomogenat des Hirngewebes der 23 Monate alten und dem Gehalt der 3 Monate alten C57BL/6 Mäuse lag kein Unterschied vor. Die Fütterung der 23 Monate alten C57BL/6 Mäuse mit 7, 8-Dihydroxyflavon induzierte die Verschiebung der zellulären Lokalisation von Rac1 hin zu einer Zunahme des Proteingehaltes an prenyliertem Membran-gebundenem Rac1 auf das Niveau der Gehalte in den Hirn-Präparationen der 3 Monate alten Tiere. Der Proteingehalt an Rac1 im Gesamthomogenat der Hirne der 23 Monate alten C57BL/6 Mäuse, die mit 7, 8-Dihydroxyflavon gefüttert wurden, wies keinen Unterschied zu den 3 und 23 Monate alten Kontrolltieren auf.



**Abbildung 24. Proteingehalte der Rho-GTPase Rac1 im Hirngewebe der C57BL/6 Mäuse im Zuge der Fütterungsstudie mit 7, 8-DHF.** Die WesternBlot Analyse von Membranpräparationen (a) und vom Gesamthomogenat (b) aus Hirngewebe junger (3 Monate alter = 3), gealterter (23 Monate alter = 23) und gealterter C57BL/6 Mäuse, die mit 7, 8-DHF gefüttert wurden, wurde durchgeführt um die Prenylierung der Rho-GTPase Rac1 (a, b) zu charakterisieren. Die Proteingehalte des Membran-gebundenen geranylgeranylierten Rac1 (Rac1/Flotillin-1) wurden auf Flotillin-1 normiert und die Proteingehalte des Gesamthomogenates (Rac1/GAPDH) wurden auf GAPDH normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei den jeweiligen Graphen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ; ns=not significant),  $n=8$ .

Auch der Gehalt des im zentralen Nervensystem exprimierten Proteins Rab3A wurde in Hirnen von 3 und 23 Monate alten C57BL/6 Mäusen quantifiziert. Im Gesamthomogenat des Hirngewebes wurde zwischen den beiden Altersgruppen kein Unterschied detektiert. Die Analyse der Gehalte an Membran-gebundenem Rab3A in den Hirnen der 23 Monate alten Mäuse zeigte eine signifikante Erhöhung im Vergleich zu den 3 Monate alten Mäusehirnen. Bedingt durch die Fütterung der 23 Monate alten C57BL/6 Mäuse mit 7, 8-Dihydroxyflavon kam es im Vergleich zu den unbehandelten 23 Monate alten Tieren zu einer Reduktion des Gehaltes an membrangebundenem Rab3A in den Hirn-Präparationen. Diese Erniedrigung des membrangebundenen Rab3As erfolgte auf das Niveau der Gehalte aus den Hirnen der 3 Monate alten C57BL/6 Mäuse.

Um den zellulären Mechanismus hinter der Wirkung des 7, 8-Dihydroxyflavons näher zu beleuchten, wurden mit dem Gesamthomogenat der Versuchstier-Hirne WesternBlot Analysen der Proteine TrkB, BDNF und Tiam 1 durchgeführt.

Der full-length TrkB (145 kDa) vermittelt Signale, die das Überleben und die Differenzierung von Neuronen und die synaptische Plastizität bewirken, diese Effekte werden von den verkürzten Isoformen truncated TrkB und TrkB-Shc (95 kDa) inhibiert, indem sie mit dem full-length TrkB Heterodimere bilden (J. Wong et al., 2013). Weder der Proteingehalt des full-length TrKBs (145 kDa) noch der Proteingehalt der verkürzten Isoformen des TrKBs (95 kDa) zeigten einen

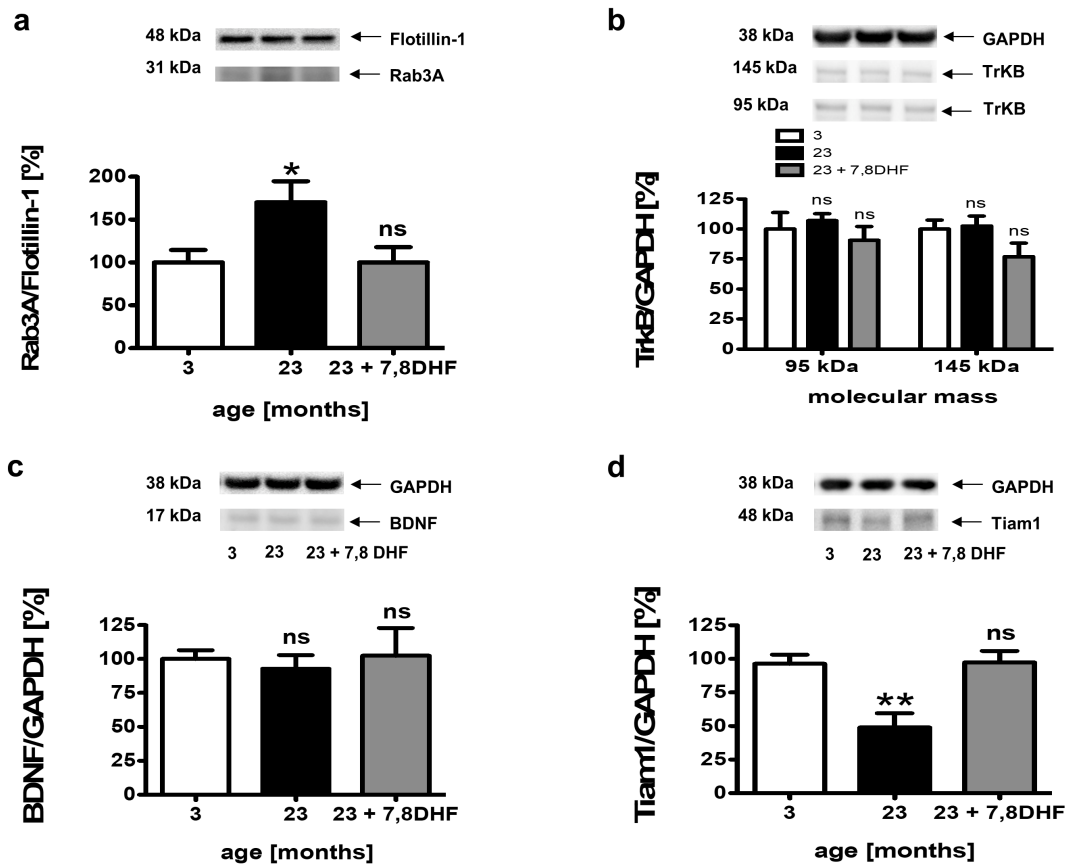
## Ergebnisse

Unterschied zwischen den Hirnen der 3 Monate alten C57BL/6 Mäuse, der 23 Monate alten Tiere und der 23 Monate alten C57BL/6 Mäuse, die mit 7, 8-Dihydroxyflavon gefüttert wurden.

BDNF reguliert durch die Aktivierung des TrkB-Rezeptors die Orientierung von Axonen, die synaptischen Funktionen, die Synaptogenese und die neuronale Differenzierung. In diesem Zusammenhang ist BDNF in der Lage über die Aktivierung des TrkB-Rezeptors verschiedene Rho-GTPasen, wie Rac1, Cdc42 und RhoA zu aktivieren. Analog der Analysen der TrkB-Proteingehalte ergab die Untersuchung des Proteingehaltes an BDNF keinen Unterschied zwischen den Hirnen der drei Versuchstiergruppen (3 Monate alte C57BL/6 Mäuse, 23 Monate alte C57BL/6 Mäuse und 23 Monate alte C57BL/6 Mäuse, die mit 7, 8-Dihydroxyflavon gefüttert wurden).

Tiam1 (T-cell lymphoma invasion and metastasis 1) ist ein Rac1-spezifischer GEF, der mit dem TrkB-Rezeptor interagiert und auf diese Weise die BDNF-induzierte Aktivierung von Rac1 vermittelt, die in der Neuordnung des Zytoskeletts und Veränderungen der zellulären Morphologie resultiert (Miyamoto et al., 2006; P. Zhou et al., 2007).

Der Proteingehalt an Tiam1 zeigte eine signifikante Reduktion in den Hirnen der 23 Monate alten C57BL/6 Mäusen verglichen mit den 3 Monate alten Tieren. Die Fütterung der 23 Monate alten C57BL/6 Mäuse mit 7, 8-Dihydroxyflavon bewirkte eine Erhöhung des Proteingehaltes an Tiam1 auf das Niveau der 3 Monate alten Tiere.



**Abbildung 25. Proteingehalte von Rab3A, TrkB, BDNF und Tiam1 im Hirngewebe der C57BL/6 Mäuse im Zuge der Fütterungsstudie mit 7, 8-DHF.** Die WesternBlot Analyse von Membranpräparationen (a) und vom Gesamthomogenat (b, c, d) aus Hirngewebe junger (3 Monate alter = 3), gealterter (23 Monate alter = 23) und gealterter C57BL/6 Mäuse, die mit 7, 8-DHF gefüttert wurden, wurde herangezogen um neben der Prenylierung der Rab-GTPase Rab3A (a) auch den Effekt des 7, 8-DHFs auf zu charakterisieren. Die Proteingehalte des Membran-gebundenen geranylgeranylierten Rab3A (Rab3A/Flotillin-1) wurden auf Flotillin-1 normiert und die Proteingehalte des Gesamthomogenates (b, c, d) wurden auf GAPDH normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei den jeweiligen Graphen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p < 0.05$ ; ns=not significant),  $n=8$ .hen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p < 0.05$ ;  $p^{**} < 0.01$ ),  $n=5$ .

Bei den Untersuchungen des Hirngewebes von C57BL/6 Mäusen konnte eine altersbedingte Veränderung der GGPP-Gehalte festgestellt werden, wobei das GGPP in Hirnen gealterter Mäuse im Vergleich zu den jungen Tieren in höheren Mengen vorlag. Die Fütterung der C57BL/6 Mäuse mit 7, 8-Dihydroxyflavon führte in den Hirnen der gealterten Tiere zu einer Abnahme des Isoprenoids GGPP. Der Cholesteringehalt in den Hirnen der 23 Monate alten Tiere lag im Vergleich zu den Hirnen der 3 Monate alten C57BL/6 Mäuse erhöht vor, jedoch bewirkte die Fütterung der gealterten Tiere mit 7, 8-Dihydroxyflavon keinen Effekt auf deren Cholesteringehalt.

Während kein Unterschied der Proteinexpression von Rac1 im Gesamthomogenat des Gehirngewebes der beiden untersuchten Altersgruppen der C57BL/6 Mäuse

festgestellt wurde, wies das Membran-gebundene prenylierte Rac1 eine altersbedingte Reduktion auf. Die Fütterung der 23 Monate alten C57BL/6 Mäuse mit 7, 8-Dihydroxyflavon zeigte zwar keine Auswirkung auf die Rac1 und Rab3A Gehalte im Gesamthomogenat des Hirngewebes, aber sie induzierte die Verschiebung der zellulären Lokalisation von Rac1 hin zu einer Zunahme des Proteingehaltes an prenyliertem Membran-gebundenem Rac1 auf das Niveau der Gehalte in den Hirn-Präparationen der 3 Monate alten Tiere. Bedingt durch die Fütterung der 23 Monate alten C57BL/6 Mäuse mit 7, 8-Dihydroxyflavon kam es im Vergleich zu den unbehandelten 23 Monate alten Tieren zu einer Reduktion des Gehaltes an membrangebundenem Rab3A in den Hirn-Präparationen. Diese Erniedrigung des membrangebundenen Rab3As erfolgte auf das Niveau der Gehalte der Gehirne der 3 Monate alten C57BL/6 Mäuse.

Die Proteingehalte des BDNFs, des full-length TrkB<sub>s</sub> (145 kDa) und auch der verkürzten Isoformen des TrkB<sub>s</sub> (95 kDa) zeigten keinen Unterschied zwischen den Hirnen der drei Versuchstiergruppen, also weder das Alter noch die Fütterung mit 7, 8-Dihydroxyflavon beeinflussten die Expression dieser Proteine.

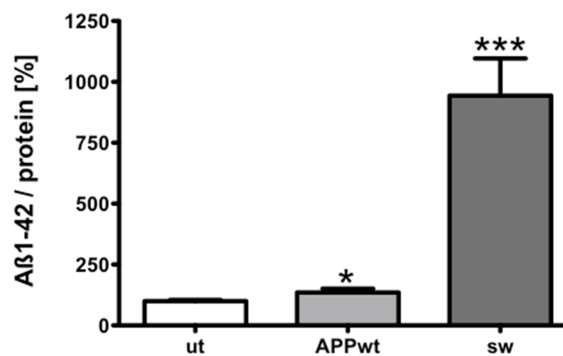
Der Proteingehalt des Tiam1 zeigte eine signifikante Reduktion in den Hirnen der 23 Monate alten C57BL/6 Mäusen verglichen mit den 3 Monate alten Tieren. Die Fütterung der 23 Monate alten C57BL/6 Mäuse mit 7, 8-Dihydroxyflavon bewirkte eine Erhöhung des Proteingehaltes an Tiam1 auf das Niveau der 3 Monate alten Tiere. Diese Untersuchungsergebnisse weisen darauf hin, dass der Rac1-spezifischer GEF Tiam1 im Alter reduziert exprimiert wird. Da Tiam1 die Entwicklung von Synapsen, das Remodeling von dendritischen Spines und das Neuritenwachstum reguliert, könnte die reduzierte Proteinexpression von Tiam1 zur negativen Beeinträchtigung dieser Funktionen im Alter beitragen. Durch die Fütterung mit 7, 8-Dihydroxyflavon konnte im Tiermodell die altersbedingte Reduktion des Tiam1 Gehaltes nivelliert werden. Die Befunde der Fütterungsstudie mit 7, 8-Dihydroxyflavon weisen darauf hin, dass die im Alter veränderte zelluläre Lokalisation von Rac1 in einem direkten Zusammenhang mit der altersbedingten Reduktion des Rac1-spezifischen GEFs Tiam1 steht. Ebenso stützen die Ergebnisse der vorliegenden Studie frühere Publikationen in welchen gezeigt wurde, dass 7, 8-DHF die gleichen neurotrophen Eigenschaften wie BDNF besitzt.



### 4.3 Morbus Alzheimer

Die beiden Sekretasen  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase sind maßgeblich bei der APP-Prozessierung beteiligt und für die Bildung des  $\beta$ -Amyloid-Peptids verantwortlich. Um den Zusammenhang zwischen der Funktion der beiden Sekretasen und der Lipidhomöostase der Isoprenoide FPP und GGPP zu untersuchen, wurden Analysen an untransfizierten und transfizierten menschlichen embryonalen Nierenzellen, den "Human Embryonic Kidney"-Zellen (HEK293) durchgeführt. Neben untransfizierten (ut) HEK293 Zellen, die als Kontroll-Zelllinie dienten, wurden die APP überexprimierenden HEK293-APP695wt (APP695-transfiziert; APP Wildtyp = APPwt) und HEK293-APPsw (APPsw-transfiziert; schwedische Mutation = sw) Zellen untersucht.

#### 4.3.1 Sekretion von $A\beta_{1-42}$ in HEK293 Zellen mit verschiedenen APP-Transfektionen

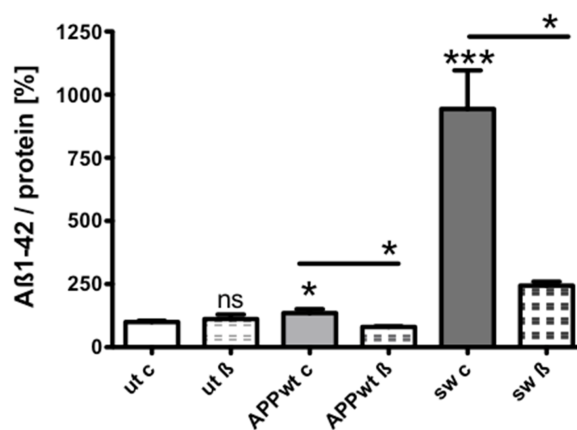


**Abbildung 26.  $A\beta_{1-42}$  Gehalte humaner embryonaler Nierenzellen HEK293 mit verschiedenen APP-Transfektionen.** Neben untransfizierten (ut) HEK-293 Zellen wurden die APP überexprimierenden HEK293-APP695wt (APP695-transfiziert; APP Wildtyp = APPwt) und HEK293-APPsw (APPsw-transfiziert; schwedische Mutation = sw) Zellen untersucht. Die  $A\beta_{1-42}$  Gehalte wurden mittels ELISA Methode quantifiziert und auf den Proteingehalt normiert. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ;  $p^{***} < 0.001$ ),  $n=4$ .

Von den beiden untersuchten APP-transfizierten HEK293-Zelllinien produzieren die HEK293-APP695wt Zellen einen signifikant geringeren  $A\beta_{1-42}$  Gehalt im Vergleich zu den HEK293-APPsw Zellen.

Um den jeweiligen Einfluss der beiden Sekretasen  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase auf die Prenylierung verschiedener GTPasen zu analysieren, wurden der  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor VI und der  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor DAPT für die nachfolgenden Untersuchungen verwendet.

#### 4.3.2 Einfluss der $\beta$ -Sekretase-Inhibition auf $A\beta_{1-42}$ in HEK293 Zellen mit verschiedenen APP-Transfektionen



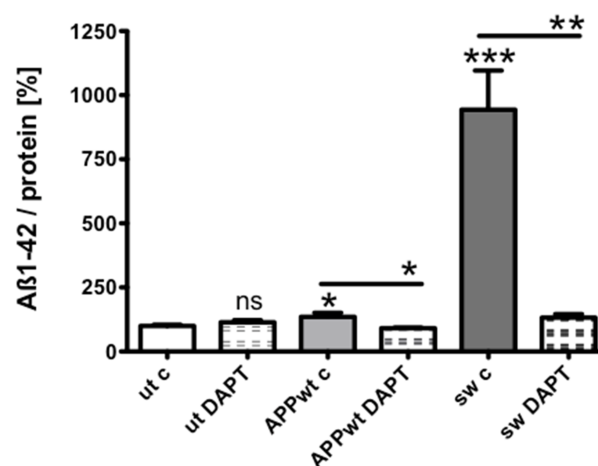
**Abbildung 27. Effekte der Beta-Sekretase-Inhibition mittels  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV auf die  $A\beta_{1-42}$  Gehalte humaner embryonaler Nierenzellen mit verschiedenen APP-Transfektionen.** Neben untransfizierten (ut) HEK-293 Zellen, die als Kontroll-Zelllinie verwendet wurden, wurden die APP überexprimierenden HEK293-APP695wt (APP695-transfiziert; APP Wildtyp = APPwt) und HEK293-APPsw (APPsw-transfiziert; schwedische Mutation = sw) Zellen untersucht. Die HEK Zellen wurden mit jeweils 1  $\mu$ mol/L  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt ( $\beta$  = mit  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV behandelte Zellen). Zellen, die mit dem Solvent DMSO behandelt wurden, dienten als Kontrollen (c = control) für die Analysen. Die  $A\beta_{1-42}$  Gehalte wurden mittels ELISA Methode quantifiziert und auf den Proteingehalt normiert. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ;  $p^{***} < 0.001$ ; ns=not significant),  $n=4$ .

Die  $A\beta_{1-42}$  Gehalte der APP695-transfizierten HEK293-APP695wt Zellen waren im Vergleich zu den untransfizierten HEK293 Zellen signifikant erhöht. Noch stärker erhöhte  $A\beta_{1-42}$  Gehalte wiesen die APPsw-transfizierten HEK293-APPsw Zellen auf. Es zeigte sich also, dass die HEK293-APPsw Zellen mehr extrazelluläres  $A\beta_{1-42}$  produzieren und sezernieren als die HEK293-APP695wt Zellen. Für die Untersuchungen stellten demnach die HEK293-APP695wt Zellen eine Zelllinie dar, welche einen nur gering erhöhten  $A\beta_{1-42}$ -Gehalt aufweist. Und die HEK293-APPsw Zellen stellten eine Zelllinie mit einem stark erhöhten  $A\beta_{1-42}$ -Gehalt dar.

Die Inhibition der  $\beta$ -Sekretase mittels 1  $\mu$ M  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV ließ sich eindeutig anhand der  $A\beta_{1-42}$  Gehalte der HEK293-APP695wt Zellen als auch bei den HEK293-APPsw Zellen nachweisen. Bei den untransfizierten HEK293 Zellen

waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit dem Solvent DMSO behandelten Kontrollen und den Zellen, die mit dem  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV behandelt wurden nachzuweisen. Jedoch bewirkte die Behandlung mit dem  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV bei den HEK293-APP695wt und den HEK293-APPsw Zellen eine signifikante Verringerung des  $A\beta_{1-42}$  Gehaltes.

#### 4.3.3 Einfluss der $\gamma$ -Sekretase-Inhibition auf $A\beta_{1-42}$ in HEK293 Zellen mit verschiedenen APP-Transfektionen



**Abbildung 28. Effekte der Gamma-Sekretase-Inhibition mittels DAPT auf die  $A\beta_{1-42}$  Gehalte humaner embryonaler Nierenzellen mit verschiedenen APP-Transfektionen.** Neben untransfizierten (ut) HEK-293 Zellen, die als Kontroll-Zelllinie verwendet wurden, wurden die APP überexprimierenden HEK293-APP695wt (APP695-transfiziert; APP Wildtyp = APPwt) und HEK293-APPsw (APPsw-transfiziert; schwedische Mutation = sw) Zellen untersucht. Die HEK Zellen wurden mit jeweils 1  $\mu$ mol/L DAPT für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt (DAPT = mit DAPT behandelte Zellen). Zellen, die mit dem Solvent DMSO behandelt wurden, dienten als Kontrollen (c = control) für die Analysen. Die  $A\beta_{1-42}$  Gehalte wurden mittels ELISA Methode quantifiziert und auf den Proteingehalt normiert. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ;  $p^{**} < 0.01$ ;  $p^{***} < 0.001$ ; ns=not significant),  $n=4$ .

Auch die Inhibition der  $\gamma$ -Sekretase mittels DAPT zeigte sich eindeutig anhand der  $A\beta_{1-42}$  Gehalte der HEK293-APP695wt und der HEK293-APPsw Zellen. Die Behandlung mit 1  $\mu$ M DAPT bewirkte eine signifikante Reduktion des  $A\beta_{1-42}$  Gehaltes der HEK293-APP695wt Zellen und auch bei den HEK293-APPsw Zellen im Vergleich zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle.

Ähnlich wie bei der Behandlung mit dem  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV zeigte sich auch durch die Behandlung mit dem  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor DAPT kein signifikanter

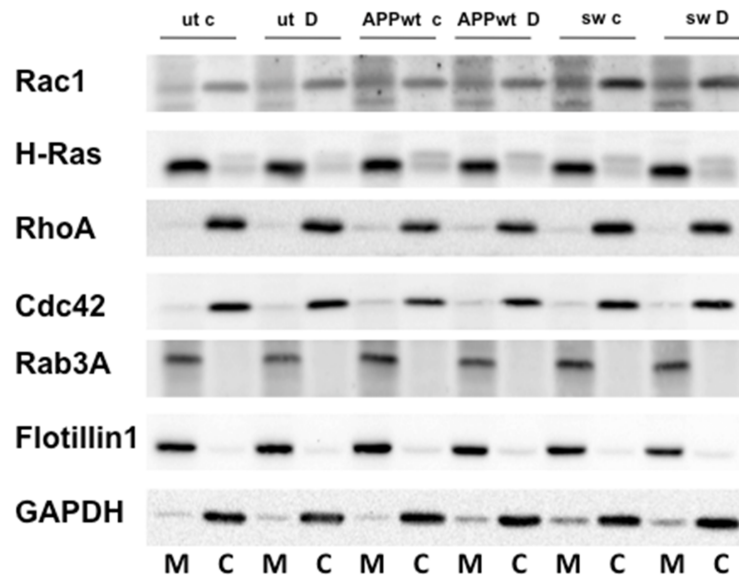
Unterschied bei den untransfizierten HEK293 Zellen zwischen den jeweiligen Kontrollen und den Inhibitor-behandelten Zellen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sowohl die Inhibition der  $\beta$ -Sekretase mittels 1  $\mu$ M  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV als auch die Inhibition der  $\gamma$ -Sekretase mittels 1  $\mu$ M DAPT eine Reduktion der  $A\beta_{1-42}$  Gehalte in den HEK293-APP695wt und den HEK293-APPsw Zellen bewirkte.

### **4.3.4 $\gamma$ -Sekretase-Inhibition mittels DAPT**

#### **4.3.4.1 Einfluss der $\gamma$ -Sekretase-Inhibition auf GTPasen in HEK293 Zellen mit verschiedenen APP-Transfektionen**

Um den Einfluss der  $\gamma$ -Sekretase auf die Lokalisation und Funktionalität verschiedener kleiner GTPasen zu untersuchen wurden Zellen mit dem  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor DAPT behandelt. Es wurden neben dem Gesamthomogenat auch Membran- und Cytosol-Präparationen von DMSO-behandelten Kontrollzellen und DAPT-behandelten Zellen generiert und mittels WesternBlot Analyse auf die jeweilige GTPase analysiert.



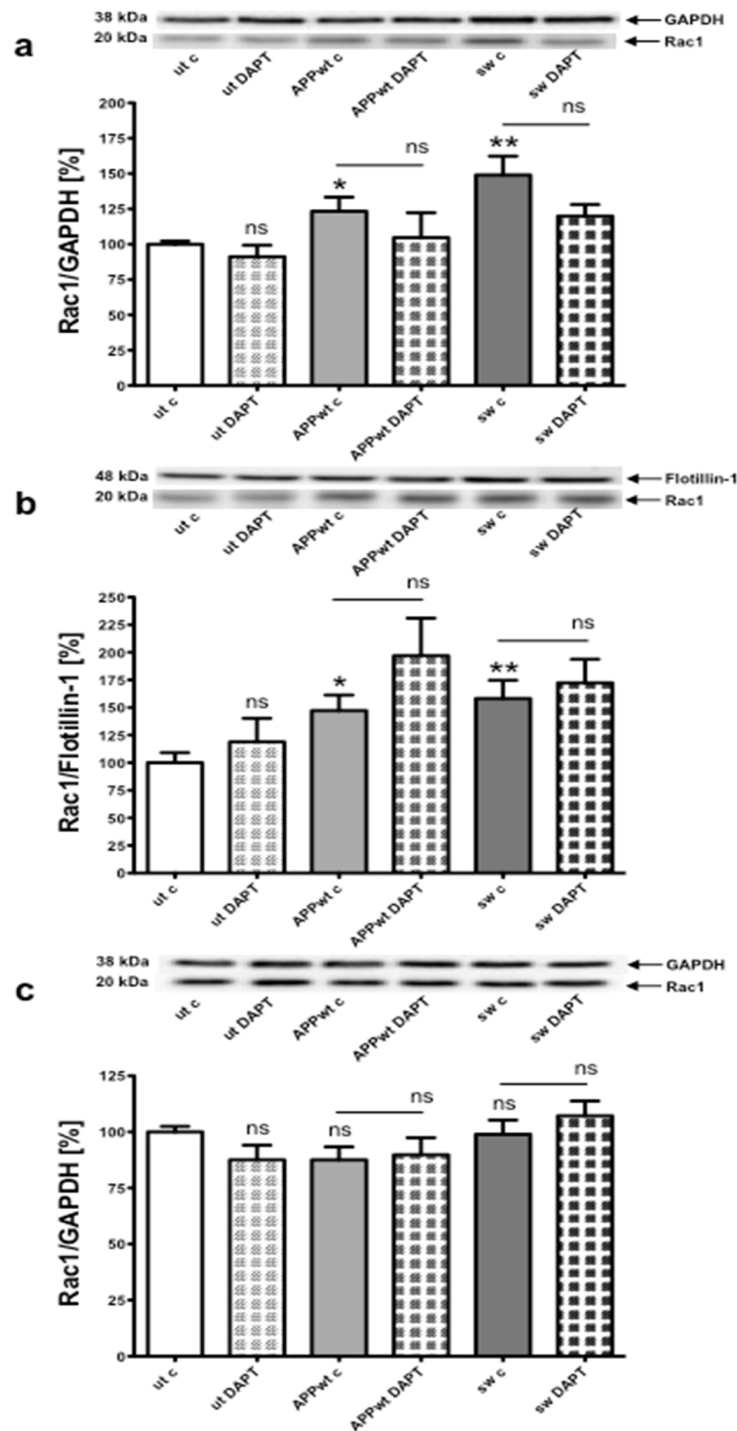
**Abbildung 29. Effekte der Gamma-Sekretase-Inhibition mittels DAPT in humanen embryonalen Nierenzellen mit verschiedenen APP-Transfektionen.** Neben untransfizierten (ut) HEK-293 Zellen, die als Kontroll-Zelllinie verwendet wurden, wurden die APP überexprimierenden HEK293-APP695wt (APP695-transfiziert; APP Wildtyp = APPwt) und HEK293-APPsw (APPsw-transfiziert; schwedische Mutation = sw) Zellen untersucht. Die HEK293 Zellen wurden mit jeweils 1  $\mu\text{mol/L}$  DAPT (D) für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent DMSO behandelt wurden, dienen als Kontrollen (c = control) für die Analysen mittels WesternBlot Methode. Die WesternBlot Analyse von Membranpräparationen (M) und von Cytosolpräparationen (C) aus den mit DAPT behandelten HEK-ut, HEK-APPwt und HEK-sw Zellen wurde verwendet um die Prenylierung der GTPasen Rac1, H-Ras, RhoA, Cdc42 und Rab3A zu charakterisieren. Die Proteingehalte der Membran-gebundenen GTPasen wurden auf den Membran-Marker Flotillin-1 normiert. Die Proteingehalte der Cytosolpräparationen wurden auf GAPDH normiert. Repräsentative Ausschnitte der WesternBlots sind in der Abbildung dargestellt um die Lokalisation der GTPasen mit und ohne DAPT-Behandlung zu verdeutlichen.

In dem Gesamthomogenat der untersuchten untransfizierten HEK293 Zellen, der HEK293-APP695wt und HEK293-APPsw Zellen zeigte sich, dass die transfizierten HEK293 Zellen im Vergleich zu den untransfizierten Zellen einen erhöhten Gehalt an Rac1 aufweisen. Der Rac1 Gehalt korreliert mit dem  $\text{A}\beta_{1-42}$  Gehalt, das heißt, dass bereits bei den HEK293-APP695wt Zellen eine signifikante Erhöhung des Gehaltes an Rac1 im Vergleich zu den untransfizierten HEK293 Zellen zu detektieren war. Die HEK293-APPsw Zellen, die verglichen mit den untransfizierten HEK293 Zellen einen stärker erhöhten  $\text{A}\beta_{1-42}$  Gehalt aufwiesen als die HEK293-APP695wt Zellen, zeigten auch eine noch stärkere Erhöhung des Rac1 Gehaltes. Durch die Behandlung mit dem  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor DAPT wurde der Rac1 Gehalt in keiner der drei untersuchten Zelllinien signifikant beeinflusst.

## Ergebnisse

Bei den untersuchten Membran-Präparationen wiesen die HEK293-APP695wt Zellen eine einfach signifikante Erhöhung des Gehaltes an Rac1 im Vergleich zu den untransfizierten HEK293 Zellen auf. Die Rac1 Gehalte der HEK293-APPsw Zellen waren im Vergleich zu den Rac1 Gehalten der untransfizierten HEK293 Zellen zweifach signifikant erhöht. Ähnlich wie in den Gesamthomogenaten der drei untersuchten Zelllinien bewirkte die Behandlung mit DAPT auch in den Membran-Fractionen der Zellen keine signifikante Veränderung der Rac1 Gehalte.

Die Rac1 Gehalte der cytosolischen Präparationen zeigten weder zwischen den einzelnen Zelllinien noch durch die Behandlung mit DAPT eine signifikante Veränderung.



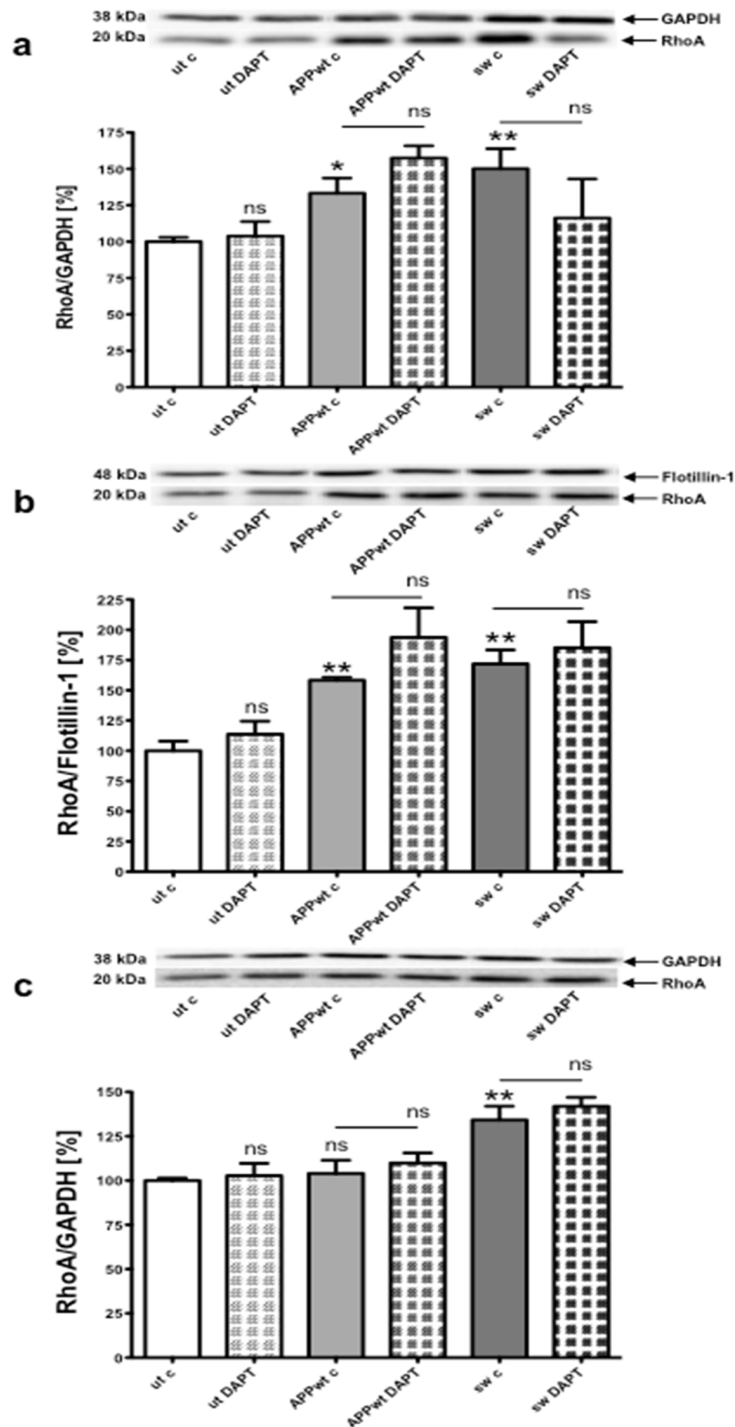
**Abbildung 30. Effekte der Gamma-Sekretase-Inhibition mittels DAPT auf die Rac1-Gehalte in humanen embryonalen Nierenzellen mit verschiedenen APP-Transfektionen.** Neben untransfizierten (ut) HEK-293 Zellen, die als Kontroll-Zelllinie verwendet wurden, wurden die APP überexprimierenden HEK293-APP695wt (APP695-transfiziert; APP Wildtyp = APPwt) und HEK293-APPsw (APPsw-transfiziert; schwedische Mutation = sw) Zellen untersucht. Die HEK Zellen wurden mit jeweils 1  $\mu\text{mol/L}$  DAPT für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent DMSO behandelt wurden, dienten als Kontrollen (c = control) für die Analysen mittels WesternBlot Methode. Die WesternBlot Analyse von Gesamthomogenat (a), Membranpräparationen (b) und von Cytosolpräparationen (c) aus den mit DAPT behandelten HEK-ut, HEK-APPwt und HEK-sw Zellen wurde verwendet um die Prenylierung der Rho-GTPase Rac1 (a, b, c) zu charakterisieren. Die Proteingehalte des Membran-gebundenen geranylgeranylierten Rac1 wurden auf den Membran-Marker Flotillin-1 normiert. Die Proteingehalte der Cytosolpräparationen und die Gesamthomogenate wurden auf GAPDH normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei den jeweiligen Graphen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p < 0.05$ ;  $p^{**} < 0.01$ ; ns=not significant),  $n=4$ .

Im Gesamthomogenat der HEK293 Zellen waren die Gehalte der Rho-GTPase RhoA in den transfizierten HEK293-APP695wt Zellen im Vergleich zu den untransfizierten HEK293 Zellen einfach signifikant erhöht. Die Gesamthomogenate der HEK293-APPsw Zellen zeigten verglichen mit den untransfizierten HEK293 Zellen eine zweifach signifikante Erhöhung des RhoA-Gehaltes. Die Behandlung mit dem  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor DAPT hatte in keiner der drei untersuchten Zelllinien einen signifikanten Einfluss auf die RhoA-Gehalte.

Sowohl die RhoA-Gehalte der Membran-Präparationen der HEK293-APP695wt Zellen als auch die der HEK293-APPsw Zellen waren im Vergleich zu den untransfizierten HEK293 Zellen zweifach signifikant erhöht. Durch die Behandlung mit DAPT zeigte sich weder bei den RhoA-Gehalten der untransfizierten HEK293 Zellen, noch bei denen der transfizierten HEK293-APP695wt und HEK293-APPsw Zellen eine signifikante Änderung.

Die RhoA-Gehalte der Cytosol-Präparationen der HEK293-APP695wt Zellen wiesen im Vergleich mit den untransfizierten HEK293 Zellen keinen Unterschied auf. Allerdings zeigte sich bei den HEK293-APPsw Zellen verglichen mit den untransfizierten HEK293 Zellen eine zweifach signifikante Erhöhung des RhoA-Gehaltes. Wie in den Gesamthomogenaten und den Membran-Präparationen hatte die Behandlung mit dem  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor DAPT in keiner der drei Zelllinien eine Auswirkung auf die RhoA-Gehalte der Cytosol-Präparationen.





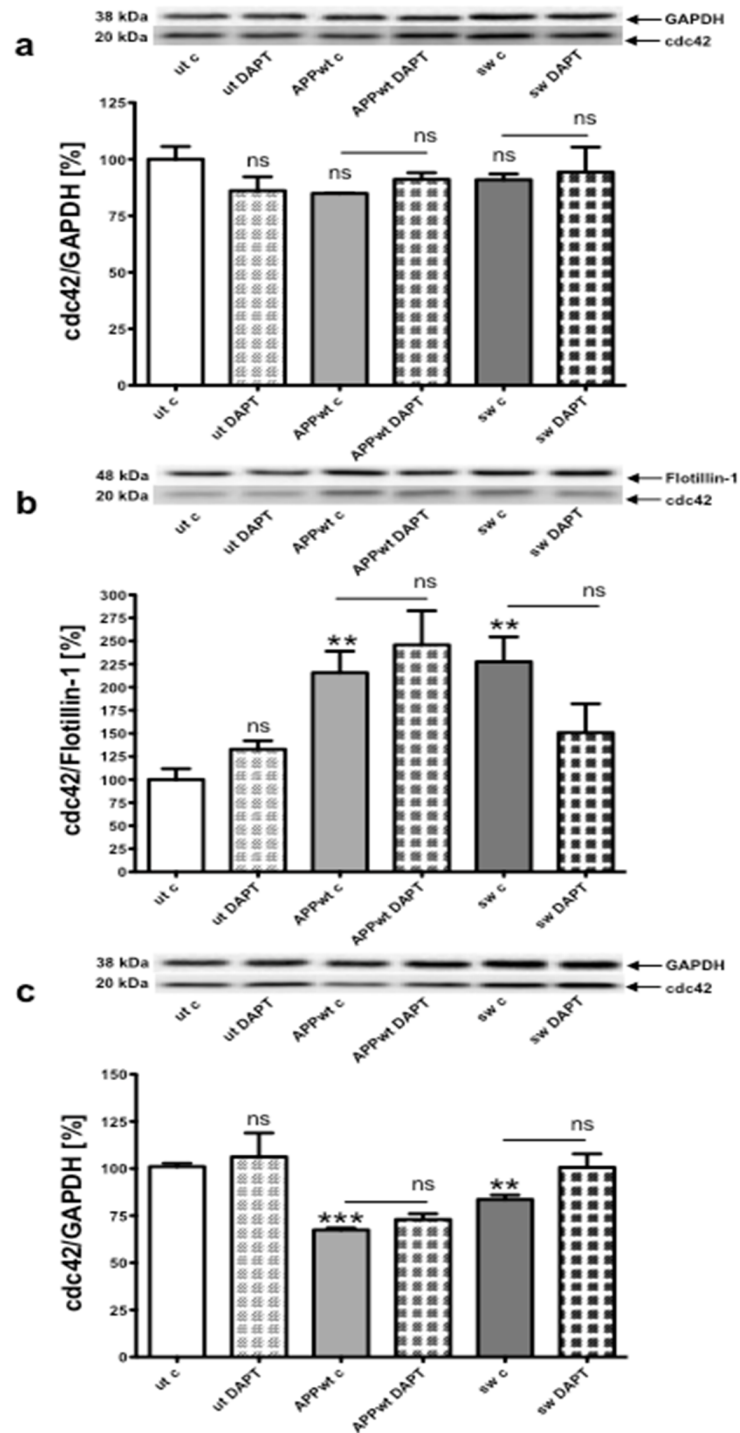
**Abbildung 31. Effekte der Gamma-Sekretase-Inhibition mittels DAPT auf die RhoA-Gehalte in humanen embryonalen Nierenzellen mit verschiedenen APP-Transfektionen.** Neben untransfizierten (ut) HEK-293 Zellen, die als Kontroll-Zelllinie verwendet wurden, wurden die APP überexprimierenden HEK293-APP695wt (APP695-transfiziert; APP Wildtyp = APPwt) und HEK293-APPsw (APPsw-transfiziert; schwedische Mutation = sw) Zellen untersucht. Die HEK Zellen wurden mit jeweils 1  $\mu\text{mol/L}$  DAPT für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent DMSO behandelt wurden, dienen als Kontrollen (c = control) für die Analysen mittels WesternBlot Methode. Die WesternBlot Analyse von Gesamthomogenat (a), Membranpräparationen (b) und von Cytosolpräparationen (c) aus den mit DAPT behandelten HEK-ut, HEK-APPwt und HEK-sw Zellen wurde verwendet um die Prenylierung der Rho-GTPase RhoA (a, b, c) zu charakterisieren. Die Proteingehalte des Membran-gebundenen geranylgeranylierten RhoA wurden auf den Membran-Marker Flotillin-1 normiert. Die Proteingehalte der Cytosolpräparationen und die Gesamthomogenate wurden auf GAPDH normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei den jeweiligen Graphen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p < 0.05$ ;  $p < 0.01$ ; ns=not significant),  $n=4$ .

## Ergebnisse

Die Gehalte der kleinen GTPase Cdc42 zeigten in den Gesamthomogenaten der HEK293 untransfiziert, HEK293-APP695wt und HEK293-APPsw Zellen keinen Unterschied zwischen den drei untersuchten Zelllinien. Durch die Behandlung mit dem  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor DAPT zeigte sich in keiner der drei Zelllinien eine Veränderung der Cdc42-Gehalte im Gesamthomogenat.

Im Vergleich zu den untransfizierten HEK293 Zellen wiesen die HEK293-APP695wt und HEK293-APPsw Zellen eine signifikante Erhöhung der Cdc42-Gehalte in den Membran-Präparationen auf. Keinerlei Einfluss hatte die Behandlung mit DAPT auf die Cdc42-Gehalte in den Membran-Präparationen der Zelllinien HEK293 untransfiziert, HEK293-APP695wt und HEK293-APPsw Zellen.

Die Cytosol-Präparationen der HEK293-APP695wt Zellen zeigten im Vergleich mit den untransfizierten HEK293 Zellen eine signifikante Reduktion des Cdc42-Gehaltes. Ebenso wiesen im Vergleich zu den untransfizierten HEK293 Zellen auch die HEK293-APPsw Zellen eine signifikante Erniedrigung des Cdc42-Gehaltes in den untersuchten cytosolischen Fraktionen auf. Die mit DAPT behandelten untransfizierten HEK293 Zellen, HEK293-APP695wt und HEK293-APPsw Zellen zeigten in den Cytosol-Präparationen keinen Unterschied der Cdc42-Gehalte im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen.

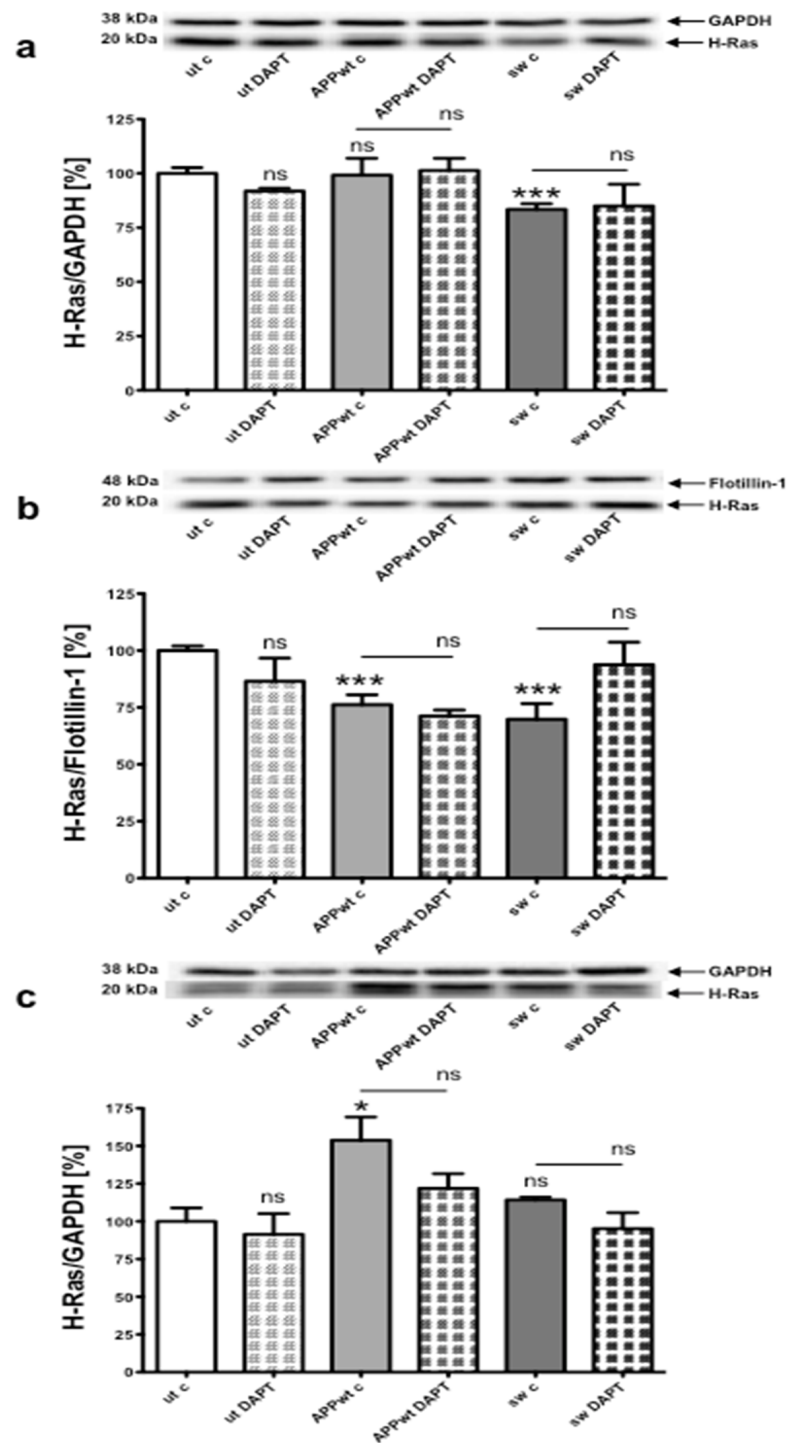


**Abbildung 32. Effekte der Gamma-Sekretase-Inhibition mittels DAPT auf die cdc42-Gehalte in humanen embryonalen Nierenzellen mit verschiedenen APP-Transfektionen.** Neben untransfizierten (ut) HEK-293 Zellen, die als Kontroll-Zelllinie verwendet wurden, wurden die APP überexprimierenden HEK293-APP695wt (APP695-transfiziert; APP Wildtyp = APPwt) und HEK293-APPsw (APPsw-transfiziert; schwedische Mutation = sw) Zellen untersucht. Die HEK Zellen wurden mit jeweils 1  $\mu\text{mol/L}$  DAPT für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent DMSO behandelt wurden, dienen als Kontrollen (c = control) für die Analysen mittels WesternBlot Methode. Die WesternBlot Analyse von Gesamthomogenat (a), Membranpräparationen (b) und von Cytosolpräparationen (c) aus den mit DAPT behandelten HEK-ut, HEK-APPwt und HEK-sw Zellen wurde verwendet um die Prenylierung der Rho-GTPase cdc42 (a, b, c) zu charakterisieren. Die Proteingehalte des Membran-gebundenen geranylgeranylierten cdc42 wurden auf den Membran-Marker Flotillin-1 normiert. Die Proteingehalte der Cytosolpräparationen und die Gesamthomogenate wurden auf GAPDH normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei den jeweiligen Graphen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^{**} < 0.01$ ;  $p^{***} < 0.001$ ; ns=not significant), n=4.

Neben den Rho-GTPasen Rac1, RhoA und Cdc42 wurden auch die Gehalte der Ras-GTPase H-Ras im Gesamthomogenat, den Membran- und Cytosol-Präparationen der untransfizierten HEK293 Zellen, HEK293-APP695wt und HEK293-APPsw Zellen untersucht. Der H-Ras-Gehalt des Gesamthomogenates der HEK293-APP695wt Zellen war im Vergleich mit den untransfizierten HEK293 Zellen nicht verändert. Bei dem Gesamthomogenat der HEK293-APPsw Zellen wurde aber ein signifikant niedriger Gehalt an H-Ras im Vergleich zu den untransfizierten HEK293 Zellen festgestellt. Die DAPT-Behandlung der Zellen hatte keine Auswirkung auf die H-Ras-Gehalte des untersuchten Gesamthomogenates der untransfizierten HEK293 Zellen, HEK293-APP695wt und HEK293-APPsw Zellen.

Vergleicht man die H-Ras-Gehalte der Membran-Präparationen der HEK293-APP695wt Zellen mit den H-Ras-Gehalten der untransfizierten HEK293 Zellen, so lagen die H-Ras-Gehalte der HEK293-APP695wt Zellen dreifach signifikant niedriger als die der untransfizierten HEK293 Zellen. Auch die H-Ras-Gehalte der Membran-Präparationen der HEK293-APPsw Zellen waren dreifach signifikant niedriger als die H-Ras-Gehalte der Membran-Präparationen der untransfizierten HEK293 Zellen. Die Inkubation der Zellen mit DAPT bewirkte keine Veränderung der H-Ras-Gehalte in den Membranfraktionen der untransfizierten HEK293 Zellen, HEK293-APP695wt und HEK293-APPsw Zellen.

Der Gehalt der Ras-GTPase H-Ras lag in den Cytosol-Präparationen der HEK293-APP695wt verglichen mit den untransfizierten HEK293 Zellen signifikant erhöht vor. Keinen signifikanten Unterschied wies der Vergleich der H-Ras-Gehalte der cytosolischen Fraktionen zwischen den untransfizierten HEK293 Zellen und den HEK293-APPsw Zellen auf. Weder bei den untransfizierten HEK293 Zellen, den HEK293-APP695wt Zellen, noch bei den HEK293-APPsw Zellen veränderte die Behandlung der Zellen mit DAPT die Gehalte des Proteins H-Ras in den Cytosol-Präparationen.



**Abbildung 33. Effekte der Gamma-Sekretase-Inhibition mittels DAPT auf die H-Ras-Gehalte in humanen embryonalen Nierenzellen mit verschiedenen APP-Transfektionen.** Neben untransfizierten (ut) HEK-293 Zellen, die als Kontroll-Zelllinie verwendet wurden, wurden die APP überexprimierenden HEK293-APP695wt (APP695-transfiziert; APP Wildtyp = APPwt) und HEK293-APPsw (APPsw-transfiziert; schwedische Mutation = sw) Zellen untersucht. Die HEK Zellen wurden mit jeweils 1  $\mu\text{mol/L}$  DAPT für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent DMSO behandelt wurden, dienten als Kontrollen (c = control) für die Analysen mittels WesternBlot Methode. Die WesternBlot Analyse von Gesamthomogenat (a), Membranpräparationen (b) und von Cytosolpräparationen (c) aus den mit DAPT behandelten HEK-ut, HEK-APPwt und HEK-sw Zellen wurde verwendet um die Prenylierung der Ras-GTPase H-Ras (a, b, c) zu charakterisieren. Die Proteingehalte des Membran-gebundenen prenylierten H-Ras wurden auf den Membran-Marker Flotillin-1 normiert. Die Proteingehalte der Cytosolpräparationen und die Gesamthomogenate wurden auf GAPDH normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei den jeweiligen Graphen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ;  $p^{***} < 0.001$ ; ns=not significant),  $n=4$ .

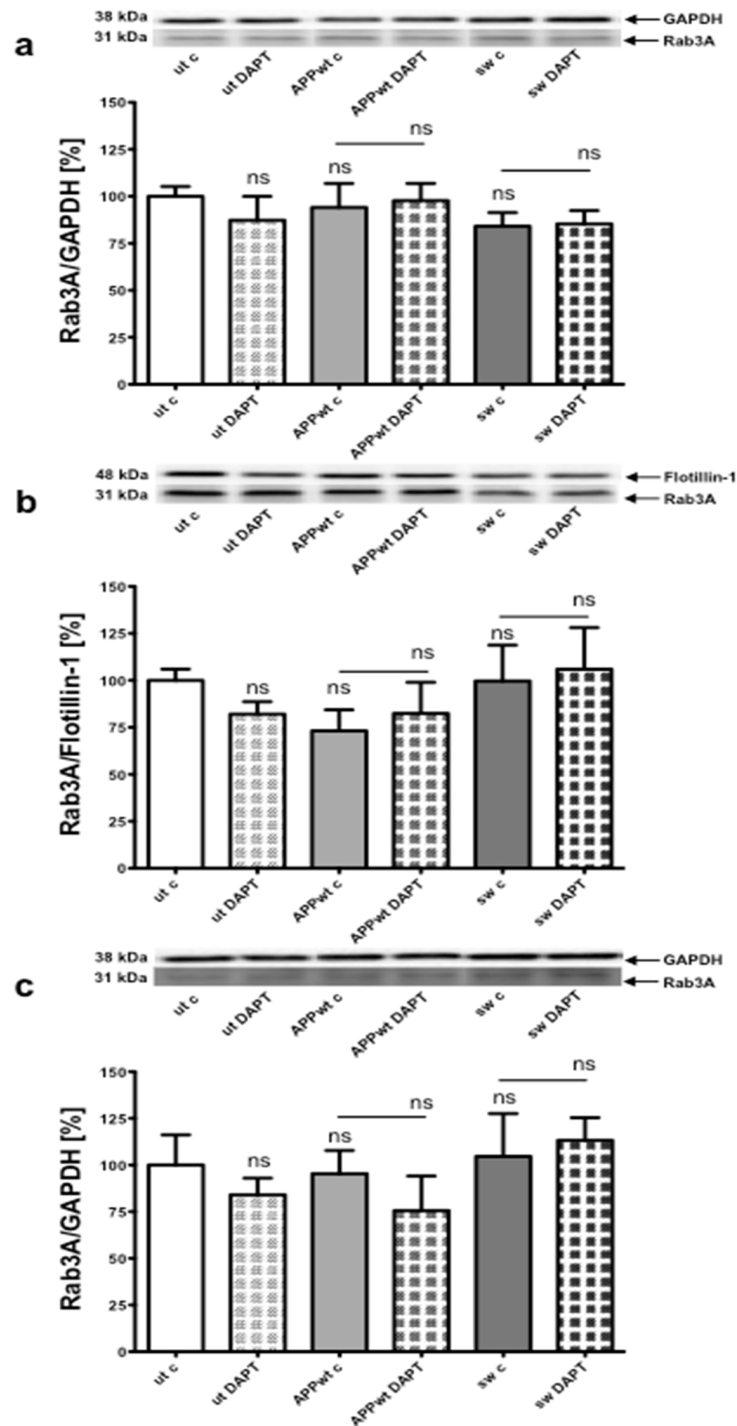
## Ergebnisse

Um weitere Aufschlüsse über den Einfluss der  $\gamma$ -Sekretase auf die Prenylierung und Lokalisation kleiner GTPasen zu erhalten, wurden untransfizierte HEK293 Zellen, HEK293-APP695wt Zellen sowie HEK293-APPsw Zellen mit dem  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor DAPT inkubiert und deren Gesamthomogenate, Membran- und Cytosol-Präparationen mittels WesternBlot Analyse auf die Rab-GTPase Rab3A untersucht.

Bei der Untersuchung der Gesamthomogenate zeigte sich zwischen den untransfizierten HEK293 Zellen, den HEK293-APP695wt Zellen und den HEK293-APPsw Zellen kein signifikanter Unterschied der Rab3A-Gehalte. Und auch durch die Inkubation mit dem  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor DAPT wurden keine signifikanten Änderungen der Rab3A-Gehalte zwischen den Kontrollen und Behandlungen bei den Gesamthomogenaten der Zellen detektiert.

Ebenso waren zwischen den Membran-Präparationen der drei untersuchten Zelllinien keinerlei Unterschiede zu erkennen. Weiterhin bewirkte die Behandlung mit DAPT keine signifikante Änderung der Rab3A-Gehalte in den Membran-Fractionen der untransfizierten HEK293 Zellen, der HEK293-APP695wt Zellen und der HEK293-APPsw Zellen.

Die Rab3A-Gehalte der Cytosol-Präparationen unterschieden sich nicht zwischen den untransfizierten HEK293 Zellen, den HEK293-APP695wt Zellen und den HEK293-APPsw Zellen. Analog der Gesamthomogenate und der Membran-Präparationen wiesen auch die Cytosol-Präparationen keine Veränderung der Rab3A-Gehalte durch die Inkubation mit dem  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor DAPT auf.



**Abbildung 34. Effekte der Gamma-Sekretase-Inhibition mittels DAPT auf die Rab3A-Gehalte in humanen embryonalen Nierenzellen mit verschiedenen APP-Transfektionen.** Neben untransfizierten (ut) HEK-293 Zellen, die als Kontroll-Zelllinie verwendet wurden, wurden die APP überexprimierenden HEK293-APP695wt (APP695-transfiziert; APP Wildtyp = APPwt) und HEK293-APPsw (APPsw-transfiziert; schwedische Mutation = sw) Zellen untersucht. Die HEK Zellen wurden mit jeweils 1  $\mu\text{mol/L}$  DAPT für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent DMSO behandelt wurden, dienen als Kontrollen (c = control) für die Analysen mittels WesternBlot Methode. Die WesternBlot Analyse von Gesamthomogenat (a), Membranpräparationen (b) und von Cytosolpräparationen (c) aus den mit DAPT behandelten HEK-ut, HEK-APPwt und HEK-sw Zellen wurde verwendet um die Prenylierung der Rab-GTPase Rab3A (a, b, c) zu charakterisieren. Die Proteingehalte des Membran-gebundenen prenylierten Rab3A wurden auf den Membran-Marker Flotillin-1 normiert. Die Proteingehalte der Cytosolpräparationen und die Gesamthomogenate wurden auf GAPDH normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei den jeweiligen Graphen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test (ns=not significant), n=4.

#### **4.3.4.2 Einfluss der $\gamma$ -Sekretase-Inhibition auf GGPP, FPP und Cholesterol in HEK293 Zellen mit verschiedenen APP-Transfektionen**

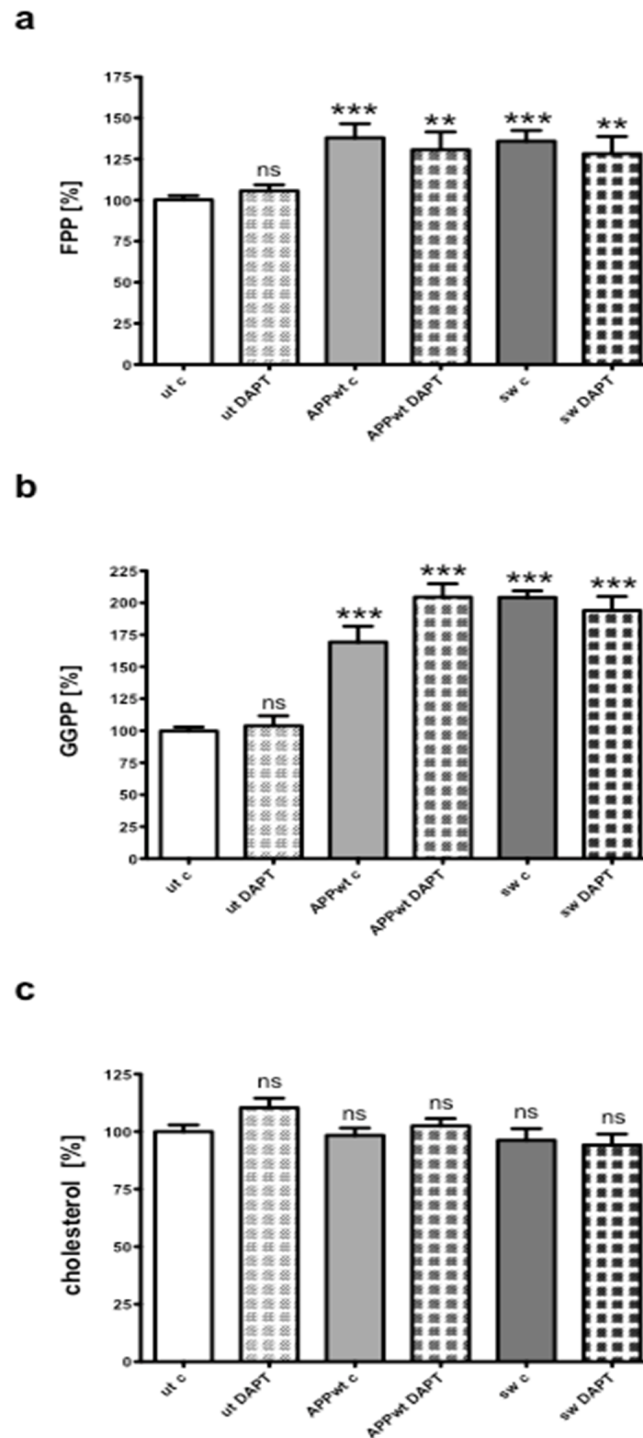
Weiterhin wurden in den untransfizierten HEK293 Zellen, den HEK293-APP695wt Zellen und den HEK293-APPsw Zellen die Gehalte der beiden Isoprenoide FPP und GGPP, sowie die Cholesterol-Gehalte untersucht.

Hierbei zeigte sich im Vergleich zu den untransfizierten HEK293 Zellen bei den HEK293-APP695wt Zellen und auch bei den HEK293-APPsw Zellen ein signifikant höherer Gehalt des Isoprenoids FPP. Dieser höhere FPP-Gehalt wurde in den HEK293-APP695wt Zellen und in den HEK293-APPsw Zellen durch die Behandlung mit dem  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor DAPT signifikant reduziert. Die Inkubation mit DAPT führte zu keiner Veränderung des FPP-Gehaltes bei den behandelten untransfizierten HEK293 Zellen im Vergleich zu den mit dem Solvent DMSO behandelten Kontrollen.

Auch die Gehalte des Isoprenoids GGPP lagen bei den beiden transfizierten Zelllinien HEK293-APP695wt Zellen und HEK293-APPsw Zellen verglichen mit den untransfizierten HEK293 Zellen signifikant höher vor. Zwischen den HEK293-APP695wt Zellen und HEK293-APPsw Zellen liegt kein signifikanter Unterschied der GGPP-Gehalte vor. Die Inkubation mit DAPT bewirkte in keiner der drei untersuchten Zelllinien eine Veränderung der GGPP-Gehalte.

Die Untersuchung der Cholesterol-Gehalte zeigte keine Unterschiede zwischen den untransfizierten HEK293 Zellen, den HEK293-APP695wt Zellen und den HEK293-APPsw Zellen. Die Inkubation mit DAPT hatte keinen Einfluss auf die Cholesterol-Gehalte in den drei Zelllinien.





**Abbildung 35. Effekte der Gamma-Sekretase-Inhibition mittels DAPT auf die Gehalte der Isoprenoide FPP und GGPP, sowie auf die Cholesterin-Gehalte in humanen embryonalen Nierenzellen mit verschiedenen APP-Transfektionen.** Neben untransfizierten (ut) HEK-293 Zellen, die als Kontroll-Zelllinie verwendet wurden, wurden die APP überexprimierenden HEK293-APP695wt (APP695-transfiziert; APP Wildtyp = APPwt) und HEK293-APPsw (APPsw-transfiziert; schwedische Mutation = sw) Zellen untersucht. Die HEK Zellen wurden mit jeweils 1  $\mu\text{mol/L}$  DAPT für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent DMSO behandelt wurden, dienen als Kontrollen (c = control) für die Analysen mittels HPLC-FD Methode. Die Gehalte der Isoprenoide FPP (a) und GGPP (b) wurden mittels HPLC-FD Methode quantifiziert. Die Cholesterolgehalte (cholesterol) aus den mit DAPT behandelten HEK-Zellen (c) wurden enzymatisch anhand der CHOD-PAP Methode ermittelt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^{**} < 0.01$ ;  $p^{***} < 0.001$ ; ns=not significant),  $n=8$ .

#### **4.3.5 Zusammenfassung: Isoprenoide und GTPasen in HEK293 Zellen mit verschiedenen APP-Transfektionen**

Bei der Untersuchung des Gesamthomogenates zeigten die HEK293-APP695wt Zellen und die HEK293-APPsw Zellen höhere Gehalte an Rac1 und RhoA im Vergleich zu den untransfizierten HEK293 Zellen. Auch bei den untersuchten Membran-Präparationen wiesen die beiden APP-transfizierten Zelllinien im Vergleich zu den untransfizierten HEK293 Zellen höhere Rac1 und RhoA Gehalte auf. Die Rac1 Gehalte der cytosolischen Präparationen zeigten zwischen den einzelnen Zelllinien keine Unterschiede. Die RhoA-Gehalte der Cytosol-Präparationen der HEK293-APP695wt Zellen wiesen im Vergleich mit den untransfizierten HEK293 Zellen keinen Unterschied auf. Allerdings zeigte sich bei den HEK293-APPsw Zellen verglichen mit den untransfizierten HEK293 Zellen höhere RhoA-Gehalte.

Die Gehalte der kleinen GTPase Cdc42 zeigten in den Gesamthomogenaten der HEK293 untransfiziert, HEK293-APP695wt und HEK293-APPsw Zellen keinen Unterschied zwischen den drei untersuchten Zelllinien. Im Vergleich zu den untransfizierten HEK293 Zellen wiesen aber die HEK293-APP695wt und die HEK293-APPsw Zellen höhere Cdc42-Gehalte in den Membran-Präparationen und niedrigere Cdc42-Gehalte in den Cytosol-Präparationen auf.

Der H-Ras-Gehalt des Gesamthomogenates der HEK293-APP695wt Zellen war im Vergleich mit den untransfizierten HEK293 Zellen nicht verändert. Bei dem Gesamthomogenat der HEK293-APPsw Zellen wurde aber ein niedrigerer Gehalt an H-Ras im Vergleich zu den untransfizierten HEK293 Zellen festgestellt. Vergleicht man die H-Ras-Gehalte der Membran-Präparationen der HEK293-APP695wt Zellen und HEK293-APPsw Zellen mit den H-Ras-Gehalten der untransfizierten Zellen, so lagen diese niedriger als die der untransfizierten HEK293 Zellen. Der Gehalt der Ras-GTPase H-Ras lag in den Cytosol-Präparationen der HEK293-APP695wt verglichen mit den untransfizierten HEK293 Zellen signifikant erhöht vor, wobei kein Unterschied zwischen den cytosolischen Fraktionen der untransfizierten HEK293 Zellen und HEK293-APPsw Zellen zu detektieren war.

Bei der Untersuchung der Rab3A-Gehalte im Gesamthomogenate, in den Membran- und Cytosol-Präparationen zeigte sich zwischen den drei untersuchten Zelllinien kein Unterschied.

Im Vergleich zu den untransfizierten HEK293 Zellen zeigten beide APP-transfizierten Zelllinien (HEK293-APP695wt Zellen und HEK293-APPsw Zellen) höhere Gehalte der Isoprenoide FPP und GGPP. Die Untersuchung der Cholesterolgehalte zeigte keine Unterschiede zwischen den untransfizierten HEK293 Zellen, den HEK293-APP695wt Zellen und den HEK293-APPsw Zellen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass beide APP-transfizierten Zelllinien im Vergleich zu den untransfizierten Zellen klare Unterschiede der Proteinexpression der untersuchten Rho- und Ras-GTPasen und auch bei den Isoprenoiden FPP und GGPP aufwiesen. Dies deutet auf eine veränderte Regulation dieser Proteine und deren Prenylierung hin, die vermutlich im Zusammenhang mit der erhöhten Sezernierung von  $A\beta_{1-42}$  stehen könnte.

**Tabelle 2: Zusammenfassung der Ergebnisse des Vergleichs der Gehalte der Proteine Rac1, RhoA, Cdc42, H-Ras und Rab3A in verschiedenen zellulären Präparationen (Gesamthomogenat, Membran- und Cytosolpräparation) und der Isoprenoide FPP und GGPP, sowie auf die Cholesterol-Gehalte in humanen embryonalen Nierenzellen mit verschiedenen APP-Transfektionen.** Neben untransfizierten HEK-293 Zellen, wurden die APP überexprimierenden HEK293-APP695wt (APP695-transfiziert; APP Wildtyp = APPwt) und HEK293-APPsw (APPsw-transfiziert; schwedische Mutation = sw) Zellen untersucht. Die Effekte beziehen sich auf den Vergleich mit den untransfizierten HEK-293 Zellen, die als Kontroll-Zellen fungierten. ↓ steht für eine Reduktion, ↑ steht für eine Erhöhung und = steht für keinen Unterschied im Vergleich zu den untransfizierten HEK-293 Zellen. Die Angaben der Effekte beziehen sich auf den Vergleich mit den untransfizierten HEK-293 Zellen.

	HEK293-APP695wt	HEK293-APPsw
Rac1 Gesamthomogenat	↑	↑
Rac1 Membranfraktion	↑	↑
Rac1 Cytosolfraktion	=	=
RhoA Gesamthomogenat	↑	↑
RhoA Membranfraktion	↑	↑
RhoA Cytosolfraktion	=	↑
Cdc42 Gesamthomogenat	=	=
Cdc42 Membranfraktion	↑	↑
Cdc42 Cytosolfraktion	↓	↓
H-Ras Gesamthomogenat	=	↓
H-Ras Membranfraktion	↓	↓
H-Ras Cytosolfraktion	↑	=
Rab3A Gesamthomogenat	=	=
Rab3A Membranfraktion	=	=
Rab3A Cytosolfraktion	=	=
FPP	↑	↑
GGPP	↑	↑
Cholesterol	=	=

#### **4.3.6 Zusammenfassung: Effekte der $\gamma$ -Sekretase-Inhibition auf Isoprenoide und GTPasen in HEK293 Zellen mit verschiedenen APP-Transfektionen**

Die Behandlung mit dem  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor DAPT führte in keiner der drei untersuchten Zelllinien im Gesamthomogenat, der Membran- und Cytosolpräparation zu einer Veränderung der Proteingehalte von Rac1, RhoA, Cdc42, H-Ras und Rab3A. Während die GGPP- und Cholesterolgehalte im Gesamthomogenat der untransfizierten HEK293 Zellen, der HEK293-APP695wt Zellen und der HEK293-APPsw Zellen durch die Behandlung mit dem  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor DAPT unbeeinflusst blieben, zeigte sich jedoch eine Reduktion der FPP-Gehalt in den HEK293-APP695wt Zellen und in den HEK293-APPsw Zellen durch die Behandlung mit DAPT. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Aktivitäten der Transferasen FTase, GGase-I und GGase-II von der Aktivität der  $\gamma$ -Sekretase unbeeinflusst sind, da die Behandlung mit dem  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor DAPT keinerlei Einfluss auf die Lokalisation und somit auch nicht auf die Prenylierung der untersuchten Rho-, Rab- und Ras-GTPasen zeigte.

**Tabelle 3: Zusammenfassung der Ergebnisse der Effekte der  $\gamma$ -Sekretase-Inhibition mittels DAPT auf die Gehalte der Proteine Rac1, RhoA, Cdc42, H-Ras und Rab3A und der Isoprenoide FPP und GGPP, sowie auf die Cholesterolgehalte in humanen embryonalen Nierenzellen mit verschiedenen APP-Transfektionen.** Neben untransfizierten (ut) HEK-293 Zellen, wurden die APP überexprimierenden HEK293-APP695wt (APP695-transfiziert; APP Wildtyp = APPwt) und HEK293-APPsw (APPsw-transfiziert; schwedische Mutation = sw) Zellen untersucht. Die HEK Zellen wurden mit jeweils 1  $\mu\text{mol/L}$   $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Die Effekte beziehen sich auf die jeweiligen Kontroll-Zellen, die mit dem Solvent DMSO behandelt wurden.  $\downarrow$  steht für eine Reduktion und = steht für keinen Effekt. Die Angaben der Effekte beziehen sich auf den Vergleich mit der jeweils gleichen unbehandelten Zelllinie.

<b>24 h Behandlung mit 1 <math>\mu\text{mol/L}</math> DAPT</b>	<b>HEK293 ut</b>	<b>HEK293- APP695wt</b>	<b>HEK293- APPsw</b>
Rac1 Gesamthomogenat	=	=	=
Rac1 Membranfraktion	=	=	=
Rac1 Cytosolfraktion	=	=	=
RhoA Gesamthomogenat	=	=	=
RhoA Membranfraktion	=	=	=
RhoA Cytosolfraktion	=	=	=
Cdc42 Gesamthomogenat	=	=	=
Cdc42 Membranfraktion	=	=	=
Cdc42 Cytosolfraktion	=	=	=
H-Ras Gesamthomogenat	=	=	=
H-Ras Membranfraktion	=	=	=
H-Ras Cytosolfraktion	=	=	=
Rab3A Gesamthomogenat	=	=	=
Rab3A Membranfraktion	=	=	=
Rab3A Cytosolfraktion	=	=	=
FPP	=	$\downarrow$	$\downarrow$
GGPP	=	=	=
Cholesterol	=	=	=

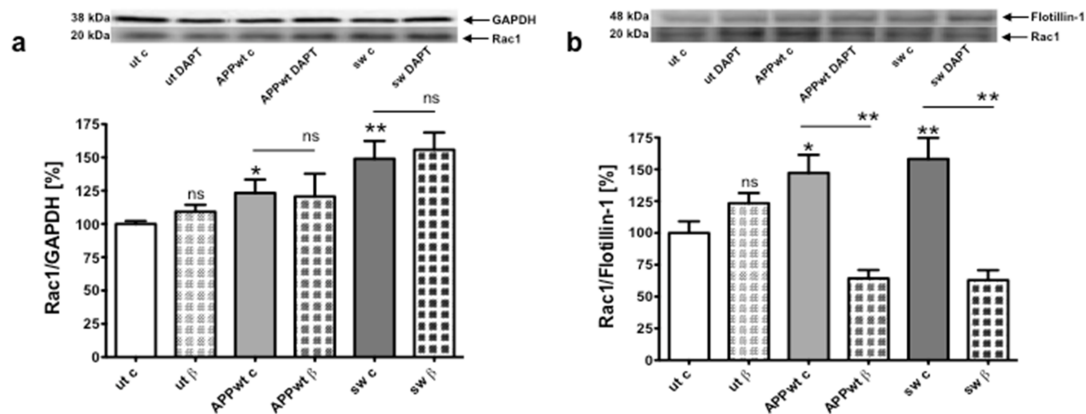
#### 4.3.7 $\beta$ -Sekretase-Inhibition mittels $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV

##### 4.3.7.1 Einfluss der $\beta$ -Sekretase-Inhibition auf GTPasen in HEK293 Zellen mit verschiedenen APP-Transfektionen

Der Einfluss der  $\beta$ -Sekretase auf die Lokalisation und Funktionalität verschiedener GTPasen wurde in untransfizierten HEK293 Zellen, in HEK293-APP695wt Zellen und in HEK293-APPsw Zellen untersucht. Hierfür wurden die Zellen mit dem  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV behandelt. Neben dem Gesamthomogenat wurden auch Membran-Präparationen von DMSO-behandelten Kontrollzellen und  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV-behandelten Zellen hergestellt und mittels WesternBlot Analyse auf die jeweilige GTPase analysiert.

Die Zelllinien wurden als erstes auf die Gehalte der Rho-GTPase Rac1 untersucht. Bei der Untersuchung der Gesamthomogenate der untransfizierten HEK293 Zellen, der HEK293-APP695wt Zellen und der HEK293-APPsw Zellen waren einfach signifikant höhere Rac1-Gehalte der HEK293-APP695wt Zellen und zweifach signifikant höhere Rac1-Gehalte der HEK293-APPsw Zellen im Vergleich mit den untransfizierten HEK293 Zellen detektierbar. Die Behandlung mit dem  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV führte zu keiner Änderung der Rac1-Gehalte in den untransfizierten HEK293 Zellen, den HEK293-APP695wt Zellen und den HEK293-APPsw Zellen.

Bei den Membran-Präparationen der Zellen zeigte sich verglichen mit den untransfizierten HEK293 Zellen ein einfach signifikant höherer Rac1-Gehalt bei den HEK293-APP695wt Zellen und ein zweifach höherer Rac1-Gehalt bei den HEK293-APPsw Zellen. Sowohl bei den Membran-Präparationen der HEK293-APP695wt Zellen als auch bei den Membran-Präparationen der HEK293-APPsw Zellen bewirkte die Behandlung mit dem  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV eine zweifach signifikante Erniedrigung der Rac1-Gehalte. Keine Auswirkung wurde bei den Membranfraktionen der untransfizierten HEK293 Zellen durch die Inkubation mit dem  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV detektiert.



**Abbildung 36. Effekte der Beta-Sekretase-Inhibition mittels  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV auf die Rac1-Gehalte in humanen embryonalen Nierenzellen mit verschiedenen APP-Transfektionen.** Neben untransfizierten (ut) HEK-293 Zellen, die als Kontroll-Zelllinie verwendet wurden, wurden die APP überexprimierenden HEK293-APP695wt (APP695-transfiziert; APP Wildtyp = APPwt) und HEK293-APPsw (APPsw-transfiziert; schwedische Mutation = sw) Zellen untersucht. Die HEK Zellen wurden mit jeweils 1  $\mu$ mol/L  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent DMSO behandelt wurden, dienten als Kontrollen (c = control) für die Analysen mittels WesternBlot Methode. Die WesternBlot Analyse von Gesamthomogenat (a) und Membranpräparationen (b) aus den mit  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV behandelten HEK-ut, HEK-APPwt und HEK-sw Zellen wurde verwendet um die Prenylierung der Rho-GTPase Rac1 (a, b) zu charakterisieren. Die Proteingehalte des Membran-gebundenen prenylierten Rac1 wurden auf den Membran-Marker Flotillin-1 normiert. Die Proteingehalte der Gesamthomogenate wurden auf GAPDH normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei den jeweiligen Graphen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ;  $p^{**} < 0.01$ ; ns=not significant), n=4.

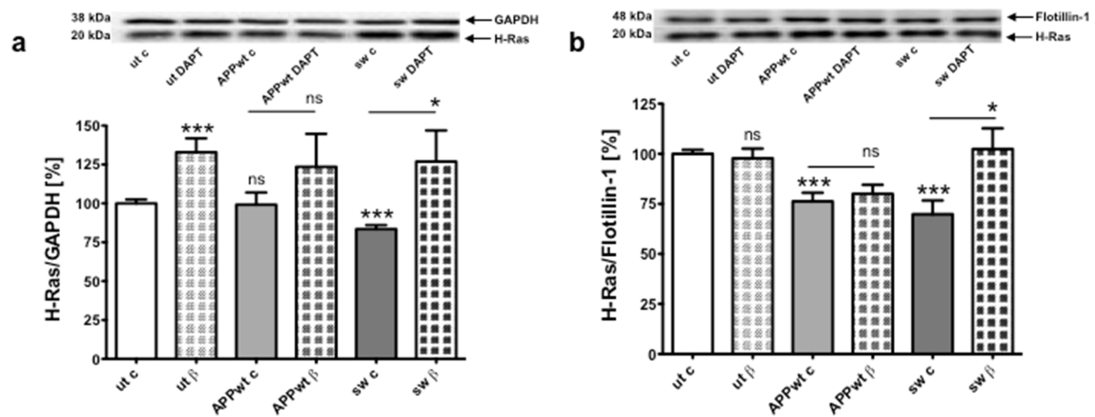
Zusätzlich zu der Untersuchung der Rho-GTPase Rac1, wurde auch der Gehalt der Ras-GTPase H-Ras analysiert. Bei der Analyse der H-Ras-Gehalte der Gesamthomogenate wurde zwischen den untransfizierten HEK293 Zellen und den HEK293-APP695wt Zellen kein signifikanter Unterschied festgestellt. Der H-Ras-Gehalt im Gesamthomogenat der HEK293-APPsw Zellen lag jedoch signifikant niedriger als der H-Ras-Gehalt im Gesamthomogenat der untransfizierten HEK293 Zellen.

Bei den untransfizierten HEK293 Zellen bewirkte die Behandlung mit dem  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV eine signifikante Erhöhung des H-Ras-Gehaltes im Gesamthomogenat der Zellen. Bei den HEK293-APP695wt Zellen hingegen hatte der  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV keinen signifikanten Einfluss auf die H-Ras-Gehalte bei der Untersuchung des Gesamthomogenates der Zellen. Und durch die Inkubation mit dem  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV erhöhte sich auch der H-Ras-Gehalt im Gesamthomogenat der HEK293-APPsw Zellen.

Der Vergleich der H-Ras-Gehalte der Membran-Präparationen der untransfizierten HEK293 Zellen zeigt signifikant niedrigere Gehalte bei den HEK293-APP695wt Zellen und auch bei den HEK293-APPsw Zellen.



Die Behandlung der Zellen mit dem  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV führte weder bei den Membran-Präparationen der untransfizierten HEK293 Zellen, noch bei den Membran-Präparationen der HEK293-APP695wt Zellen zu einer Veränderung der H-Ras-Gehalte. Aber bei den Membran-Präparationen der HEK293-APPsw Zellen wurde bedingt durch die  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV –Behandlung eine signifikante Erhöhung des H-Ras-Gehaltes ermittelt.

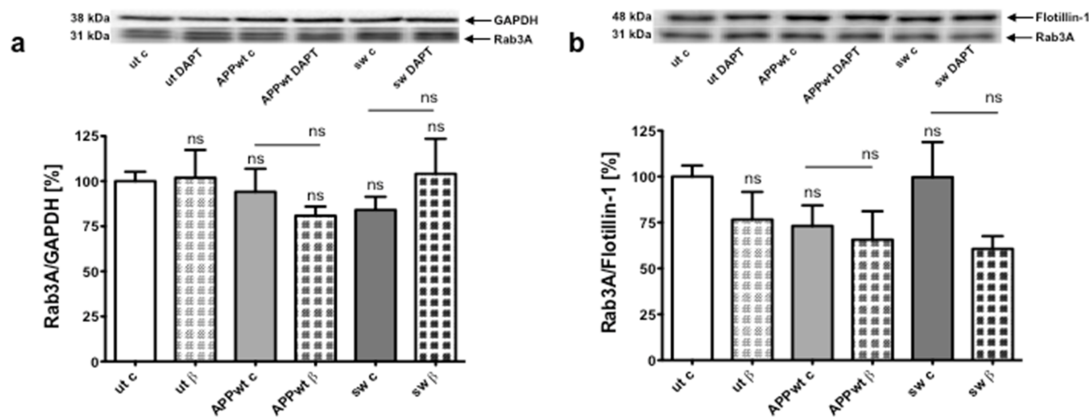


**Abbildung 37. Effekte der Beta-Sekretase-Inhibition mittels  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV auf die H-Ras-Gehalte in humanen embryonalen Nierenzellen mit verschiedenen APP-Transfektionen.** Neben untransfizierten (ut) HEK-293 Zellen, die als Kontroll-Zelllinie verwendet wurden, wurden die APP überexprimierenden HEK293-APP695wt (APP695-transfiziert; APP Wildtyp = APPwt) und HEK293-APPsw (APPsw-transfiziert; schwedische Mutation = sw) Zellen untersucht. Die HEK Zellen wurden mit jeweils 1  $\mu$ mol/L  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent DMSO behandelt wurden, dienten als Kontrollen (c = control) für die Analysen mittels WesternBlot Methode. Die WesternBlot Analyse von Gesamthomogenat (a) und Membranpräparationen (b) aus den mit  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV behandelten HEK-ut, HEK-APPwt und HEK-sw Zellen wurde verwendet um die Prenylierung der Ras-GTPase H-Ras (a, b) zu charakterisieren. Die Proteingehalte des Membran-gebundenen prenylierten H-Ras wurden auf den Membran-Marker Flotillin-1 normiert. Die Proteingehalte der Gesamthomogenate wurden auf GAPDH normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei den jeweiligen Graphen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ;  $p^{***} < 0.001$ ; ns=not significant),  $n=4$ .

Neben den Gehalten der Rho-GTPase Rac1 und der Ras-GTPase H-Ras wurde auch der Gehalt der Rab-GTPase Rab3A untersucht. Die Gesamthomogenate der untransfizierten HEK293 Zellen zeigten keinen signifikanten Unterschied des Rab3A-Gehaltes im Vergleich zu den HEK293-APP695wt Zellen und den HEK293-APPsw Zellen.

Bei der Untersuchung der untransfizierten HEK293 Zellen, der HEK293-APP695wt Zellen und der HEK293-APPsw Zellen hatte die Behandlung der Zellen mit dem  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV keine signifikante Auswirkung auf die Rab3A-Gehalte.

Auch zwischen den Membran-Präparationen der drei untersuchten Zelllinien gab es keinerlei Unterschiede der Rab3A-Gehalte. Außerdem hatte die Behandlung mit dem  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV keine signifikante Änderung der Rab3A-Gehalte in den Membran-Fractionen der untransfizierten HEK293 Zellen, der HEK293-APP695wt Zellen und der HEK293-APPsw Zellen zur Folge.



**Abbildung 38. Effekte der Beta-Sekretase-Inhibition mittels  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV iauf die Rab3A-Gehalte in humanen embryonalen Nierenzellen mit verschiedenen APP-Transfektionen.** Neben untransfizierten (ut) HEK-293 Zellen, die als Kontroll-Zelllinie verwendet wurden, wurden die APP überexprimierenden HEK293-APP695wt (APP695-transfiziert; APP Wildtyp = APPwt) und HEK293-APPsw (APPsw-transfiziert; schwedische Mutation = sw) Zellen untersucht. Die HEK Zellen wurden mit jeweils 1  $\mu$ mol/L  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent DMSO behandelt wurden, dienten als Kontrollen (c = control) für die Analysen mittels WesternBlot Methode. Die WesternBlot Analyse von Gesamthomogenat (a) und Membranpräparationen (b) aus den mit  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV behandelten HEK-ut, HEK-APPwt und HEK-sw Zellen wurde verwendet um die Prenylierung der Rab-GTPase Rab3A (a, b) zu charakterisieren. Die Proteingehalte des Membran-gebundenen prenylierten Rab3A wurden auf den Membran-Marker Flotillin-1 normiert. Die Proteingehalte der Gesamthomogenate wurden auf GAPDH normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei den jeweiligen Graphen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test (ns=not significant), n=4.

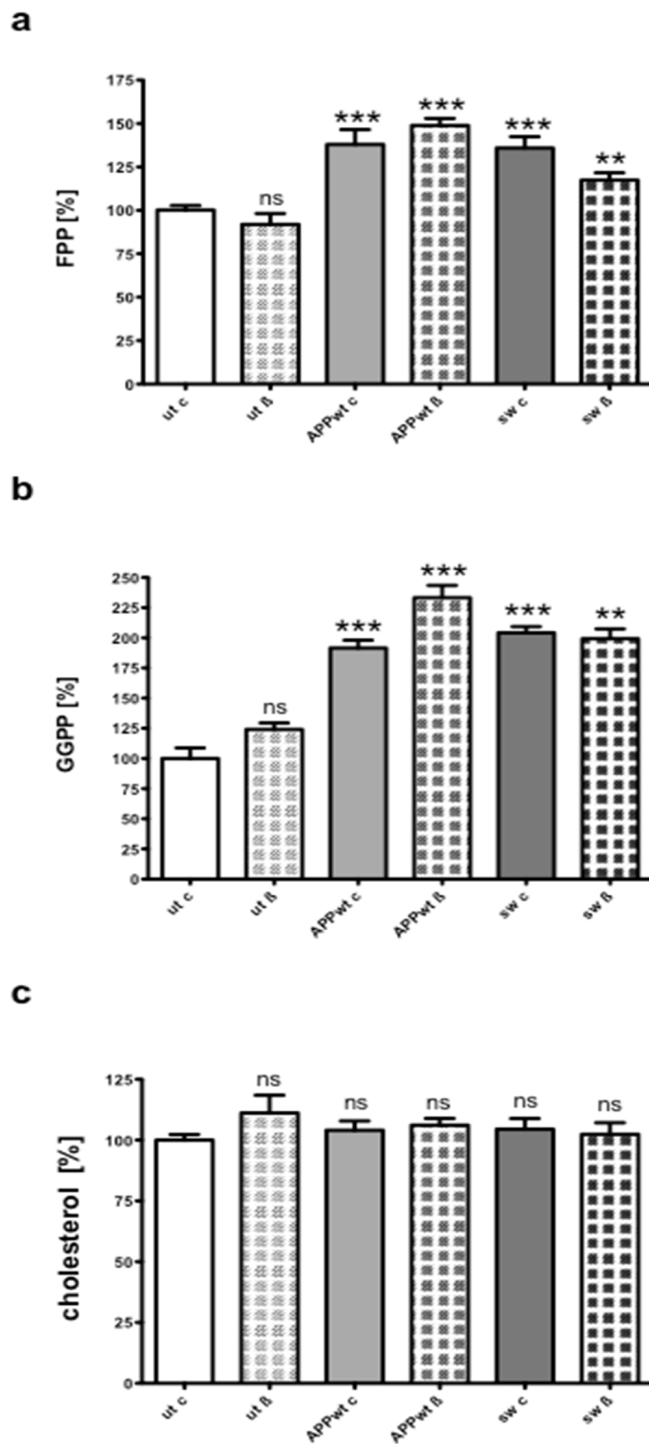
#### **4.3.7.2 Einfluss der $\beta$ -Sekretase-Inhibition auf GGPP, FPP und Cholesterol in HEK293 Zellen mit verschiedenen APP-Transfektionen**

Die Auswirkung der  $\beta$ -Sekretase-Inhibition mittels  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV auf die Gehalte der beiden Isoprenoide FPP und GGPP, sowie auf die Cholesterol-Gehalte wurde in untransfizierten HEK293 Zellen, in HEK293-APP695wt Zellen und in HEK293-APPsw Zellen untersucht.

Weder in den untransfizierten HEK293 Zellen, noch in den HEK293-APP695wt Zellen bedingte die Behandlung mit dem  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV eine signifikante Veränderung der FPP-Gehalte. In den HEK293-APPsw Zellen jedoch führte die Inhibition der  $\beta$ -Sekretase durch den  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV zu einer signifikanten Reduktion des FPP-Gehaltes.

Ähnlich verhielt es sich mit den Gehalten des Isoprenoids GGPP. Während die GGPP-Gehalte weder bei den untransfizierten HEK293 Zellen, noch bei den HEK293-APP695wt Zellen durch die  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV-Behandlung beeinflusst wurden, bewirkte die Inkubation der HEK293-APPsw Zellen mit dem  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV eine Reduktion des GGPP-Gehaltes im Vergleich mit den DMSO-behandelten Kontroll-Zellen.

Die Cholesterol-Gehalte der untransfizierten HEK293 Zellen, der HEK293-APP695wt Zellen und der HEK293-APPsw Zellen wiesen keinen Unterschied zwischen den drei Zelllinien auf. Die Inhibition der  $\beta$ -Sekretase durch den  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV hatte keine Auswirkung auf die Cholesterol-Gehalte in den untransfizierten HEK293 Zellen, den HEK293-APP695wt Zellen und den HEK293-APPsw Zellen.



**Abbildung 39. Effekte der Beta-Sekretase-Inhibition mittels  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV auf die Gehalte der Isoprenoide FPP und GGPP, sowie auf die Cholesterolgehalte in humanen embryonalen Nierenzellen mit verschiedenen APP-Transfektionen.** Neben untransfizierten (ut) HEK-293 Zellen, die als Kontroll-Zelllinie verwendet wurden, wurden die APP überexprimierenden HEK293-APP695wt (APP695-transfiziert; APP Wildtyp = APPwt) und HEK293-APPsw (APPsw-transfiziert; schwedische Mutation = sw) Zellen untersucht. Die HEK Zellen wurden mit jeweils 1  $\mu\text{mol/L}$   $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent DMSO behandelt wurden, dienen als Kontrollen (c = control) für die Analysen. Die Gehalte der Isoprenoide FPP (a) und GGPP (b) wurden mittels HPLC-FD Methode quantifiziert. Die Cholesterolgehalte (cholesterol) aus den mit  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV behandelten HEK-Zellen (c) wurden enzymatisch anhand der CHOD-PAP Methode ermittelt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^{**}<0.01$ ;  $p^{***}<0.001$ ; ns=not significant),  $n=8$ .

#### **4.3.8 Zusammenfassung: Effekte der $\beta$ -Sekretase-Inhibition auf Isoprenoide und GTPasen in HEK293 Zellen mit verschiedenen APP-Transfektionen**

Die Behandlung mit dem  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV führte in keiner der drei untersuchten Zelllinien im Gesamthomogenat zu einer Veränderung der Proteingehalte von Rac1 und Rab3A. Jedoch bewirkte die  $\beta$ -Sekretase-Inhibition mittels  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV eine Erhöhung der H-Ras Expression in HEK293-APPsw Zellen, wohingegen die beiden Zelllinien der untransfizierten HEK293 Zellen und der HEK293-APP695wt Zellen durch die Behandlung keine Unterschiede zu den Kontrollzellen aufwiesen.

In den Membranfraktionen der HEK293-APP695wt Zellen und der HEK293-APPsw Zellen wurde der Rac1 Gehalt durch die Behandlung dem  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV reduziert. Dies deutet auf eine Reduktion der Prenylierung und somit der Aktivität von Rac1 in APP-transfizierten Zellen hin. Keinen Effekt hatte die Behandlung mit dem  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV in der Membranfraktion der untransfizierten HEK293 Zellen.

Die Proteinexpression der Ras-GTPase H-Ras wurde durch die Behandlung mit dem  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV in der Membranfraktion der HEK293-APPsw Zellen erhöht. Dieser Befund weist auf eine erhöhte Prenylierung des H-Ras hin. Analog der Untersuchungsergebnisse im Gesamthomogenat, wiesen die beiden Zelllinien der untransfizierten HEK293 Zellen und der HEK293-APP695wt Zellen auch in den Membranfraktionen durch die Behandlung keine Unterschiede zu den Kontrollzellen auf. Da die Erhöhung von H-Ras durch die Behandlung mit dem  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV lediglich in den HEK293 Zellen mit der schwedischen Mutation (HEK293-APPsw) aufgetreten ist, scheint es sich um einen spezifischen Effekt zu handeln, der im Zusammenhang mit dem höheren endogenen  $A\beta_{1-42}$  Gehalt in den APP-transfizierten HEK293-APPsw Zellen stehen könnte.

Der GGPP- und FPP-Gehalt der HEK293-APPsw Zellen wurde durch die Behandlung mit dem  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV reduziert, jedoch zeigte sich kein Effekt auf die Gehalte dieser beiden Isoprenoide durch die Inhibitor-Behandlung in den untransfizierten HEK293 Zellen und der HEK293-APP695wt Zellen. Da die beiden Isoprenoide FPP und GGPP durch die Inhibition der  $\beta$ -Sekretase in den APP-transfizierten HEK293-APPsw Zellen reduziert wurden, könnten die erhöhten Gehalte des Membran-gebundenen prenylierten H-Ras auf eine erhöhte Aktivität der FTase hindeuten.

## Ergebnisse

Der Cholesterolgehalt im Gesamthomogenat der untransfizierten HEK293 Zellen, der HEK293-APP695wt Zellen und der HEK293-APPsw Zellen blieb durch die Behandlung mit dem  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV unbeeinflusst.

**Tabelle 4: Zusammenfassung der Ergebnisse der Effekte der Beta-Sekretase-Inhibition mittels  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV auf die Gehalte der Proteine Rac1, H-Ras und Rab3A und der Isoprenoide FPP und GGPP, sowie auf die Cholesterolgehalte in humanen embryonalen Nierenzellen mit verschiedenen APP-Transfektionen.** Neben untransfizierten (ut) HEK-293 Zellen, wurden die APP überexprimierenden HEK293-APP695wt (APP695-transfiziert; APP Wildtyp = APPwt) und HEK293-APPsw (APPsw-transfiziert; schwedische Mutation = sw) Zellen untersucht. Die HEK Zellen wurden mit jeweils 1  $\mu\text{mol/L}$   $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Die Effekte beziehen sich auf die jeweiligen Kontroll-Zellen, die mit dem Solvent DMSO behandelt wurden. ↓ steht für eine Reduktion, ↑ steht für eine Erhöhung und = steht für keinen Effekt.

<b>24 h Behandlung mit 1 <math>\mu\text{mol/L}</math> <math>\beta</math>-Sekretase-Inhibitor IV</b>	<b>HEK293 ut</b>	<b>HEK293-APP695wt</b>	<b>HEK293-APPsw</b>
Rac1 Gesamthomogenat	=	=	=
Rac1 Membranfraktion	=	↓	↓
H-Ras Gesamthomogenat	=	=	↑
H-Ras Membranfraktion	=	=	↑
Rab3A Gesamthomogenat	=	=	=
Rab3A Membranfraktion	=	=	=
FPP	=	=	↓
GGPP	=	=	↓
Cholesterol	=	=	=

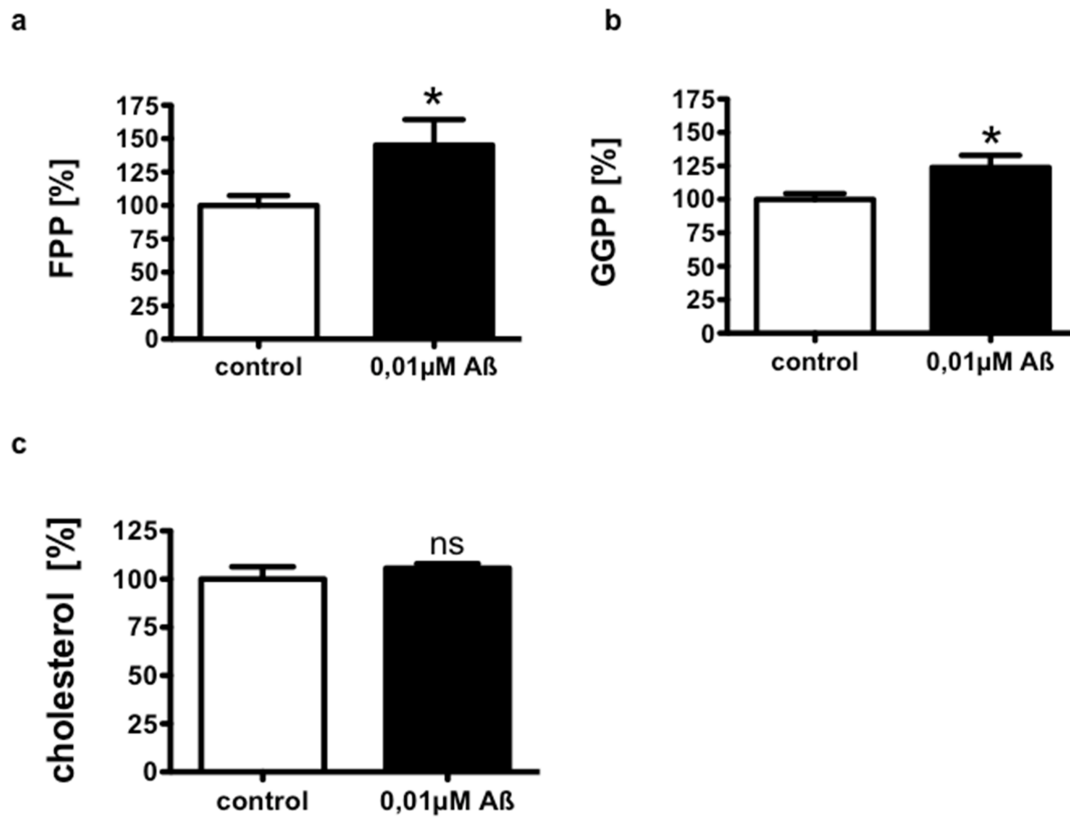
#### 4.3.9 Effekte von oligomerisiertem A $\beta$ auf GGPP, FPP und Cholesterol in untransfizierten HEK293 Zellen

Bei der amyloidogenen APP-Prozessierung spaltet zuerst die  $\beta$ -Sekretase das APP an seiner Ektodomäne, wobei ein N-terminales sekretiertes sAPP $\beta$  Fragment und ein membranständig C-terminales C99 Fragment entstehen. Bei der anschließenden heterogenen Spaltung des C99 durch die  $\gamma$ -Sekretase entstehen extrazelluläre A $\beta$ -Peptide verschiedener Länge und eine im Cytoplasma lokalisierte „APP intracellular domain“ (AICD).

Der Einfluss von oligomerisiertem A $\beta$  auf die Isoprenoide FPP und GGPP, sowie auf die Cholesterol-Gehalte wurde in untransfizierten HEK293 Zellen untersucht. Hierfür wurden die untransfizierten Zellen für 24 Stunden mit physiologischen Konzentrationen an exogenem oligomerisiertem A $\beta$  inkubiert, um anschließend die Effekte zu analysieren.

Im Vergleich zu den mit dem Solvent DMSO behandelten Kontroll-Zellen führte die Inkubation der untransfizierten HEK293 Zellen mit exogenem oligomerisiertem A $\beta$  zu einem signifikant höheren FPP-Gehalt. Auch der GGPP-Gehalt in den HEK293 Zellen erhöhte sich signifikant durch die Behandlung mit exogenem oligomerisiertem A $\beta$  in den untersuchten untransfizierten HEK293 Zellen. Die Behandlung mit exogenem oligomerisiertem A $\beta$  hatte jedoch in den untransfizierten HEK293 Zellen keine Änderung des Cholesterol-Gehaltes zur Folge.

Die Untersuchungsergebnisse der in vitro Studie mit exogenem oligomerisiertem A $\beta$  zeigen mit der Erhöhung der Isoprenoide FPP und GGPP die gleichen Effekte wie die Untersuchung der HEK293 Zellen, bei welchen beide APP-transfizierten Zelllinien (HEK293-APP695wt und HEK293-APPsw Zellen) höhere FPP- und GGPP-Gehalte aufwiesen. Dies bestätigt die Annahme, dass ein Zusammenhang zwischen der Regulation der Isoprenoide FPP und GGPP und A $\beta$  besteht.



**Abbildung 40. Effekte von oligomerisiertem Aβ in humanen embryonalen Nierenzellen.** Für die Untersuchungen wurden untransfizierten (ut) HEK-293 Zellen verwendet. Die HEK-293 Zellen wurden mit jeweils 0.01 µmol/L oligomerisiertem Aβ für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent DMSO behandelt wurden, dienten als Kontrollen (c = control) für die Analysen. Die Gehalte der Isoprenoide FPP (a) und GGPP (b) wurden mittels HPLC-FD Methode quantifiziert. Die Cholesterolgehalte (cholesterol) aus den mit oligomerisiertem Aβ behandelten HEK-293 Zellen (c) wurden enzymatisch anhand der CHOD-PAP Methode ermittelt. Mittelwert ± SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ; ns=not significant), n=8.



#### 4.4 Glioblastom (Glioblastoma multiforme)

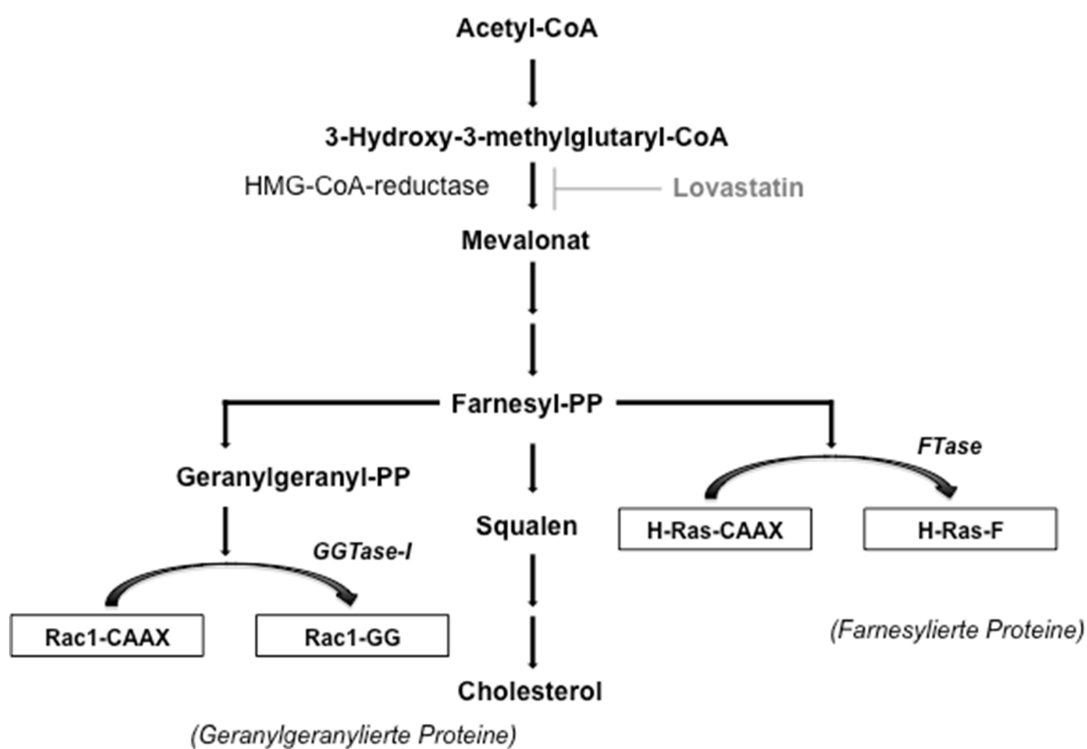
Auch für die Pathogenese der Glioblastoma multiforme spielen kleine G-Proteine und ihre Prenylierung eine wichtige Rolle. Prenylierte Ras- und Rho-Proteine aktivieren direkt nachgeschaltete Effektoren und üben dadurch einen deutlichen Einfluss auf die Onkogenese und Tumorbilogie aus. Veränderungen der Ras/Rho-vermittelten Signaltransduktion, wie dem Ras-Raf-MEK-ERK Signalweg haben sich als zentraler Schritt in der molekularen Pathogenese der Glioblastoma multiforme (GBM) herausgestellt (End, 1999; Grzmil & Hemmings, 2010; Lo, 2010b). Die Farnesyltransferase (FTase) katalysiert die Farnesylierung der Ras-GTPase H-Ras, und die GGTase-I katalysiert die Geranylgeranylierung der Rho-GTPase Rac1. Diese post-translationale Prenylierung ermöglicht den kleinen GTPasen die Insertion in zelluläre Membranen. Diese Lokalisation ist wiederum für die transformierende Aktivität der kleinen GTPasen notwendig, mit weitreichenden Folgen für die Weiterleitung von Signalen, die das Wachstum, die Differenzierung und Apoptose der Zellen bewirken (Alexander & Friedl, 2012; Eric K Rowinsky & Patnaik, 2000; X. Zhou et al., 2013).

Ein Präkursor der beiden Isoprenoide FPP und GGPP im Cholesterinbiosyntheseweg ist das Mevalonat, dessen Bildung von der Enzymaktivität der 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA)-Reduktase abhängt. Die HMG-CoA-Reduktase ist das Geschwindigkeits-bestimmende Enzym des Cholesterinbiosyntheseweges. Statine sind Inhibitoren der HMG-CoA-Reduktase, sie inhibieren die Proliferation und Migration von Gliomazellen und induzieren deren Apoptose in vitro und in vivo (Bababeygy et al., 2009; H. Wu et al., 2009). Lovastatin hemmt das Wachstum humaner GBM Zellen und induziert deren Apoptose (Chan et al., 2008; Jones et al., 1994). Langzeitstudien mit den Statinen Simvastatin und Lovastatin zeigten eine inverse Assoziation zwischen der Intensität der Statin-Behandlung und dem Glioma-Risiko (Ferris, McCoy, Neugut, Wrensch, & Lai, 2012; Gaist et al., 2013). Eine direkte Wirkung der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren ist deren Fähigkeit die Gehalte der Isoprenoide zu senken.

Eine weitere vielversprechende Substanz ist der Perillylalkohol (POH), ein in der Natur vorkommendes Monoterpen, das in der Lage ist die FTase und die GGTase-I zu inhibieren (End, 1999; Ren et al., 1997; Unlu et al., 2000). In einer klinischen Studie der Phase I/II mit rezidivierenden GBM Patienten verlängerte die Behandlung mit POH die Lebenserwartung der Patienten um mehrere Monate (Clovis O da Fonseca et al., 2011; Clovis O DA Fonseca et al., 2013; Clovis

Orlando da Fonseca, Linden, et al., 2008). Es ist jedoch nicht geklärt, dass eine Hemmung der FTase oder der GTPase der klinischen Wirkung zugrunde liegt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Einflüsse von Lovastatin und POH auf die Isoprenoidgehalte und die Prenylierung der kleinen GTPasen H-Ras und Rac1 getestet um ihre Beteiligung über die Inhibition des Ras-Raf-MEK-ERK Signalweges auf onkogene Funktionen zu untersuchen. Für die Analysen wurden die beiden GBM Zelllinien U87 und U343 herangezogen.



**Abbildung 41. Verkürzter Mevalonat-/Isoprenoid-/Cholesterol-Biosyntheseweg.** Der Mevalonatweg ist ein entscheidender Stoffwechselprozess in eukaryotischen Zellen. Hierbei stellt das Mevalonat den Präkursor verschiedener Intermediate wie dem Farnesylpyrophosphat (FPP), dem Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) und dem Cholesterol dar. Der Geschwindigkeitsbestimmende Schritt dieses Biosyntheseweges ist die synthese von Mevalonat und wird katalysiert durch die HMG-CoA-Reduktase. Statine, wie beispielsweise Lovastatin, sind HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren und in der Lage diesen Geschwindigkeitsbestimmende Schritt zu inhibieren. GGPP ist das Substrat der posttranslationalen Geranylgeranylierung kleiner Rho-GTPasen, die durch die GGTase-I katalysiert wird. Die FTase farnesyliert die Ras-GTPasen mit dem FPP-Rest. Diese posttranslationalen Modifikationen der kleinen GTPasen sind kritisch für ihre Lokalisation an Membranen und somit für die optimale Funktion.

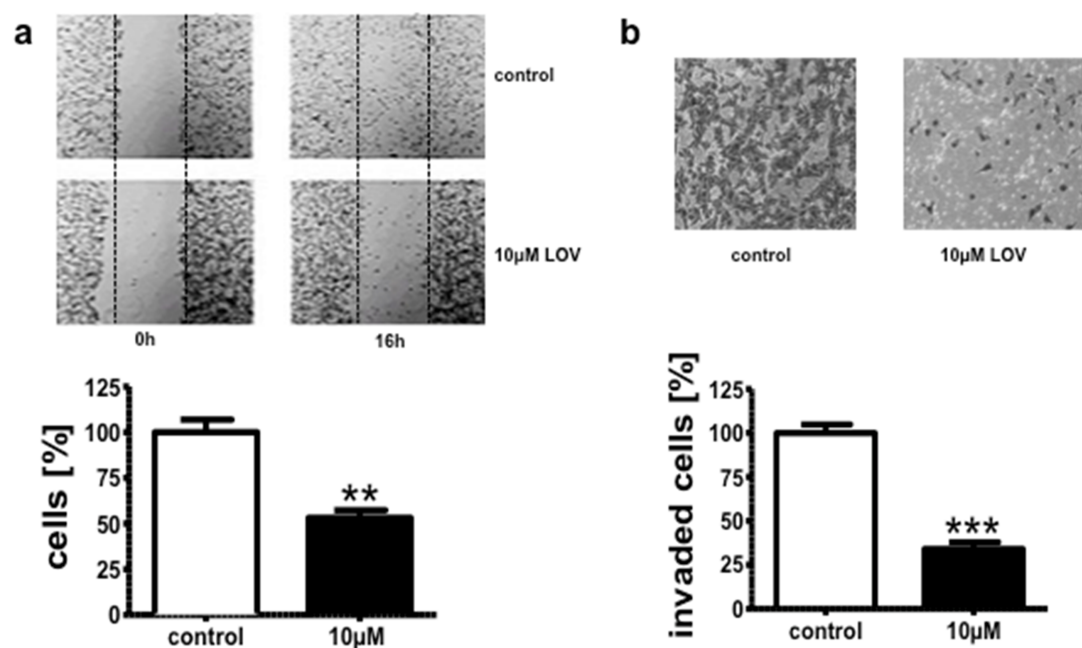
Zahlreiche Publikationen zeigen eine große Bandbreite der verwendeten Konzentrationen von Perillylalkohol in vitro (Tabelle 5). Hierbei ist anzumerken, dass zahlreiche in vitro Versuche mit sehr hohen Konzentrationen von Perillylalkohol durchgeführt wurden, die in diesem Maße in vivo wohl niemals zu erreichen sind. Aus diesem Grund wurde im Vergleich zu den bereits existierenden Publikationen für die Versuche der vorliegenden Arbeit eine eher niedrigere Konzentration von 250  $\mu$ M Perillylalkohol gewählt.

**Tabelle 5: Publierte in vitro Effekte von Perillylalkohol (POH) im Hinblick auf die verwendeten Konzentrationen.**

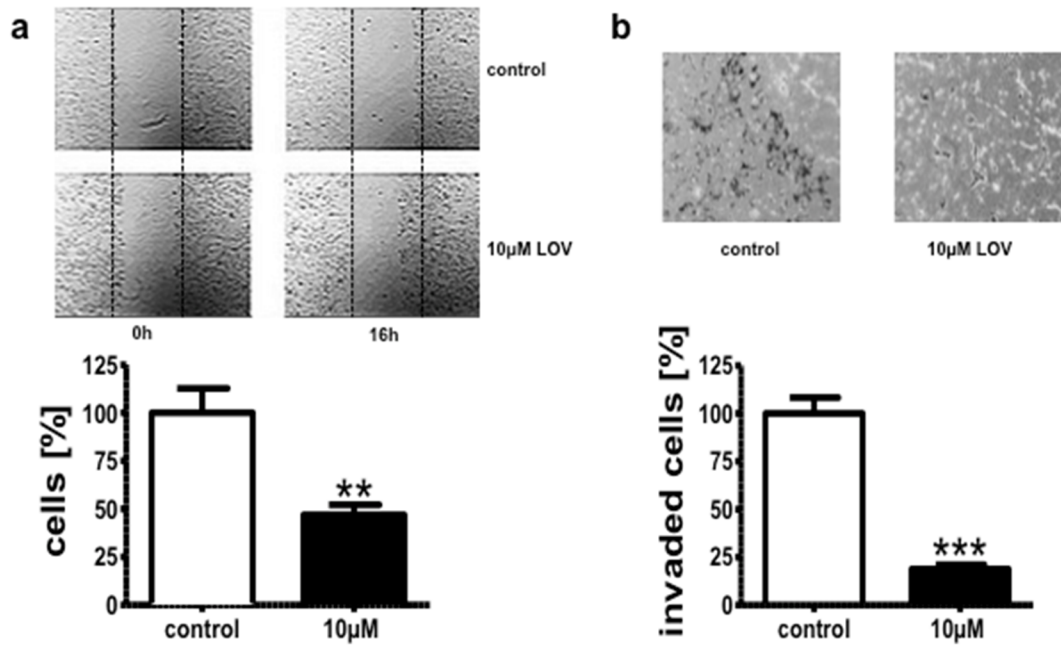
Konzentration POH	Effekt in vitro
1 $\mu\text{M}$	Perillylalkohol unterdrückt die Antigen-induzierte Immunantwort in der Lunge (Imamura et al., 2014).
60 $\mu\text{M}$	Expressionsmuster chemo-resistenter Proteine in Glioblastoma-Zellen A172 nach Behandlung mit Perillylalkohol (de Saldanha da Gama Fischer et al., 2011).
100 -1000 $\mu\text{M}$	Perillylalkohol sensibilisiert maligne Glioma für radio- und Chemotherapie (Rajesh, Stenzel, & Howard, 2003).
250-750 $\mu\text{M}$	Effekte von Perillylalkohol auf Metabolite des p21 in humanen Tumor-Zelllinien (Hudes et al., 2000).
250 -800 $\mu\text{M}$	Der Arrest des Zellzyklus durch POH, Geraniol and farnesol ist vermittelt durch p21 (Cip1) und p27 (Kip1) in humanen pankreatischen Adenocarcinoma Zellen (Wiseman, Werner, & Crowell, 2007).
250 -2500 $\mu\text{M}$	In vitro Induktion von Apoptose in U937 Zellen durch POH und Sensibilisierung durch Pentoxifyllin: Erhöhte BCL-2 und BAX Proteinexpression (Gómez-Contreras et al., 2006).
250 -5000 $\mu\text{M}$	POH wirkt als Na/K-ATPase-Inhibitor (D. G. Garcia et al., 2010).
300 – 700 $\mu\text{M}$	POH inhibiert Calcium-abhängig den NF-kappaB Siganlweg (Berchtold, Chen, Miyamoto, & Gould, 2005).
400 $\mu\text{M}$	Spaltung des hTERT–mTOR–RAPTOR Proteinkomplexes durch POH und Rapamycin (Sundin, Peffley, & Hentosh, 2013).
400 $\mu\text{M}$	POH inhibiert die Telomerase-Aktivität in Prostata-Krebszellen (Sundin, Peffley, Gauthier, & Hentosh, 2012).
500 $\mu\text{M}$	POH inhibiert das wachstum von humanen Brust-Krebszellen in vitro und in vivo (Yuri et al., 2004).
600 -1500 $\mu\text{M}$	Behandlung von Temozolomid-resistenten Glioma mit POH (Cho et al., 2012).
1000 $\mu\text{M}$	R-(+)-POH induziert veränderungen des Zellzyklus, ein verändertes Aktinzytoskelett und verringert Ras- und p34 (Cdc42)-Expression in Kolon-Adenocarcinoma SW480-Zellen (Cerdeira, Wilkinson, Thorgeirsdottir, & Broitman, 1999).
1000 -2000 $\mu\text{M}$	POH induziert Apoptose in humanen GBM Zellen (Fernandes et al., 2005).
1200 $\mu\text{M}$	POH und Perillylsäure induzieren Zellzyklusarrest und Apoptose in Lungen-Krebszellen (Yeruva, Pierre, Elegbede, Wang, & Carper, 2007).
1800 $\mu\text{M}$	Proteomic Überblick von A172 Glioblastoma Zellen, die mit POH behandelt wurden (Fischer et al., 2010).

#### 4.4.1 Einfluss von Lovastatin und Perillylalkohol auf die Migration und Invasion von GBM-Zellen

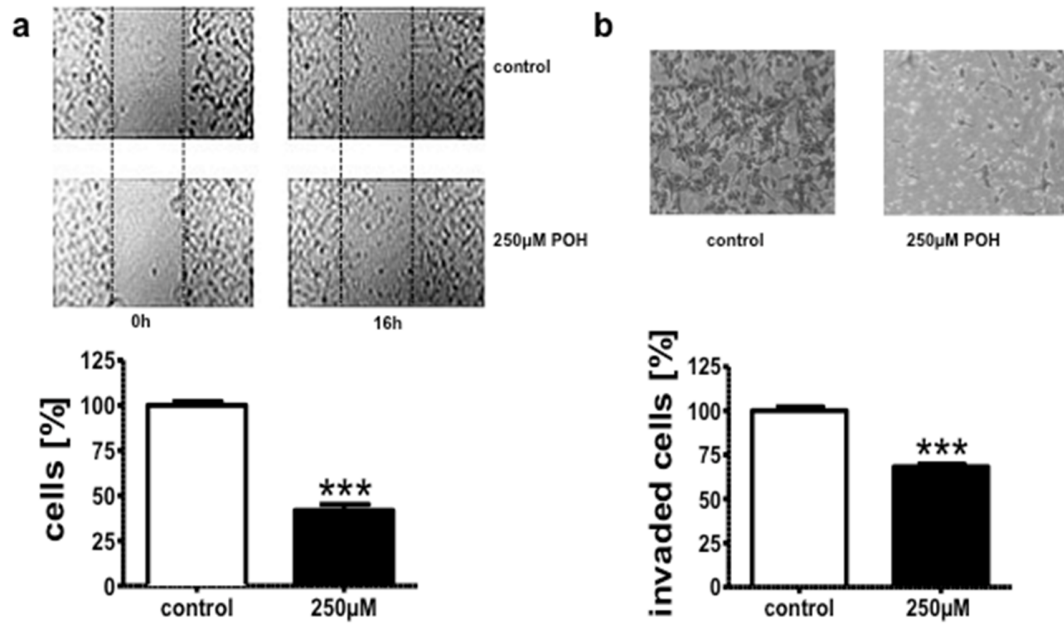
Um die Effekte von Lovastatin und POH auf die Prozesse der Tumormigration, Invasion und Proliferation zu untersuchen, wurden die beiden humanen GBM Zelllinien U87 und U343 als Zellmodell für die in vitro Versuche herangezogen. Die Zellen wurden jeweils mit 10  $\mu\text{M}$  Lovastatin oder 250  $\mu\text{M}$  Perillylalkohol behandelt. Sowohl Lovastatin als auch Perillylalkohol bewirkten eine Reduktion der Migration und der Invasion in U87 und in U343 Zellen.



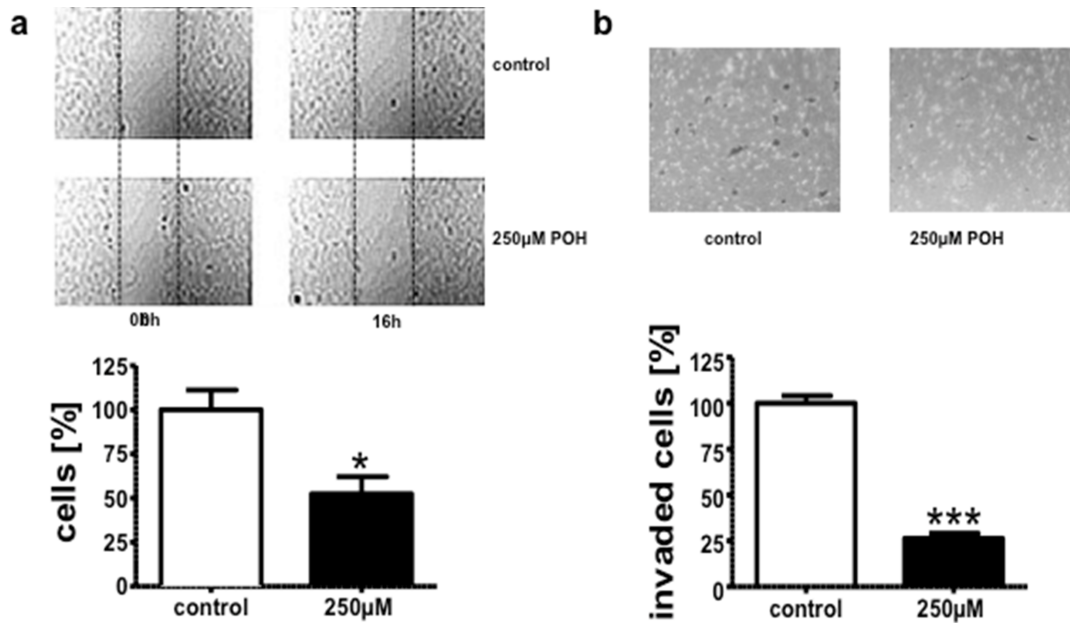
**Abbildung 42. Migration und Invasion der U87 Zellen nach der Behandlung mit Lovastatin (LOV).** Die U87 Zellen (a und b) wurden mit jeweils 10  $\mu\text{mol/L}$  LOV für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent Ethanol behandelt wurden, dienten als Kontrollen (control) für den Migrations- und Invasions-Assay. Der Scratch Assay (cells) wurde nach 8 Stunden der Behandlung durchgeführt um die Zellmigration der U87 Zellen (a) zu analysieren. Die Bilder wurden einmal direkt vor und 16 Stunden nach dem Scratch aufgenommen. Der Invasions-Assay (invaded cells) der U87 Zellen (b) wurde mittels eines modifizierten Boyden Chamber Assays durchgeführt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^{**}<0.01$ ;  $p^{***}<0.001$ ),  $n=4$ .



**Abbildung 43. Migration und Invasion der U343 Zellen nach der Behandlung mit Lovastatin (LOV).** Die U343 Zellen (a und b) wurden mit jeweils 10 µmol/L LOV für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent Ethanol behandelt wurden, dienten als Kontrollen (control) für den Migrations- und Invasions-Assay. Der Scratch Assay (cells) wurde nach 8 Stunden der Behandlung durchgeführt um die Zellmigration der U343 Zellen (a) zu analysieren. Die Bilder wurden einmal direkt vor und 16 Stunden nach dem Scratch aufgenommen. Der Invasions-Assay (invaded cells) der U343 Zellen (b) wurde mittels eines modifizierten Boyden Chamber Assays durchgeführt. Mittelwert ± SEM, ungepaarter t-Test (p\*\*<0.01; p\*\*\*<0.001), n=4.



**Abbildung 44. Migration und Invasion der U87 Zellen nach der Behandlung mit Perillylalkohol (POH).** Die U87 Zellen (a und b) wurden mit jeweils 250 µmol/L POH für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent Ethanol behandelt wurden, dienten als Kontrollen (control) für den Migrations- und Invasions-Assay. Der Scratch Assay (cells) wurde nach 8 Stunden der Behandlung durchgeführt um die Zellmigration der U87 Zellen (a) zu analysieren. Die Bilder wurden einmal direkt vor und 16 Stunden nach dem Scratch aufgenommen. Der Invasions-Assay (invaded cells) der U87 Zellen (b) wurde mittels eines modifizierten Boyden Chamber Assays durchgeführt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^{***}<0.001$ ),  $n=4$ .

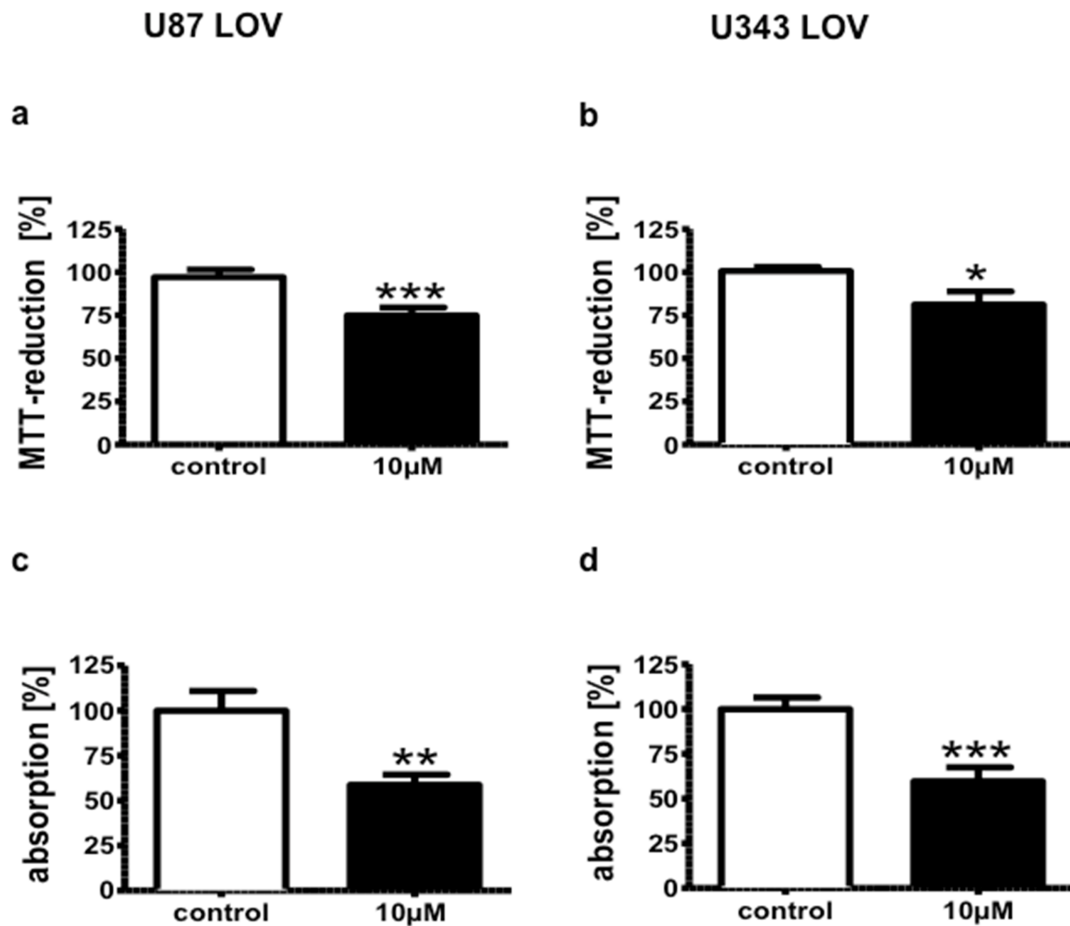


**Abbildung 45. Migration und Invasion der U343 Zellen nach der Behandlung mit Perillylalkohol (POH).** Die U343 Zellen (a und b) wurden mit jeweils 250 µmol/L POH für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent Ethanol behandelt wurden, dienten als Kontrollen (control) für den Migrations- und Invasions-Assay. Der Scratch Assay (cells) wurde nach 8 Stunden der Behandlung durchgeführt um die Zellmigration der U343 Zellen (a) zu analysieren. Die Bilder wurden einmal direkt vor und 16 Stunden nach dem Scratch aufgenommen. Der Invasions-Assay (invaded cells) der U343 Zellen (b) wurde mittels eines modifizierten Boyden Chamber Assays durchgeführt. Mittelwert ± SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ;  $p^{***} < 0.001$ ),  $n=4$ .

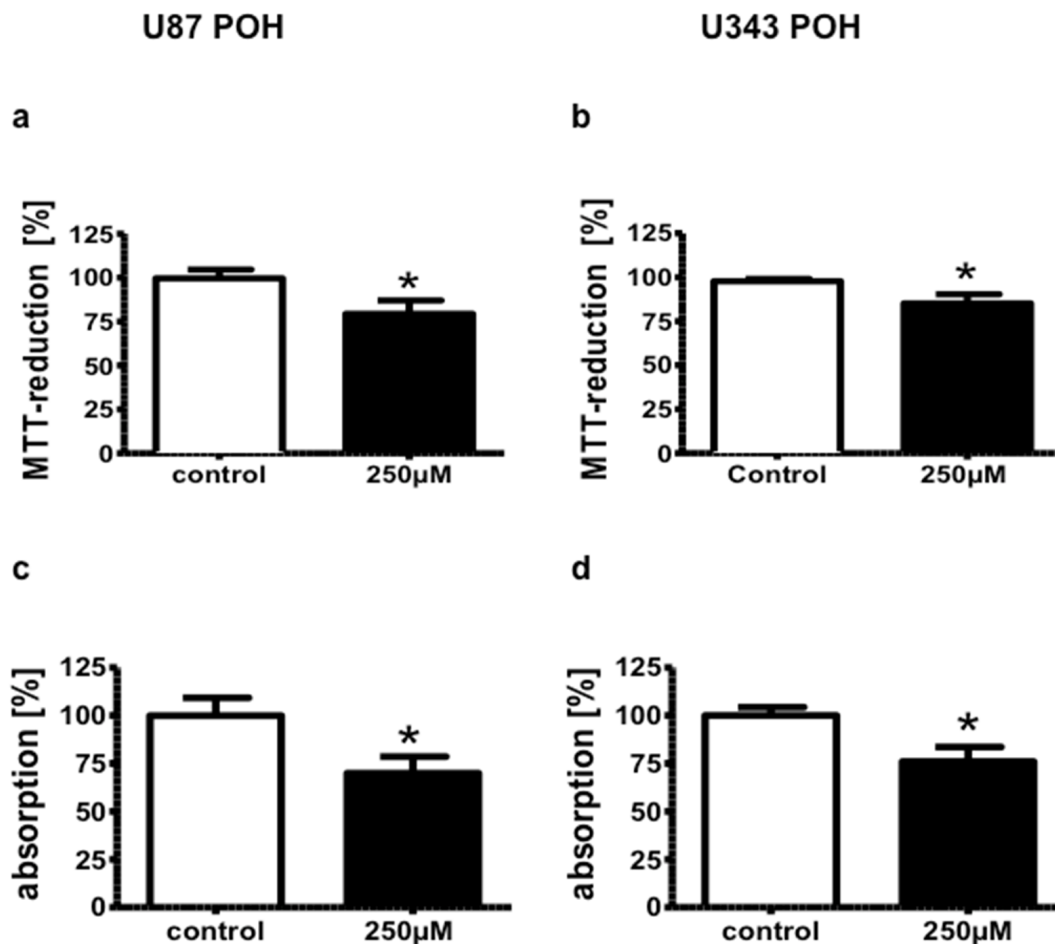
#### 4.4.2 Einfluss von Lovastatin und Perillylalkohol auf die Proliferation von GBM-Zellen

Der MTT-Assay und auch der Kristallviolett-Assay wurden verwendet um die Proliferation der beiden GBM Zelllinien U87 und U343 zu evaluieren. Beide Assays zeigten eine Reduktion der Proliferation durch die Behandlung der U87 und U343 Zellen mit 10 µM Lovastatin. Auch die Inkubation der GBM Zelllinien U87 und U343 mit 250 µM Perillylalkohol bewirkte eine Erniedrigung der Proliferation, die mit beiden Assays detektiert wurde.





**Abbildung 46. Proliferation der U87 und U343 Zellen nach der Behandlung mit Lovastation (LOV).** Die U87 Zellen (a und c) und die U343 Zellen (b und d) wurden mit jeweils 10 µmol/L LOV für 24 Stunden in Serum-freien Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent Ethanol behandelt wurden, dienten als Kontrollen (control) für den MTT- und Kristallviolett-Assay. Der MTT-Assay (MTT-reduction) wurde verwendet um die Zellproliferation nach der Behandlung mit Lovastatin (a, b) in U87 und U343 Zellen zu analysieren. Die MTT-Aktivität wurde photometrisch gemessen. Der Kristallviolett-Assay (absorption) der U87 und U343 Zellen, die mit LOV (c, d) behandelt wurden, charakterisierte ebenfalls die Zellproliferation. Nach den angegebenen Behandlungen wurden die Zellen gefärbt und photometrisch vermessen. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ;  $p^{**} < 0.01$ ;  $p^{***} < 0.001$ ),  $n=15$  (MTT-Assay),  $n=9$  (Kristallviolett-Assay).

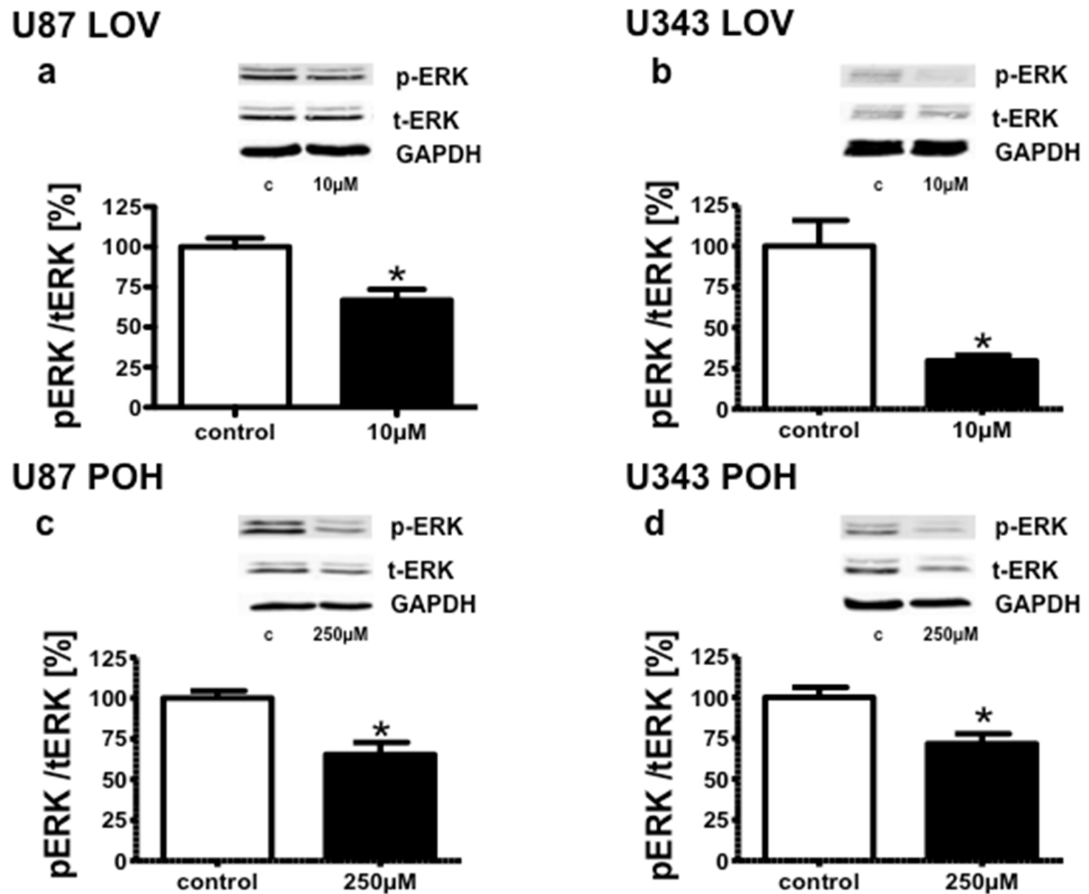


**Abbildung 47. Proliferation der U87 und U343 Zellen nach der Behandlung mit Perillylalkohol (POH).** Die U87 Zellen (a und c) und die U343 Zellen (b und d) wurden mit jeweils 250 µmol/L POH für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent Ethanol behandelt wurden, dienten als Kontrollen (control) für den MTT- und Kristallviolett-Assay. Der MTT-Assay (MTT-reduction) wurde verwendet um die Zellproliferation nach der Behandlung mit Perillylalkohol (a, b) in U87 und U343 Zellen zu analysieren. Die MTT-Aktivität wurde photometrisch gemessen. Der Kristallviolett-Assay (absorption) der U87 und U343 Zellen, die mit POH (c, d) behandelt wurden, charakterisierte ebenfalls die Zellproliferation. Nach den angegebenen Behandlungen wurden die Zellen gefärbt und photometrisch vermessen. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ),  $n=15$  (MTT-Assay),  $n=9$  (Kristallviolett-Assay).

#### 4.4.3 Einfluss von Lovastatin und Perillylalkohol auf die ERK-Signalwirkung in GBM-Zellen

Migration, Invasion und Proliferation der Glioblastoma Zellen werden über den RAF/MEK/ERK Signalweg reguliert. Für die Signaltransduktion spielt die H-Ras und Rac1 vermittelte Aktivierung des nachgeschalteten Proteins ERK (Extracellular signal-regulated kinases) eine wichtige Rolle. Aus diesem Grund wurden die Gehalte der aktivierten phosphorylierten Form des ERK (p-ERK) und der Gesamtproteingehalt des ERK (t-ERK) in den Glioblastoma Zellen U87 und U343 detektiert. Die Proteine p-ERK und t-ERK wurden nach der Behandlung der

U87 und U343 Zellen mit 10  $\mu\text{M}$  Lovastatin und mit 250  $\mu\text{M}$  Perillylalkohol mittels WesternBlot Analyse bestimmt. Lovastatin reduzierte die Proteingehalte von p-ERK in den beiden GBM Zelllinien U87 und U343. Ähnlich vermindert auch die Behandlung der Zellen mit Perillylalkohol die Proteingehalte von p-ERK in den Zelllinien U87 und U343.



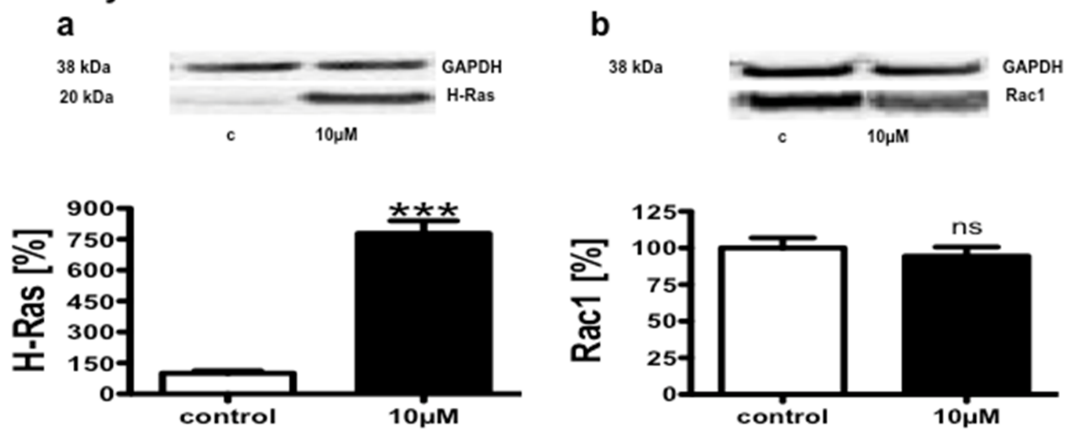
**Abbildung 48. Proteingehalte des phosphorylierten ERK (p-ERK) und des gesamten Proteins ERK (t-ERK) in U87 und U343 Zellen nach der Behandlung mit Lovastation (LOV) und Perillylalkohol (POH).** Die U87 Zellen (a) und die U343 Zellen (b) wurden mit jeweils 10  $\mu\text{mol/L}$  LOV für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Die U87 Zellen (c) und die U343 Zellen (d) wurden mit jeweils 250  $\mu\text{mol/L}$  POH für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent Ethanol behandelt wurden, dienten als Kontrollen (control = c) für die WesternBlot Analyse. Der WesternBlot Analyse des phosphorylierten ERK (p-ERK) und des Gesamtproteins ERK (t-ERK) wurden bei den U87 Zellen (a, c) und U343 Zellen (b, d) durchgeführt, um die ERK-Aktivierung zu analysieren. Die Graphen zeigen das Verhältnis zwischen p-ERK und t-ERK der U87 und U343 Zellen nach der Behandlung mit LOV und POH. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind dargestellt. Die Gehalte von p-ERK und t-ERK wurden auf GAPDH normiert. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ),  $n=5$ .

#### **4.4.4 Einfluss von Lovastatin und Perillylalkohol auf die zelluläre Lokalisation kleiner GTPasen**

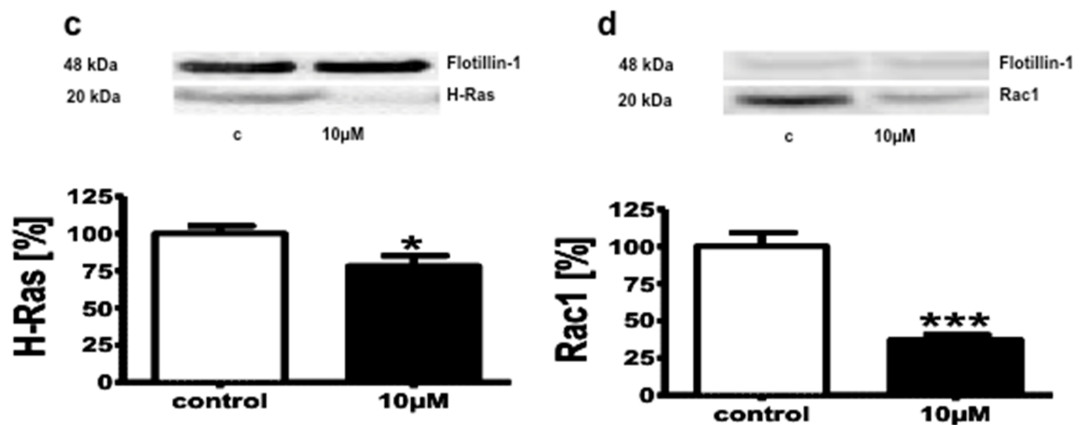
Die exakte Signaltransduktion kleiner GTPasen erfordert die posttranslationale Modifikation mit FPP und GGPP und die anschließende Lokalisation der kleinen GTPasen an Membranen (Swanson & Hohl, 2006). Um herauszufinden wie Lovastatin und Perillylalkohol die Prenylierung der kleinen GTPasen H-Ras und Rac1 beeinflussen, wurde im Folgenden ihre Insertion in zellulären Membranen untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Proteingehalte von H-Ras und Rac1 mittels WesternBlot Analyse in Membranpräparationen aus den GBM Zellen U87 und U343 nach deren Inkubation mit Lovastatin und Perillylalkohol ermittelt.

Der Gehalt an Membran-gebundenem H-Ras war in den U87 und auch in den U343 Zellen durch die Behandlung mit 10  $\mu$ M Lovastatin erniedrigt. Ebenso bewirkte die Inhibition der HMG-CoA-Reduktase durch Lovastatin eine Reduktion des Membran-gebundenen Rac1 in beiden GBM Zellmodellen. Diese Daten implizieren eine verringerte Prenylierung dieser GTPasen in Folge der Behandlung mit Lovastatin. Im Cytosol der U87 und U343 Zellen hatte die Lovastatinbehandlung eine Erhöhung des Proteingehaltes von H-Ras zur Folge. Aber in den cytosolischen Präparationen der mit Lovastatin behandelten U87 Zellen konnte kein Unterschied der Gehalte an Rac1 zu den Kontrollen detektiert werden, wobei analog den Effekten auf das H-Ras auch die Proteingehalte an Rac1 im Cytosol der Lovastatin-behandelten U343 Zellen erhöht vorlagen.

## U87 cytosol LOV

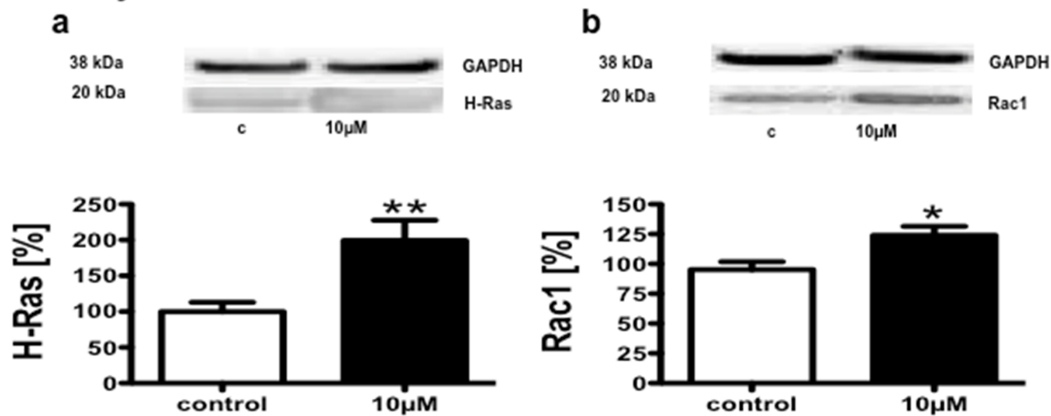


## U87 membrane LOV

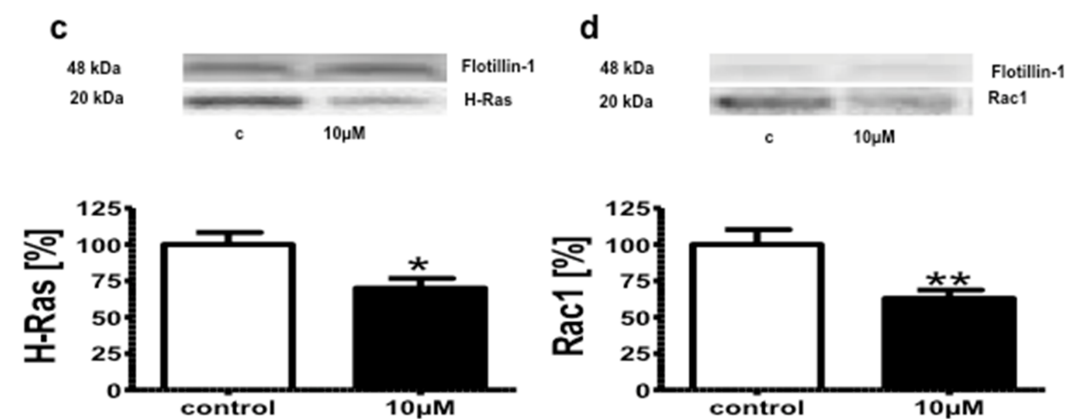


**Abbildung 49. Effekte von Lovastatin (LOV) auf die zelluläre Lokalisation der Proteine H-Ras und Rac1 in U87 Zellen.** Die U87 Zellen (a, b, c und d) wurden mit jeweils 10  $\mu$ mol/L LOV für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent Ethanol behandelt wurden, dienten als Kontrollen (control = c) für die WesternBlot Analyse. Die WesternBlot Analyse von Präparationen des Cytosols (cytosol) und der Membranfraktion (membrane) wurden durchgeführt um die Prenylierung von H-Ras (a, c) und Rac1 (b, d) zu untersuchen. Die WesternBlots der cytosolischen Fraktionen wurden auf GAPDH normiert, die WesternBlots der Membranfraktionen wurden auf Flotillin-1 normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei den jeweiligen Graphen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ;  $p^{***} < 0.001$ ; ns=not significant),  $n=5$ .

## U343 cytosol LOV



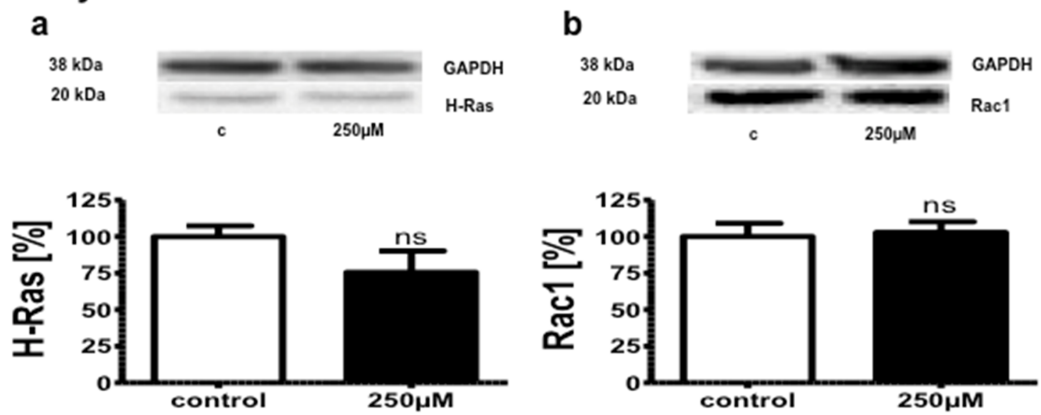
## U343 membrane LOV



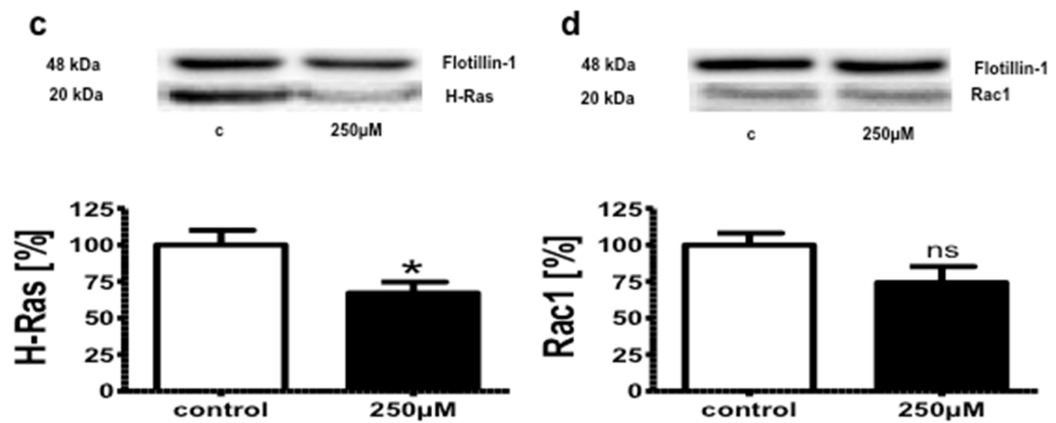
**Abbildung 50. Effekte von Lovastatin (LOV) auf die zelluläre Lokalisation der Proteine H-Ras und Rac1 in U343 Zellen.** Die U343 Zellen (a, b, c und d) wurden mit jeweils 10 μmol/L LOV für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent Ethanol behandelt wurden, dienten als Kontrollen (control = c) für die WesternBlot Analyse. Die WesternBlot Analyse von Präparationen des Cytosols (cytosol) und der Membranfraktion (membrane) wurden durchgeführt um die Prenylierung von H-Ras (a, c) und Rac1 (b, d) zu untersuchen. Die WesternBlots der cytosolischen Fraktionen wurden auf GAPDH normiert, die WesternBlots der Membranfraktionen wurden auf Flotillin-1 normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei den jeweiligen Graphen dargestellt. Mittelwert ± SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ;  $p^{**} < 0.01$ ),  $n=5$ .

Im Cytosol der beiden GBM Zelllinien U87 und U343 induzierte die Behandlung mit 250 μM Perillylalkohol keine Änderung der Proteingehalte der kleinen GTPasen H-Ras und Rac1. Aber in den Membranpräparationen der U87 Zellen wurde bedingt durch die Perillylalkohol-Behandlung zwar der Gehalt an Membran-gebundenem H-Ras reduziert, jedoch wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den mit Perillylalkohol behandelten U87 Zellen und den Kontrollen für die Proteingehalte der Membran-gebundenen Rho-GTPase Rac1 detektiert, wobei eine deutliche Tendenz einer Reduktion erkennbar war. Anders in den U343 Zellen, hier zeigten die Membranpräparationen nach der Inkubation mit Perillylalkohol eine signifikante Reduktion der Proteingehalte von H-Ras und Rac1.

## U87 cytosol POH

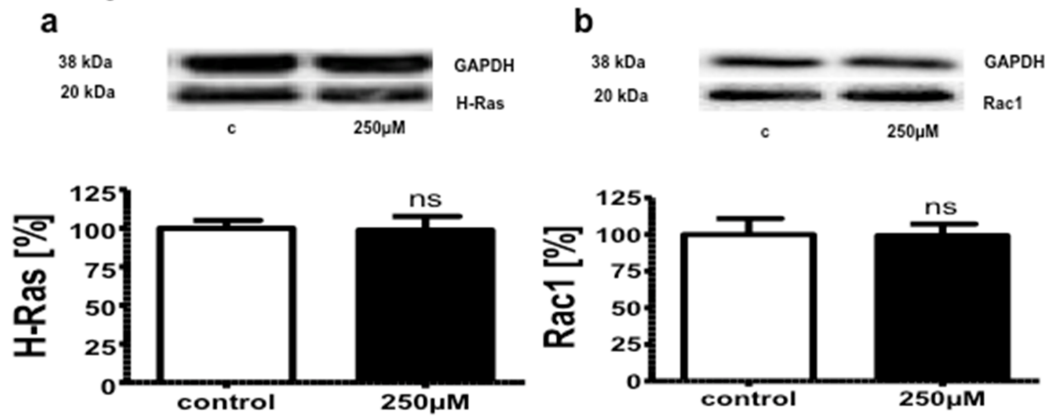


## U87 membrane POH

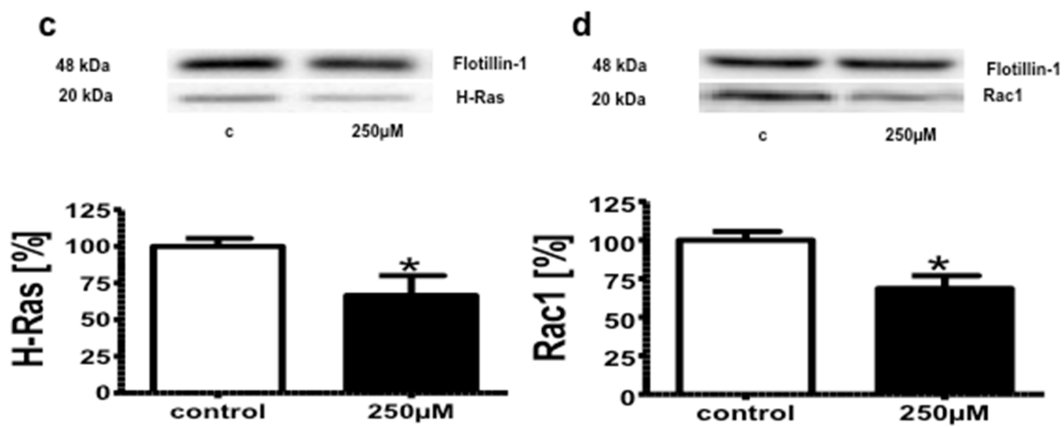


**Abbildung 51. Effekte von Perillylalkohol (POH) auf die zelluläre Lokalisation der Proteine H-Ras und Rac1 in U87 Zellen.** Die U87 Zellen wurden mit jeweils 250 µmol/L POH für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent Ethanol behandelt wurden, dienen als Kontrollen (control = c) für die WesternBlot Analyse. Die WesternBlot Analyse von Präparationen des Cytosols (a, b; cytosol) und der Membranfraktion (c, d; membrane) wurden durchgeführt um die Prenylierung von H-Ras (a, c) und Rac1 (b, d) zu untersuchen. Die WesternBlots der cytosolischen Fraktionen wurden auf GAPDH normiert, die WesternBlots der Membranfraktionen wurden auf Flotillin-1 normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei den jeweiligen Graphen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ; ns=not significant),  $n=5$ .

### U343 cytosol POH



### U343 membrane POH

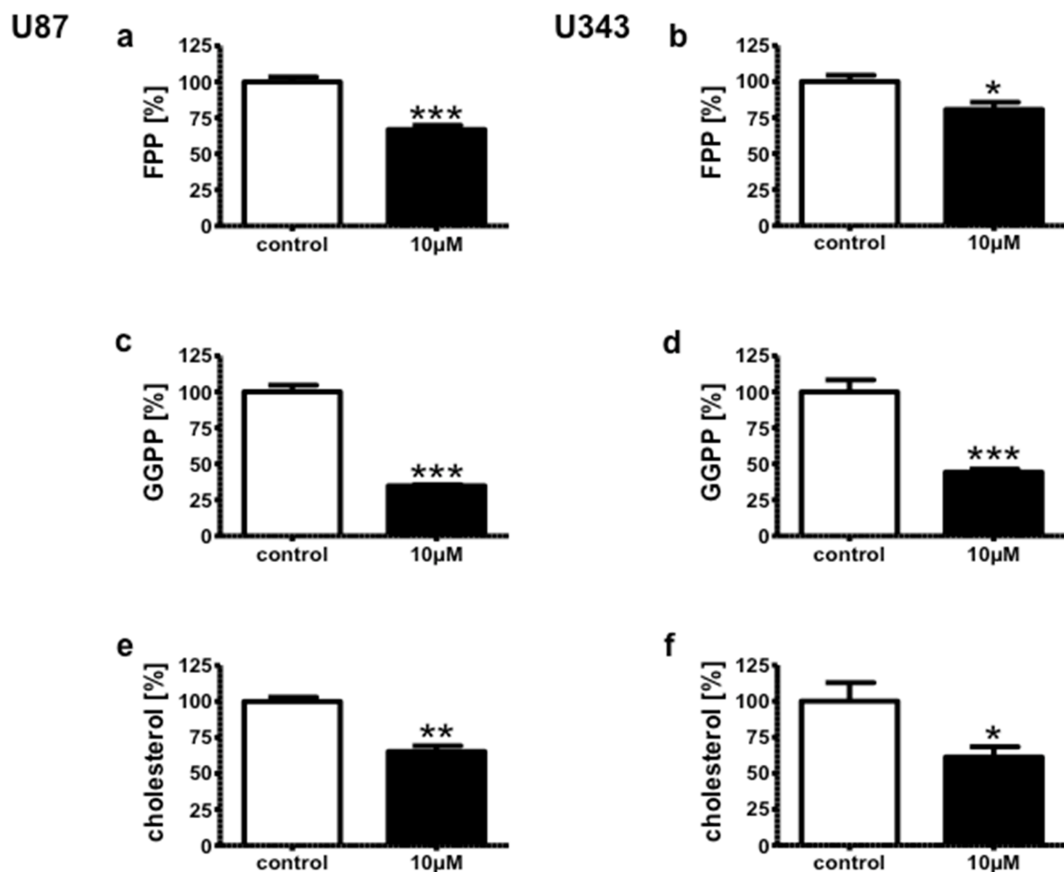


**Abbildung 52. Effekte von Perillylalkohol (POH) auf die zelluläre Lokalisation der Proteine H-Ras und Rac1 in U343 Zellen.** Die U343 Zellen wurden mit jeweils 250 μmol/L POH für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent Ethanol behandelt wurden, dienen als Kontrollen (control = c) für die WesternBlot Analyse. Die WesternBlot Analyse von Präparationen des Cytosols (a, b; cytosol) und der Membranfraktion (c, d; membrane) wurden durchgeführt um die Prenylierung von H-Ras (a, c) und Rac1 (b, d) zu untersuchen. Die WesternBlots der cytosolischen Fraktionen wurden auf GAPDH normiert, die WesternBlots der Membranfraktionen wurden auf Flotillin-1 normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei den jeweiligen Graphen dargestellt. Mittelwert ± SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ; ns=not significant), n=5.



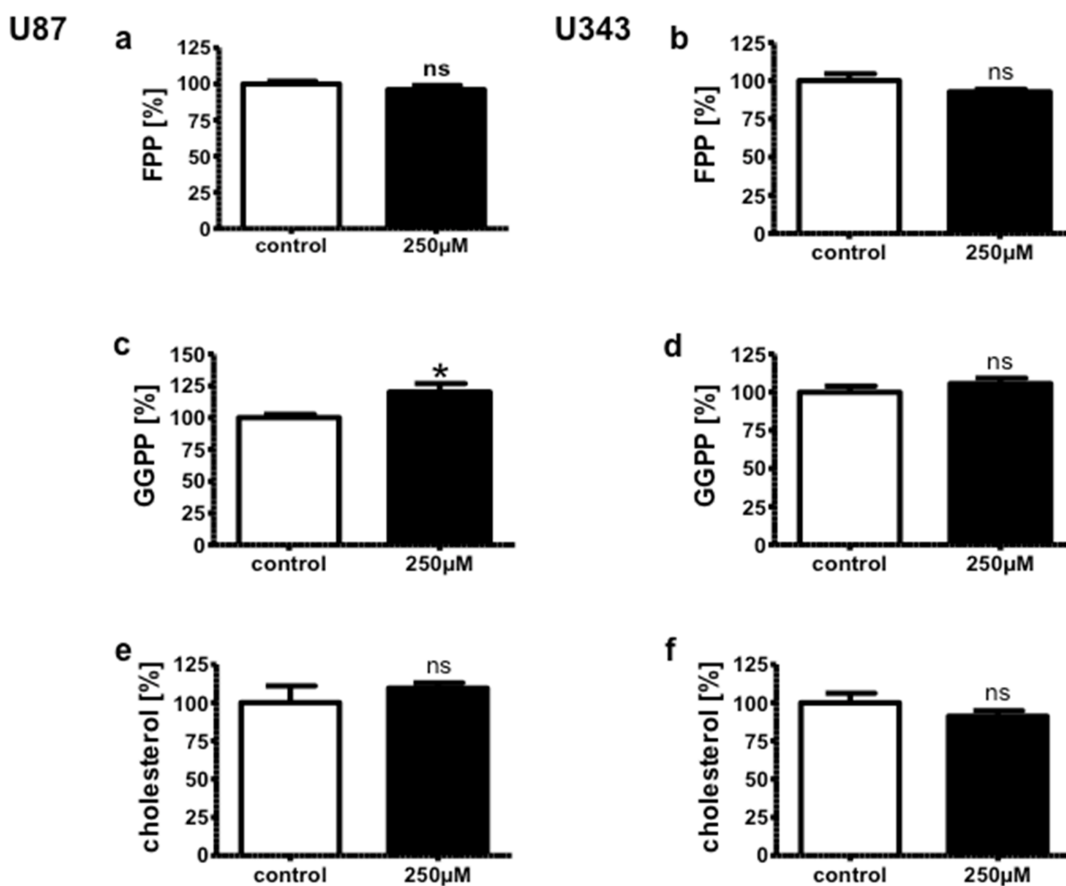
#### 4.4.5 Einfluss von Lovastatin und Perillylalkohol auf Intermediate des Mevalonatweges

Lovastatin inhibiert die HMG-CoA-Reduktase, das Geschwindigkeits-bestimmende Enzym des Cholesterin-Biosyntheseweges, welches die Synthese des Mevalonats katalysiert. Das Mevalonat ist ein Präkursor der beiden Isoprenoide FPP und GGPP. Die reduzierte Lokalisation kleiner GTPasen in zellulären Membranen in Folge der Wirkung des HMG-CoA-Reduktase-Inhibitors Lovastatin deutet auf eine erniedrigte Prenylierung aufgrund reduzierter FPP und GGPP-Gehalte hin. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die Intermediate des Mevalonatweges FPP, GGPP und Cholesterin analysiert. Lovastatin induziert eine Reduktion der Gehalte an FPP, GGPP und Cholesterin in U87 und U343 Zellen.



**Abbildung 53. Effekte von Lovastatin (LOV) auf die Intermediate des Mevalonatweges FPP, GGPP und Cholesterin in U87 und U343 Zellen.** Die U87 Zellen (a, c und e) und die U343 Zellen (b, d und f) wurden mit jeweils 10 µmol/L LOV für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent Ethanol behandelt wurden, dienten als Kontrollen (control) für die HPLC-FD und die CHOD-PAP Analyse. FPP (a, b) und GGPP (c, d) wurden mittels HPLC-FD Analyse quantifiziert. Die Cholesterolgehalte (cholesterol) in U87 Zellen (e) und U343 Zellen (f) wurden enzymatisch anhand der CHOD-PAP Methode ermittelt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ;  $p^{**} < 0.01$ ;  $p^{***} < 0.001$ ),  $n=6$ .

Perillylalkohol hemmt die FTase und die GGTase, welche die Prenylierung kleiner GTPasen katalysieren (End, 1999; Ren et al., 1997). Die Behandlung der GBM Zelllinien U87 und U343 mit Perillylalkohol hatte keinen Einfluss auf die Gehalte an FPP und Cholesterol. Und auch die GGPP-Gehalte in U343 Zellen waren nicht verändert durch die Inkubation mit Perillylalkohol. Interessanter Weise waren aber die Gehalte an GGPP in den U87 Zellen bedingt durch die Behandlung mit Perillylalkohol erhöht, was eine selektive Inhibition der GGTase in spezifischen GBM Zelllinien implizieren könnte.



**Abbildung 54. Effekte von Perillylalkohol (POH) auf die Intermediate des Mevalonatweges FPP, GGPP und Cholesterol in U87 und U343 Zellen.** Die U87 Zellen (a, c und e) und die U343 Zellen (b, d und f) wurden mit jeweils 250 μmol/L POH für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent Ethanol behandelt wurden, dienten als Kontrollen (control) für die HPLC-FD und die CHOD-PAP Analyse. FPP (a, b) und GGPP (c, d) wurden mittels HPLC-FD Analyse quantifiziert. Die Cholesterolgehalte (cholesterol) in U87 Zellen (e) und U343 Zellen (f) wurden enzymatisch anhand der CHOD-PAP Methode ermittelt. Mittelwert ± SEM, ungepaarter t-Test (p\* < 0.05; ns = not significant), n = 6.

## 5 Diskussion

### 5.1 Gehirnalterung

Die Gehirnalterung ist mit dem Rückgang der kognitiven Fähigkeiten assoziiert, welcher im Zusammenhang mit der synaptischen Plastizität steht (Bloss et al., 2013; Casoli et al., 1996; Mostany et al., 2013). Viel Aufmerksamkeit wurde diesbezüglich auf die Veränderung des Dendritenwachstums und der Synapsendichte gelegt, welche die Alterungs-bezogene Reduktion der synaptischen Plastizität bedingen, aber die Mechanismen hinter diesen Veränderungen sind noch immer nicht vollständig verstanden und aufgeklärt (Burke & Barnes, 2006, 2010; Burke, Wallace, Nematollahi, Uprety, & Barnes, 2010). Das Aktin-Zytoskelett spielt eine kritische und essentielle Rolle bei der Kontrolle der Entwicklung und Aufrechterhaltung der Spines und Synapsen (Tolias et al., 2011). Die Organisation und Funktion des Aktin-Zytosketts hängen von der Familie der kleinen Rho-GTPasen ab. Entwicklungsstudien und Studien über spezifische Formen mentaler Retardierung haben gezeigt, dass Rho-Proteine wie Rac1, RhoA und Cdc42 von kritischer Bedeutung für die Steuerung der Synapsenentwicklung und der synaptischen Plastizität sind (Bongmba, Martinez, Elhardt, Butler, & Tejada-Simon, 2011; Cartocci et al., 2016; Chen Chen, Wirth, & Ponimaskin, 2012; Newey, Velamoor, Govek, & Van Aelst, 2005; Tolias et al., 2011). Die normale Funktion dieser Proteine erfordert die Anlagerung des Isoprenoids GGPP an den Cystein-Rest des Carboxy-terminalen CAAX Motivs. Es wurde bereits publiziert, dass die Gehalte der Isoprenoide GGPP und FPP in Hirnen gealterter Mäuse im Vergleich mit jüngeren Mäusen signifikant erhöht vorliegen (Hooff et al., 2012). Diese Befunde konnten im Zuge der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Es wird vermutet, dass dies den Prenylierungsprozess beeinflussen könnte. Rho-GTPasen werden bevorzugt von GGPP prenyliert. Und in der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Prenylierung der Rho-GTPasen in Hirnen gealterter Mäuse verändert vorliegt.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigten, dass die zelluläre Lokalisation der Rho-Proteine in Hirnen gealterten Mäusen verändert ist. Diese Veränderung der Protein-Lokalisation äußert sich in den reduzierten Gehalten der prenylierten Membran-gebundenen Rho-GTPasen und den erhöhten Gehalten cytosolischer Rho-Proteine in Hirnen gealterter Mäuse im Vergleich zu den

Protein-Gehalten junger Kontroll-Mäuse. Diese Befunde deuten entweder auf eine Erhöhung der unprenylierten, also nicht geranylgeranylierten Rho-GTPasen hin, oder es muss eine höhere Bindungskapazität der korrespondierenden RhoGDI $\alpha$  Proteine für die Rho-Proteine im Cytosol vorherrschen.

Die GGTase-I vermittelte Prenylierung der GTPasen spielt eine fundamentale Rolle für die Gehirnfunktionen (S. Gao, Yu, & Zhou, 2016). Die altersbedingte Reduktion der prenylierten Membran-gebundenen Rho-Proteine ist assoziiert mit einer Reduktion der Protein- und mRNA- Gehalte des Enzyms GGTase-I $\beta$ , der Untereinheit der GGTase-I, die die Bindung des Isoprenoids GGPP an die Rho-GTPasen reguliert. Diese reduzierten Protein- und mRNA- Gehalte des Enzyms GGTase-I $\beta$  korrelieren direkt mit der reduzierten relativen GGTase Aktivität, die in den Gehirnen der gealterten Mäuse detektiert werden konnte. Außerdem stellt die altersbedingte Reduktion der Protein- und mRNA- Gehalte des Enzyms GGTase-I $\beta$  vermutlich auch die Ursache für die reduzierte relative GGTase Aktivität dar, die wiederum eine verringerte Prenylierung der untersuchten Rho-GTPasen zur Folge haben kann. Zusätzlich ahmt die Inhibition der GGTase-I in vitro die im Tierversuch beobachteten Veränderungen in den Gehirnen gealterter Mäuse nach, bei welcher auch das verringerte Vorliegen der synaptischen Marker-Proteine GAP43 und Synaptophysin beobachtet werden konnte. Die signifikant geringeren Gehalte der prenylierten Membran-assoziierten Rho-GTPasen treten spezifisch bei den GTPasen auf, die durch die Transferase GGTase-I prenyliert werden. Bei den Rab-GTPasen, die durch die Transferase GGTase-II geranylgeranyliert werden liegen keine reduzierten Gehalte der membran-gebundenen GTPasen in Hirnen gealterter Mäuse im Vergleich zu den jungen Kontrolltieren vor. Auch diese Ergebnisse bestätigten sich im in vitro Versuch. Eine Konsequenz der Herunterregulierung der GGTase-I im gealterten Gehirn könnte einen Faktor darstellen, der zu der Verschlechterung der Synapsen und deren Plastizität beiträgt, die mit erhöhtem Alter auftritt. Die Langzeit-Potenzierung (eng: long-term potentiation, LTP) ist in Rac1-defizienten Mäusen verschlechtert, ihre räumliche Lernfähigkeit und auch die Anzahl der neuronalen Synapsen ist verringert (Haditsch et al., 2009). Umgekehrt verbessert die Aktivierung der Rho-GTPasen im Gehirn von C57BL/6 Mäusen die Lernfähigkeit und die Gedächtnisleistung (Diana et al., 2007).

Die Daten der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass die Herunterregulierung der GGTase-I die Prenylierung der Rho-GTPasen im gealterten Hirn reduziert.

Ein weiterer Mechanismus, der für die Reduktion der prenylierten Membran-gebundenen Rho-Proteine verantwortlich sein könnte geht mit den GDIs (guanine dissociation inhibitors) einher. Die GDIs beeinflussen ebenfalls die Funktion und Lokalisation der GTPasen (Jacqueline Cherfils & Zeghouf, 2013). Im Cytosol halten die GDIs die GTPasen im inaktiven GDP-gebundenen Zustand, indem sie den Nukleotid-Austausch blockieren und dabei die Membran-Assoziierung regulieren (DerMardirossian & Bokoch, 2005).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Protein-Gehalte der GDIs RhoGDI- $\alpha$  und RabGDI- $\alpha$  in der cytosolischen Fraktion von Hirnen gealterter und junger Mäuse ähnlich sind und im Vergleich keinen signifikanten Unterschied aufweisen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die altersbedingten Änderungen der Gehalte der Rho- und Rab-Proteine nicht im Zusammenhang mit den GDIs stehen. Wie auch immer, es existieren Anzeichen dafür, dass die Prenylierung der Rho-GTPasen auch im Cytosol stattfinden kann und dort zu Miss- und Entfaltung dieser Proteine führt. Dieser Vorgang resultiert in der Protein-Degradierung sofern der Lipid-Rest des Rho-Proteins nicht durch eine RhoGDI $\alpha$ -Bindung geschützt wird. So sind die prenylierten Rho-Proteine größtenteils an Zell-Membranen oder an RhoGDI $\alpha$  gebunden, nur eine kleine Fraktion ist mit dem Chaperon-System assoziiert (Boulter et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit wurden keine Unterschiede der Gesamtprotein-Gehalte der Rho-GTPasen Rac1, RhoA und Cdc42 zwischen den Gehirnen der verschiedenen Altersgruppen detektiert. Dies impliziert, dass keine Erhöhung des cytosolischen Pools der geranylgeranylierten Rho-GTPasen Rac1, RhoA und Cdc42 vorliegt, die nicht an RhoGDI $\alpha$  gebunden sind. Weiterhin konnten bei den Untersuchungen im Zuge der vorliegenden Arbeit keine Unterschiede der RhoGDI $\alpha$  Protein-Gehalte zwischen den cytosolischen Fraktionen der Hirne junger und alter Mäuse festgestellt werden. Diese unveränderten RhoGDI $\alpha$  Protein-Gehalte im Cytosol, begleitet von den reduzierten Gehalten der Membran-gebundenen Rho-Proteine, den verringerten mRNA und Protein-Gehalten der GGTase-I $\beta$  und letztendlich die reduzierte relative Enzymaktivität der GGTase-I in den gealterten Mäusehirnen führen zu der Schlussfolgerung, dass die Erhöhung der Protein-Gehalte der Rho-GTPasen im Cytosol für erhöhte Gehalte unprenylierter Rho-GTPasen sprechen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können entweder durch die Erhöhung der Protein-Gehalte der unprenylierten Rho-GTPasen erklärt werden oder durch eine erhöhte Bindungskapazität des korrespondierenden Proteins RhoGDI $\alpha$  für die prenylierten Rho-GTPasen im Cytosol. Diese interessante Fragestellung sollte in

weiterführenden Arbeiten adressiert und geklärt werden. Wie auch immer, die altersbedingte Verminderung der Membran-gebundenen geranylgeranylierten und GTP-gebundenen Rho-GTPasen im Mäusehirn ist ein direktes Resultat der gestörten Aktivität der GGTase-I.

Die Daten der vorliegenden Arbeit identifizieren die Rolle der GGTase-I als kritisch in der Gehirnalterung. Das Isoprenoid GGPP ist ein Substrat der Transferase GGTase-I, welche als cytosolisches Protein vorliegt. Die GGTase-I besteht aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit (Lane, 2006). Die  $\alpha$ -Untereinheit der GGTase-I ist identisch mit der  $\alpha$ -Untereinheit der FTase und die  $\beta$ -Untereinheit der GGTase-I regelt die Protein-Substrat-Selektivität. Die GGTase-I liegt in hohen Konzentrationen im Gehirn vor und es besteht ein hohes Interesse für die wichtige Rolle der GGTase-I bei der Entwicklung der Dendriten (Gonzalez-Billault et al., 2012; K.-Y. Wu et al., 2010). Studien über die GGTase-I im Gehirn haben sich auf ihre Funktion fokussiert. Die Suppression der GGTase-I in hippocampalen Neuronen führte zu einer Reduktion der dendritischen Verzweigung, wohingegen die Überexpression der GGTase-I den gegenteiligen Effekt verursachte (X.-P. Zhou et al., 2008). In der gleichen Publikation konnte gezeigt werden, dass der vorteilhafte Effekt der GGTase-I inhibiert wurde, indem Zellen mit dem Protein Rac1 überexprimiert wurden, welches eine mutierte oder gelöschte Prenylierungsseite aufwies. Sowohl die kognitive Funktion als auch die Langzeit-Potenzierung (LTP) sinken mit steigendem Alter (Burke & Barnes, 2006), was auch mit der gestörten Regulierung der GGTase-I zusammenhängen könnte. In hippocampalen Schnitten von Geranylgeranyltransferase-I haplodefizienten Mäusen ist die Langzeit-Potenzierung signifikant supprimiert und geht mit einer Reduktion der Spine-Dichte in corticalen Neuronen einher (D. Hottman et al., 2018). Weiterhin wurde von Hottman et al. in den cerebralen Lysaten Geranylgeranyltransferase-I haplodefizienter Mäuse eine Reduktion von Membran-gebundenem Rac1 und RhoA, aber nicht von Membran-gebundenem H-Ras, detektiert. Durch Manipulation der Isoprenoid-Gehalte und der Protein-Prenylierung ist es möglich die synaptische Plastizität und kognitiven Funktionen in verschiedenen Tiermodellen zu modulieren (S. Cheng et al., 2013a; Costa et al., 2002; L. Li, Cao, Kim, Lester, & Fukuchi, 2006; Mans, Chowdhury, Cao, McMahon, & Li, 2010; Mans, McMahon, & Li, 2012; Ye & Carew, 2010). Eine weitere Studie demonstrierte, dass die GGTase-I die Synaptogenese durch die BDNF-induzierte Rac1-Aktivierung vermittelt (Z. Li et al., 2013), was direkt mit den Daten der vorliegenden Arbeit korreliert. Die Gruppe von Li et al. konnte zeigen, dass die Inhibition der GGTase-I zu einer Reduktion der synaptischen Marker-Proteine

Synapsin-1 und PSD 95 (post synaptic density protein 95) führt (Z. Li et al., 2013). Weil die altersbedingte Reduktion der Gehalte der synaptischen Marker-Proteine Synaptophysin und GAP43 in Nager-Hirnen bereits publiziert wurde (Casoli et al., 1996; Keleshian et al., 2013; Saito et al., 1994), wurde im Zuge der vorliegenden Arbeit der Fokus auf diese presynaptischen Marker-Proteine gelegt. Bei den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass auch in den Hirnen der gealterten C57BL/6 Mäuse die Protein-Gehalte der presynaptischen Marker Synaptophysin und GAP43 signifikant niedriger vorliegen als die Gehalte in den Hirnen der jungen Kontroll-Tiere. Weiterhin bewirkte die Inhibition der GGTase-I in vitro ebenfalls eine Reduktion der presynaptischen Marker-Proteine Synaptophysin und GAP43, was sich mit den Ergebnissen der Untersuchung der gealterten Mäusehirne deckt und somit die kritische Rolle der GGTase-I in der Gehirnalterung bestätigt.

Rab3A ist eine Rab-GTPase, die mit der Membran synaptischer Vesikel assoziiert ist und in die Kontrolle der Steuerung und des Andockens dieser synaptischen Vesikel an die presynaptische Membran zur Neurotransmitterausschüttung involviert ist (Stettler, Moya, Zahraoui, & Tavitian, 1994). Die Rab3A Genexpression sinkt sowohl im Alter als auch im Zusammenhang mit der Alzheimer Demenz (Saetre, Jazin, & Emilsson, 2011). Durch Studien an Wistar Ratten und hippocampalen Primärneuronen der Ratte konnte durch Behandlung mit Simvastatin die emotionale Reaktivität und die kognitiven Leistungen der Tiere verbessert werden, wobei die Aktivität und Penylierung von Rab3A und auch von RhoA verändert vorlag und diese demnach vermutlich in einem Zusammenhang stehen (Segatto et al., 2014). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Protein-Gehalte der Membran-gebundenen Rab-GTPase Rab3A in den Hirnen gealterter Mäuse signifikant erhöht vorliegt. Ob und wie diese Befunde zu den altersbedingten synaptischen Dysfunktionen beiträgt, bedarf weiterer Untersuchungen.

Die *in vitro* Inhibition der GGTase-I in SH-SY5Y Zellen, die für die vorliegende Arbeit durchgeführt wurde, führte zu einer signifikanten Erhöhung der Gehalte des Isoprenoids GGPP in den untersuchten Zellen. Diese *in vitro* Ergebnisse simulieren exakt die Beobachtungen in den untersuchten Hirngeweben der gealterten Mäuse und könnten eine mögliche Erklärung im Sinne einer Substratakkumulation für die Erhöhung der GGPP-Gehalte darstellen, die in den Gehirnen gealterter Mäuse sowohl in dieser Arbeit als auch in vorherigen Arbeiten beobachtet wurden (Hooff et al., 2012). Die altersbedingte Reduktion der relativen GGTase-Aktivität verursacht eine abnorme Akkumulation von GGPP. Die konventionelle Anschauung ist, dass GGPP auch Effekte unabhängig von der Proteinprenylierung verursacht, wie beispielsweise die Inhibition der Cholin-Phosphotransferase (Miquel, Pradines, Tercé, Selmi, & Favre, 1998) und die Stimulierung der  $\gamma$ -Secretase (Y. Zhou et al., 2008).

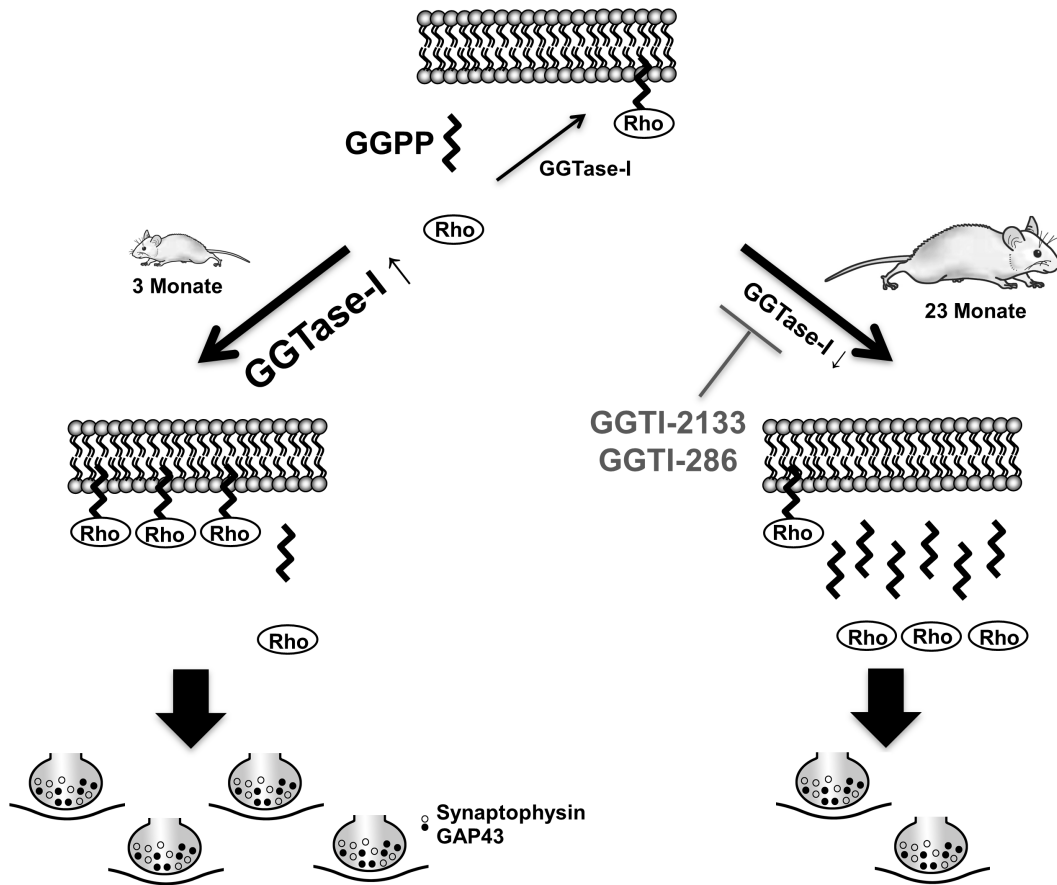
Das Altern ist durch einen progressiven Verlust der physiologischen Unversehrtheit gekennzeichnet, welche zu beeinträchtigten Funktionen führt und einen Risikofaktor für die Alzheimer Demenz darstellt (López-Otín, Blasco, Partridge, Serrano, & Kroemer, 2013). Es wurde bereits gezeigt, dass in Gehirnen gealterter Mäuse und auch in post-mortem Gehirnen von Alzheimer Patienten erhöhte Gehalte der Isoprenoide FPP und GGPP vorliegen (Gunter P Eckert et al., 2009b; Hooff et al., 2012). Zusammengefasst weisen diese Daten darauf hin, dass altersbedingte Veränderungen der Isoprenoid-Gehalte einen Einfluss auf das Auftreten der Alzheimer Demenz haben könnten. Eine Veröffentlichung über die heterozygote Deletion der FTase und der GGTase-I zeigte eine Reduktion der Amyloid  $\beta$ -Gehalte und der Neuroinflammation in einem Mausmodell der Alzheimer Demenz (S. Cheng et al., 2013a), ein Effekt, der als neuroprotektiv interpretiert werden kann. Natürlich besteht die Möglichkeit, dass die funktionelle Rolle der prenylierten Proteine und Isoprenoide während der normalen Gehirnalterung im Vergleich zu der Pathophysiologie der Alzheimer Demenz unterschiedlich ausgeprägt ist.

In der vorliegenden Arbeit werden erstmalig die Befunde vorgestellt, dass die Protein- und mRNA-Gehalte der GGTase-I $\beta$  signifikant niedriger im Gehirn gealterter Mäuse verglichen mit jüngeren Kontrolltieren vorliegen.

Auch im Hirngewebe gealterter NMRI Mäuse konnte im Zuge der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass im Vergleich zu den jungen Kontrolltieren die GGTase-Aktivität analog der Enzymaktivität im Hirngewebe der C57BL/6 Mäuse signifikant reduziert vorliegt. Zusätzlich konnte die Aktivität der GGTase-I durch



2 $\mu$ M des spezifischen GGTase-I-Inhibitors GGTI-286 in beiden Altersgruppen der NMRI Mäuse signifikant gesenkt werden. Weiterhin ist die alterbedingte Herunterregulierung der relativen Aktivität der GGTase-I mit reduzierten Proteingehalten der prenylierten Membran-gebundenen Rho-GTPasen Rac1, RhoA und Cdc42 assoziiert. Die direkte Inhibition der GGTase-I in vitro imitiert die im gealterten Maushirn beobachteten Effekte. Aus diesem Grund, könnte die Herunterregulierung der GGTase-I im gealterten Gehirn einen der Mechanismen darstellen, die für die gestörte synaptische Plastizität im gealterten Gehirn verantwortlich sind.



**Abbildung 55. Zusammenfassendes Schema des Zusammenhangs der Rho-GTPasen und der GGTase-I.** Rho-GTPasen werden durch die Transferase GGTase-I geranylgeranyliert. Ihre Prenylierung ist essentiell für ihre Lokalisation an Membranen, dem Ort ihrer Aktivierung und Funktion. Die Gehalte an GGPP in Hirngewebe gealterter (23 Monate alten) C57BL/6 Mäuse wiesen im Vergleich zu den jungen (3 Monate alten) Mäusen eine Erhöhung auf. Auch die mit dem GGTase-I-Inhibitor GGTI-2133 behandelten SH-SY5Y Zellen enthielten erhöhte Gehalte an GGPP. Jedoch blieben in beiden Studien die Gesamtgehalte (Homogenat) der Proteine Rac1, RhoA und Cdc42 unverändert. Interessanter Weise waren die Gehalte der Membran-gebundenen pränylierten Rho-GTPasen erniedrigt in alten Mäusehirnen und SH-SY5Y Zellen, die mit GGTI-2133 behandelt wurden. Diese Ergebnisse korrelieren direkt mit der Reduktion der realtiven GGTase-Aktivität, der Protein- und mRNA-Expression der GGTase-I $\beta$ . In einem weiteren Tiermodell, den NMRI Mäusen, war die Enzymaktivität der GGTase-I ebenfalls erniedrigt im Hirngewebe der gealterten (23 Monate alten) Mäuse, im Vergleich zu den jungen (3 Monate alten) Kontrolltieren. Hier konnte die Aktivität der GGTase-I durch den spezifischen GGTase-I-Inhibitor GGTI-286 in beiden Altersgruppen signifikant gesenkt werden. Da Rac1, RhoA und Cdc42 mit der Synaptogenese assoziiert sind, wurden die Gehalte der beiden synaptischen Markerproteine Synaptophysin und GAP43 analysiert. Bei diesen Analysen konnte eine altersbezogene Senkung von Synaptophysin und GAP43 im Hirngewebe der Mäuse festgestellt werden. Die Proteingehalte von Synaptophysin und GAP43 waren ebenfalls in dem in vitro Modell reduziert. Die gestörte Regulation der Rho-GTPasen im gealterten Gehirn ist also assoziiert mit einem spezifischen Defizit der GGTase-I $\beta$ , welches möglicherweise eine der Ursachen für das Defizit des neuronalen Auswuchses darstellt.

## 5.2 7, 8-Dihydroxyflavon

7, 8-Dihydroxyflavon (7, 8-DHF) ist ein natürlich vorkommender hoch affiner selektiver TrkB-Rezeptor-Agonist. Das 7, 8-DHF passiert die Blut-Hirn-Schranke, bindet selektiv an TrkB-Rezeptoren und aktiviert diese durch Dimerisierung und Autophosphorylierung des TrkB-Rezeptors und bewirkt dadurch die Aktivierung nachgeschalteter Signalwege (Jang et al., 2010). Somit besitzt 7, 8-DHF die gleichen neurotrophen Eigenschaften wie BDNF und ist in der Lage auch in Abwesenheit von endogenem BDNF TrkB-Rezeptoren zu aktivieren (D. C. Choi et al., 2010). So vermittelt 7, 8-DHF das Überleben von Neuronen, deren Differenzierung, synaptische Plastizität und Neurogenese (Liu et al., 2010; Tsai et al., 2013; Zeng et al., 2011; Zeng, Lv, et al., 2012; Zeng, Liu, et al., 2012; Z. Zhang et al., 2014).

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Cholesterol- und GGPP-Gehalte im Gehirngewebe gealterter Mäuse signifikant erhöht vorliegen. Durch die Fütterung der C57BL/6 Mäuse mit 7, 8-Dihydroxyflavon wird eine Abnahme des Isoprenoids GGPP hervorgerufen, während der Cholesterolgehalt sich dadurch nicht verändert.

Auch die zelluläre Lokalisation der Rho-Proteine ist in Hirnen gealterten Mäusen verschoben. So liegt das Membran-gebundene prenylierte Rac1 im Hirngewebe gealterter Mäuse reduziert vor. Die Fütterung der 23 Monate alten C57BL/6 Mäuse mit 7, 8-Dihydroxyflavon induziert die Zunahme des Proteingehaltes an prenyliertem Membran-gebundenem Rac1 auf das Niveau der Gehalte in den Hirn-Präparationen der jungen Kontroll-Tiere.

Die Membran-gebundene prenylierte Rab-GTPase Rab3A liegt im Hirngewebe gealterter Mäuse signifikant höher vor als in den jungen Kontroll-Tieren. Die Fütterung der gealterten Mäuse mit 7, 8-Dihydroxyflavon bewirkt in den Hirn-Präparationen eine Reduktion des Gehaltes an Membran-gebundenem Rab3A auf das Niveau der Gehalte, die in den Hirnen der 3 Monate alten C57BL/6 Mäuse vorliegen.

Der full-length TrkB vermittelt Signale, die das Überleben und die Differenzierung von Neuronen und die synaptische Plastizität bewirken, diese Effekte werden von den verkürzten Isoformen truncated TrkB und TrkB-Shc inhibiert, indem sie mit dem full-length TrkB Heterodimere bilden (J. Wong et al., 2013). Die Proteingehalte des full-length TrkBs und die der verkürzten Isoformen des TrkBs zeigen keinen Unterschied zwischen den Hirnen der jungen C57BL/6 Mäuse, der

gealterten Tiere und der gealterten Tiere, die mit 7, 8-Dihydroxyflavon gefüttert wurden.

BDNF ist ein neurotropher Faktor, der selektiv an den TrkB-Rezeptor bindet (Klein et al., 1991). So ist BDNF notwendig für die Verzweigung von Axonen und Dendriten und für die Bildung und Reifung von Synapsen (Alsina et al., 2001; McAllister et al., 1995). Außerdem fungiert BDNF als Modulator der synaptischen Funktion und Plastizität (Park & Poo, 2013). BDNF interagiert beispielsweise mit dem TrkB-Rezeptor und ist in der Lage direkt an den Rac1-spezifischen GEF Tiam1 zu binden, wodurch dieser aktiviert wird. Hierdurch kommt es zu einer Neuordnung des Zytoskeletts und Veränderungen der zellulären Morphologie der betroffenen Neurone (Miyamoto et al., 2006; P. Zhou et al., 2007). In hippocampalen Neuronen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die BDNF-induzierte Synaptogenese über die GGTase-I vermittelt wird (Z. Li et al., 2013). Die GGTase-I geranylgeranyliert Rac1 und bedingt dadurch die Lokalisation von Rac1 in der Membran. Verankert in der Membran wird Rac1 nun von GEFs aktiviert und bewirkt eine verstärkte Synaptogenese. In diesem Zusammenhang ist BDNF also in der Lage über die Aktivierung des TrkB-Rezeptors die Rho-GTPase Rac1 zu aktivieren. Jedoch zeigen sich keine Unterschiede der BDNF-Proteingehalte im Hirngewebe der jungen und der gealterten C57BL/6 Mäuse. Und auch die Fütterung der gealterten Tiere mit 7, 8-Dihydroxyflavon führt zu keiner Veränderung der BDNF-Expression.

Der Rac1-spezifischer GEF Tiam1 (T-cell lymphoma invasion and metastasis 1) reguliert die Entwicklung von Synapsen, das Remodeling von dendritischen Spines und das Neuritenwachstum (K.-O. Lai et al., 2012; Matsui et al., 2012; Shirazi Fard, Kele, Vilar, Paratcha, & Ledda, 2010; Um et al., 2014). Außerdem induziert Tiam1 über die BDNF/TrkB-vermittelte Aktivierung von Rac1 die Neuordnung des Zytoskeletts und Veränderungen der zellulären Morphologie in hippocampalen Neuronen (Miyamoto et al., 2006; P. Zhou et al., 2007).

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Tiam1 im Hirngewebe gealterter C57BL/6 Mäuse verglichen mit den jungen Tieren reduziert vorliegt. Die Fütterung der gealterten Mäuse mit 7, 8-Dihydroxyflavon bewirkt jedoch eine Erhöhung des Proteingehaltes an Tiam1 auf das Niveau der jungen Kontroll-Tiere.

Eine Vielzahl positiver Effekte des 7, 8-DHFs im Kontext diverser Hirnfunktionen und neurodegenerativer Erkrankungen wurden bereits festgestellt. So ist 7, 8-DHF, welches als TrkB-Agonist fungiert in der Lage das emotionale Lernen und das

Erinnerungsvermögen zu steigern (Andero et al., 2011; Bollen et al., 2013; D. C. Choi et al., 2010; Devi & Ohno, 2012; L. Gao et al., 2016) . Außer dem positiven Einfluss auf die Defizite der Lern- und Gedächtnis-Leistung übt 7, 8-DHF einen protektiven Effekt auf die durch Scopolamin induzierten A $\beta$ -Ablagerungen, oxidativen Stress sowie synaptische Dysfunktionen aus (Chong Chen et al., 2013). Und die antioxidative Aktivität von 7, 8-DHF wirkt protektiv gegenüber Glutamat-indizierter Toxizität (J. Chen et al., 2011).

In einem Mausmodell des Rett-Syndroms, einer genetisch bedingten Entwicklungsstörung, die durch Symptome des Autismus und Ataxie gekennzeichnet sind, bewirkt 7, 8-DHF die Reduktion zahlreicher Krankheitssymptome (R. A. Johnson et al., 2012). Zudem fördert 7, 8-DHF die Neurogenese und zeigt antidepressive Effekte (Liu et al., 2010). Und in einem Mausmodell der Multiples Sklerosis reduziert 7, 8-DHF die Schwere der Klinik und Pathologie (Makar et al., 2016).Außerdem mildert 7, 8-DHF parasitäre Infektionen (Tasdemir et al., 2006). 7, 8-DHF ist auch in der Lage die Angiogenese zu fördern (Williams, 2011). In dopaminergen Neuronen und einem Mausmodell der Parkinson Krankheit zeigt 7, 8-DHF einen protektiven Effekt gegen MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin)-induzierte Neurotoxizität (X.-H. Li et al., 2016; D. Luo et al., 2016). Mittels Real-time Analyse pyramidalen Neurone des Barrel Cortex konnte gezeigt werden, dass die chronische orale Behandlung mit 7, 8-DHF zu einer Erhöhung der dendritischen Spines und der axonalen Buttons führt (Perez-Rando, Castillo-Gomez, Bueno-Fernandez, & Nacher, 2018). Und im Hypocampus 12 Monate alter Mäuse führt 7, 8-DHF zu einer Erhöhung der Dendritenlängen neugeborener Neurone (X. Wang, Romine, Gao, & Chen, 2017).

Im Zuge der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass 7, 8-DHF auch positive Effekte auf die altersbedingten Veränderungen im Gehirn hat. Der altersbedingte Anstieg des Isoprenoids GGPP im murinen Hirngewebe wird durch 7, 8-DHF reduziert ohne das Cholesterol zu beeinflussen. Auch die im gealterten Gehirn von C57BL/6 Mäusen reduzierten Gehalte des Membran-gebundenen prenylierten Rac1 werden durch 7, 8-DHF auf das Niveau der jungen Kontroll-Tiere erhöht. Und auch die im Hirngewebe alter Mäuse erhöhten Proteingehalte des Membran-gebundenen Rab3A werden durch 7, 8-DHF auf das Niveau der jungen Kontroll-Tiere reduziert. Während die Proteinexpression von TrkB und BDNF keine Unterschiede zwischen dem Hirngewebe junger und gealterter Mäuse aufweist, zeigt sich eine Reduktion von Tiam1 bei den alten Mäusen. Auch hier bewirkt 7, 8-DHF einen Anstieg von Tiam1 auf das Niveau der jungen Kontroll-

Tiere. Die BDNF-induzierte TrkB-Aktivierung findet über die Bindung an den Rac1-spezifischen GEF Tiam1 statt und resultiert in der Aktivierung von Rac1 (Miyamoto et al., 2006). Die Ergebnisse von Z. Li et al. (Z. Li et al., 2013) zeigen, dass die BDNF-induzierte Synaptogenese über die GGTase-I vermittelt wird. Im Hirngewebe gealterter Mäuse liegt die GGTase-I reduziert vor und die Isoprenoide FPP und GGPP sind signifikant erhöht (Afshordel, Wood, Igbavboa, Muller, & Eckert, 2014; Hooff et al., 2012). Dies führt zu einer Reduktion der Membran-gebundenen prenylierten Rho-GTPase Rac1. Das Membran-gebundene prenylierte Rac1 wird jedoch durch 7, 8-DHF wieder erhöht. 7, 8-DHF übt also protektive Effekte auf die Veränderungen der Prenylierung von Rac1 im Zuge der Gehirnalterung aus.

### 5.3 Morbus Alzheimer

Die Alzheimer Demenz ist die am häufigsten auftretende Form der Demenz und gehört zu den progressiven neurodegenerativen Erkrankungen. Eine der molekularbiologischen Hypothesen der Alzheimer Demenz ist die Amyloid-Kaskaden-Hypothese, die von einer zentralen Rolle der  $\beta$ -Amyloid-Peptide bei der Alzheimer Demenz ausgeht (Karran & De Strooper, 2016; Sanabria-Castro et al., 2017). Eines der pathologischen Hauptmerkmale der Alzheimer Demenz ist das Auftreten der senilen Plaques im Gehirn. Diese senilen Plaques bestehen hauptsächlich aus aggregierten  $\beta$ -Amyloid-Peptiden (R. H. Takahashi et al., 2017).  $A\beta_{1-42}$  ist eines der Peptide, die bei der Pathologie der Alzheimer Demenz eine zentrale Rolle spielen (Vadukul et al., 2017). So ist dessen Cytotoxizität in verschiedenen Zelllinien nachgewiesen, unter anderem in Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten (C Behl et al., 1994; Brera, Serrano, & de Ceballos, 2000; J. Xu et al., 2001; Yankner et al., 1989). Die molekularen Mechanismen, die hinter der Cytotoxizität von  $A\beta_{1-42}$  stehen sind noch nicht vollständig aufgeklärt, jedoch konnten bereits Zusammenhänge zwischen der cytotoxischen Wirkung von  $A\beta_{1-42}$  und einigen Signalwegen nachgewiesen werden. Zu diesen involvierten Signalwegen gehören die beeinträchtigte  $Ca^{2+}$  Homöostase, die Generierung von oxidativem Stress, die mitochondriale Dysfunktion, die NO-Bildung, die Aktivierung von Mikroglia und auch die veränderte Lipidhomöostase (Akiyama et al., 2000; Alberdi et al., 2010; Chalimoniuk et al., 2007; S L Cole & Vassar, 2006; Drews et al., 2016; Mao & Reddy, 2011; Schapira, 1996).

Bei den Veränderungen der Lipidhomöostase im Zusammenhang mit der Alzheimer Demenz sind neben dem Cholesterol auch die Isoprenoide FPP und GGPP als ausschlaggebende Faktoren identifiziert worden (S L Cole & Vassar, 2006). Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass kardiovaskuläre Erkrankungen mit Demenzerkrankungen verbunden sind und gemeinsame Risikofaktoren besitzen (Karlsson et al., 2017). So wurde bei dem Einsatz von Statinen festgestellt, dass deren protektive kardiovaskulären Effekte nicht ausschließlich durch ihre Cholesterin-senkende Wirkung zustande kommen können (Wierzbicki, Poston, & Ferro, 2003). Einige Mechanismen hinter den pleiotropen Effekten der Statine sind auf deren Inhibition der Isoprenoidsynthese zurückzuführen. Diese wiederum führt zur Inhibition intrazellulärer Signal-Proteine, wie den Rho-GTPasen Rac1, RhoA und Cdc42 (Q. Zhou & Liao, 2010). So konnte beispielsweise durch Versuche mit Statinen für die zerebrale vaskuläre Stabilität ein Zusammenhang mit der Prenylierung der GTPasen festgestellt werden (Eisa-Beygi, Hatch, Noble, Ekker, &

Moon, 2013). Somit steht auch die Regulation von Rho-GTPasen als Target der Alzheimer Demenz im Fokus der aktuellen Forschung (Aguilar, Zhu, & Lu, 2017; Jeong, Suazo, Wood, Distefano, & Li, 2018).

In der vorliegenden Arbeit wurden neben untransfizierten HEK293 Zellen auch die APP695-transfizierten HEK293-APP695wt Zellen und die APPsw-transfizierten HEK293-APPsw Zellen untersucht, um den Einfluss verschiedener APP-Transfektionen auf Cholesterol, die Isoprenoide FPP und GGPP und verschiedene kleine GTPasen zu ermitteln. Die Analyse der endogenen extrazellulären  $A\beta_{1-42}$  Gehalte zeigte, dass die HEK293-APP695wt Zellen im Vergleich zu den untransfizierten HEK293 Zellen signifikant erhöhte Gehalte an extrazellulärem  $A\beta_{1-42}$  aufweisen. Die HEK293-APPsw Zellen produzieren und sezernieren noch höhere  $A\beta_{1-42}$  Gehalte als die APP695-transfizierten Zellen. Diese Daten bestätigen früheren Untersuchungen dieser Zelllinien (I. Peters et al., 2009).

### 5.3.1 $A\beta$ und Cholesterol

Bei der Veränderung der Lipidhomöostase im Zusammenhang mit der Alzheimer Demenz besteht eine kontroverse Diskussion bezüglich Cholesterin und der Alzheimer Demenz. Die exakten Mechanismen, die hinter dem Zusammenhang zwischen Cholesterol und der Alzheimer Demenz stehen sind noch weitgehend ungeklärt. Jedoch konnten zahlreiche Studien einen klaren Zusammenhang zwischen Cholesterol und der Alzheimer Demenz aufzeigen (Czuba et al., 2017; Tindale et al., 2017; Wood, Li, Müller, & Eckert, 2014), dieser findet seinen Ursprung unter anderem im Aufbau und der Funktion der Lipidmembranen und deren Interaktion mit  $A\beta$  (Gunter P Eckert et al., 2003; Gunter P Eckert, Wood, & Müller, 2005; Fernandez-Perez et al., 2016; I. Peters et al., 2009; Wood, Li, et al., 2014; Wood et al., 2002). Epidemiologische Studien haben erhöhte Cholesterolwerte im mittleren Lebensalter als einen Risikofaktor für die Alzheimer Demenz identifiziert (Anstey, Lipnicki, & Low, 2008; Solomon, Kivipelto, Wolozin, Zhou, & Whitmer, 2009). Bei einer weiteren epidemiologischen Studie konnte gezeigt werden, dass durch die Einnahme von Statinen die Prävalenz an Alzheimer Demenz zu erkranken gesenkt werden konnte (B Wolozin, Kellman, Ruosseau, Celesia, & Siegel, 2000).

Vielzählige in vitro und Tier-Studien unterstützen die Hypothese, dass erhöhte Cholesterol-Gehalte zu einer Erhöhung von  $A\beta$  führen, beziehungsweise dass durch Erniedrigung der Cholesterolwerte  $A\beta$  reduziert wird (Gibson Wood, Eckert,



Igbavboa, & Müller, 2003; Maulik, Westaway, Jhamandas, & Kar, 2013; I. Peters et al., 2009; Reiss & Voloshyna, 2012; M. Simons et al., 1998; D L Sparks, Kuo, Roher, Martin, & Lukas, 2000).

Es existieren jedoch auch Untersuchungen über den direkten Einfluss von A $\beta$  auf die Cholesterol-Homöostase (Posse de Chaves, 2012; Wood et al., 2002). Bei den Untersuchungen des Cholesterols sind das Serum- und Plasma-Cholesterol separat zu dem Gehirn-Cholesterol zu betrachten, da die Cholesterol-Homöostasen über die Blut-Hirn-Schranke von einander getrennt sind und nicht im Gleichgewicht zueinander stehen (John M Dietschy, 2009; John M Dietschy & Turley, 2004a; Kabara, 1973; Morell & Jurevics, 1996; Vance, Hayashi, & Karten, 2005).

Untersuchungen des Gehirn-Cholesterols haben unterschiedliche Ergebnisse gezeigt. Diese reichen von keinerlei Unterschieden der Cholesterol-Gehalte in Hirngewebe zwischen Alzheimer Patienten und Kontrollen bis hin zu niedrigeren Cholesterol-Gehalten der Cerebrospinalflüssigkeit von Alzheimer Patienten im Vergleich zu den Kontrollen (G P Eckert, Cairns, Maras, Gattaz, & Müller, 2000; Gunter P Eckert et al., 2009a; Popp et al., 2012, 2013).

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigten keinerlei Unterschiede der Cholesterolgehalte in den drei untersuchten HEK293 Zelllinien. Die Cholesterolgehalte der beiden APP-transfizierten HEK293-APP695wt und HEK293-APPsw Zellen, die beide signifikant höhere A $\beta$ <sub>1-42</sub>-Gehalte aufweisen als die untransfizierten HEK293 Zellen, zeigen bezüglich der Cholesterol-Gehalte keinen Unterschied zu den untransfizierten Zellen. Auch im Zellmodell der humanen Neuroblastoma Zelllinie SH-SY5Y konnten zwischen Mock-Zellen und APP695-transfizierten SH-SY5Y APP695wt Zellen keine Unterschiede bei den Cholesterol-Gehalten festgestellt werden (Wirths, Thelen, Lütjohann, Falkai, & Bayer, 2007).

Durch die unterschiedliche Datenlage lässt sich keine eindeutige Aussage treffen. Generell ist nicht eindeutig geklärt, ob Cholesterol einen kausativen Faktor der Alzheimer Demenz darstellt, oder ob die Veränderung der Cholesterol-Homöostase seine Ursache in der Pathologie der Alzheimer Demenz hat (Wood, Li, et al., 2014).

### 5.3.2 A $\beta$ und die Isoprenoide FPP und GGPP

Die Isoprenoide FPP und GGPP sind Intermediate des Mevalonatweges. Über ihre Funktion als post-translationale Modifikation kleiner GTPasen sind sie in zahlreichen intrazellulären Schlüsselprozessen involviert (Casey, 1995a; F. L. Zhang & Casey, 1996). So spielen die Isoprenoide FPP und GGPP eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit Veränderungen der APP Prozessierung, der Aktivierung von Gliazellen, der Tau-Phosphorylierung und der synaptischen Plastizität (S L Cole & Vassar, 2006; Moutinho et al., 2017). In einem Tierversuch mit Mäusen, die A $\beta$ <sub>1-42</sub> über eine intrazerebroventrikuläre Injektion verabreicht bekamen, konnte durch Verwendung des HMG-CoA-Reduktase-Inhibitors Simvastatin eine Dosis-abhängige Neuroprotektion durch die Reduktion von FPP erzielt werden (Jin et al., 2016). In einer weiteren Tierstudie mit Mäusen, die A $\beta$ <sub>25-35</sub> injiziert bekamen, konnte durch die Behandlung mit Simvastatin und der damit einhergehenden Reduktion von FPP die beeinträchtigte Neurogenese im hippocampalen Gyrus dentatus unterbunden werden (C. Wang et al., 2015). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass in der grauen und weißen Substanz von Hirnen männlicher Alzheimer Patienten die Isoprenoide FPP und GGPP höher vorliegen als in den normalen Kontroll-Proben (Gunter P Eckert et al., 2009b). Diese initialen Befunde wurden kürzlich mit einer anderen Methode an einem größeren Patientenkollektiv bestätigt (Pelleieux et al., 2018).

Im Zuge der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch in vitro sowohl das Isoprenoid FPP als auch GGPP in den beiden APP-transfizierten HEK293 Zellen (HEK293-APP695wt und HEK293-APPsw Zellen) höher vorliegen als in den untransfizierten Zellen. Währenddessen liegen die Cholesterol-Gehalte der drei untersuchten Zelllinien auf einem vergleichbaren Niveau.

GGPP und auch Geranylgeraniol (GGOH) in Konzentrationen zwischen 10 und 40  $\mu$ g/mL erhöhen Dosis-abhängig die Gehalte von A $\beta$ <sub>1-42</sub> durch die Stimulierung der  $\gamma$ -Sekretase in CHO-APPwt Zellen (Y. Zhou et al., 2008). Sowohl die Ergänzung des Isoprenoids GGPP als auch die Ergänzung von FPP in Konzentrationen von 10  $\mu$ mol/L stimulieren die Produktion von A $\beta$ <sub>1-42</sub> und sorgen so für die Erhöhung der Gehalte von A $\beta$ <sub>1-42</sub> in H4 Zellen (Kukar et al., 2005). Auf der anderen Seite konnte im Zuge der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden, dass neurotoxisches oligomeres A $\beta$  in vitro für einen Anstieg der beiden Isoprenoide FPP und GGPP sorgt ohne den Cholesterol-Gehalt zu beeinflussen. Oligomeres A $\beta$  interagiert mit Rezeptoren an der Zelloberfläche oder der Zellmembran um in die Zelle zu gelangen und führt dort zu intrazellulärem A $\beta$  (Meng Li, Chen, Lee,

Yu, & Zhang, 2007). Der Anstieg der Isoprenoide FPP und GGPP durch oligomeres A $\beta$  in vitro ist konsistent mit den erhöhten FPP und GGPP-Gehalten in den APP-transfizierten HEK293-APP695wt und HEK293-APPsw Zellen und bestätigt die in vivo Daten der erhöhten FPP und GGPP-Gehalte in Hirnen männlicher Alzheimer Patienten (Gunter P Eckert et al., 2009b).

Es kommt hinzu, dass die Gehirnalterung als ein hoher Risikofaktor für die Alzheimer Demenz angesehen wird. In Gehirnen von gealterten Mäusen liegen die Isoprenoide FPP und GGPP ebenfalls erhöht vor, wie in der vorliegenden Arbeit und in einer vorausgehenden Publikation gezeigt wurde (Hooff et al., 2012). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Protein-Protein-Interaktion von APP und BACE1 im Alterungsprozess ansteigt und die APP-BACE1-Komplexe im zellulären Alterungsmodell akkumulieren (Zou, Yang, Zhang, & Dai, 2010).

### 5.3.3 A $\beta$ und kleine GTPasen

Veränderungen des APP Metabolismus und die Aktivität der  $\beta$ -Sekretase sowie der  $\gamma$ -Sekretase stehen im Zusammenhang mit veränderten Isoprenoid-Gehalten und der Aktivität kleiner GTPasen (Sarah L Cole et al., 2005; Y. Zhou et al., 2003). Die vorliegenden Untersuchungen zeigten, dass die HEK293-APP695wt und HEK293-APPsw Zellen im Vergleich zu den untransfizierten Zellen erhöhte Protein-Gehalte der Rho-GTPase Rac1 aufweisen. Sowohl die Protein-Gehalte im Gesamthomogenat als auch die Gehalte des Membran-gebundenen prenylierten Rac1 liegen in den APP-transfizierten HEK293-Zelllinien erhöht vor. Diese Ergebnisse decken sich mit den Resultaten der Gruppe von Manterola et al., die eine Dosis-abhängige Aktivierung von Rac1 durch A $\beta$ <sub>1-42</sub> sowohl in murinen neuronalen SN4741 Zellen und auch in Primärneuronen von E18 Sprague–Dawley Ratten zeigen konnten (Manterola et al., 2013). Und auch die Gruppe von Zhu et al. konnte nachweisen, dass bei der Alzheimer Demenz Rac1 und Cdc42 in Neuronen erhöht vorliegen (Zhu et al., 2000). Des weiteren konnte die Gruppe von Kato et al. eine reduzierte mRNA Expression des Rac1 spezifischen GTPase-activating protein (GAP)  $\alpha$ 1-Chimaerin in humanen Gehirnen von Alzheimer Patienten feststellen, was die Rolle dieses GAPs bei der Hochregulierung der Rac1 Aktivität in der Alzheimer Demenz suggeriert (Kato et al., 2015).

A $\beta$ <sub>1-42</sub> stimuliert die Aktin-Polimerisation in hippocampalen Neuronen über die RhoGTPasen Rac1 und Cdc42 (Mendoza-Naranjo et al., 2007). Und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass auch die Membran-gebundene prenylierte Rho-GTPase Cdc42 in den APP-transfizierten HEK293-APP695wt und HEK293-APPsw Zellen erhöht vorliegen.

Auch die sogenannte Rho-associated protein kinase 1 (ROCK1), die ihre Funktionalität durch die Bindung mit RhoA erhält und im Verdacht steht die A $\beta$  Produktion zu begünstigen, liegt in Gehirnen von Alzheimer Patienten erhöht vor. Das Vermindern der ROCK1 führt zu einer Reduktion der A $\beta$  Gehalte im Gehirn (Henderson et al., 2016). Die Rho-GTPase RhoA liegt in Neuronen von A $\beta$ PP Tg2576 Mäusen (schwedische Mutation) und Alzheimer Patienten erhöht vor (Huesa et al., 2010). Auch diese Effekte konnten durch die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, denn sowohl bei den HEK293-APP695wt als auch bei den HEK293-APPsw Zellen liegen die Gesamtproteingehalte und auch die Gehalte des Membran-gebundenen prenylierten RhoA im Vergleich zu den untransfizierten Zellen signifikant erhöht vor.

Bei Untersuchungen der Ras-GTPasen H-Ras, K-Ras und N-Ras in Hirngewebe von Alzheimer Patienten wurden im Vergleich zu normalen Hirnen keine Unterschiede detektiert, wobei eine erhöhte Expression von p21 Ras in neuritischen Plaques und Neuronen und Gliazellen, die nahe an Plaques lokalisiert sind, festgestellt wurden (Gärtner, Holzer, Heumann, & Arendt, 1995). Die erhöhte Expression von p21 Ras tritt jedoch nur im sehr frühen Stadium der Alzheimer Demenz auf (Gärtner, Holzer, & Arendt, 1999). Durch in vitro Versuche an den humanen neuroblastoma Zellen SH-SY5Y konnte durch Verwendung des spezifischen Ras-Inhibitors Farnesylthiosalicylsäure gezeigt werden, dass die Ras-Aktivität für die durch lösliches oligomeres A $\beta$  induzierte anormalen Wiedereintritt in den Zellzyklus und den damit verbundenen neuronalen Zelltod erforderlich ist (Koseoglu, Ozdilek, Djakbarova, & Gulusur, 2016).

Die Analysen der vorliegenden Arbeit zeigen, dass das Membran-gebundene prenylierte H-Ras in beiden APP-transfizierten HEK293 Zelllinien (HEK293-APP695wt und HEK293-APPsw Zellen) deutlich niedriger vorliegt als in den untransfizierten Zellen. Die Aktivierung der APP-Prozessierung durch Wachstumsfaktoren wie EGF und PDGF ist abhängig von der Aktivität der Ras-GTPasen (Amigoni, Ceriani, Belotti, Minopoli, & Martegani, 2011). Im Plasma von

Alzheimer Patienten liegen die Spiegel der beiden Wachstumsfaktoren EGF und PDGF niedriger vor als in der Kontrollpopulation (Björkqvist, Ohlsson, Minthon, & Hansson, 2012). Dies könnte einen möglichen Zusammenhang der niedrigeren Protein-Gehalte der membran-gebundenen prenylierten Ras-GTPase H-Ras in den beiden untersuchten APP-transfizierten HEK293 Zellen darstellen. Die Daten der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass die Aktivität von H-Ras in den APP-transfizierten HEK293 Zellen erniedrigt ist und bedürfen weiterführender Studien um die mechanistischen Zusammenhänge zu klären.

#### 5.3.4 Inhibition der $\gamma$ -Sekretase mittels DAPT

Die beiden Enzyme  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase besitzen Schlüsselrollen bei der Bildung des neurotoxischen Amyloid  $\beta$  während der APP-Prozessierung. Deshalb sollten in der vorliegenden Arbeit die Einflüsse der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase auf die Lipidhomöostase und auf die Gehalte kleiner GTPasen ermittelt werden.

Um den Einfluss der  $\gamma$ -Sekretase auf die Lipidhomöostase im Zusammenhang mit der Alzheimer Demenz zu untersuchen wurde in der vorliegenden Arbeit ein gängiger  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor verwendet. DAPT (*N*-[*N*-(3,5-Difluorphenacetyl)-*L*-alanyl]-*S*-phenylglycin *t*-butylester) ist ein Dipeptid, welches als  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor fungiert (Ž. M. Svedružić, Popović, & Šendula-Jengiđ, 2013). Die Behandlung mit DAPT wurde an den nicht neuronalen humanen HEK293 Zellen vorgenommen. Für die Untersuchungen wurden neben untransfizierten HEK293 Zellen auch die APP-transfizierten HEK293-APP695wt (APP695-transfiziert; APP Wildtyp = APPwt) und HEK293-APPsw (APPsw-transfiziert; schwedische Mutation = sw) Zellen untersucht.

Die Analyse der endogenen extrazellulären  $A\beta_{1-42}$ -Gehalte in den drei untersuchten HEK293-Zelllinien zeigte, dass die APP695-transfizierten HEK293-APP695wt Zellen im Vergleich zu den untransfizierten HEK293 Zellen signifikant erhöhte Gehalte an  $A\beta_{1-42}$  sekretieren. Die APPsw-transfizierten HEK293-APPsw Zellen wiesen noch stärker erhöhte  $A\beta_{1-42}$  Gehalte auf.

Die verschiedenen Mutationen der familiären Alzheimer Demenz weisen unterschiedliche katalytische Kapazitäten der  $\gamma$ -Sekretase auf (Chávez-Gutiérrez

et al., 2012; Z. M. Svedružić, Popović, Smoljan, & Sendula-Jengiđ, 2012). Diese unterschiedliche katalytische Enzymkapazität kann Unterschiede der Dosis-Wirkungskurve von DAPT bedingen (Ž. M. Svedružić et al., 2013; Yagishita, Morishima-Kawashima, Tanimura, Ishiura, & Ihara, 2006). Barnwell et al. konnten in den humanen APP695-transfizierten SH-SY5Y Neuroblastoma Zellen zeigen, dass niedrige DAPT-Konzentrationen von 12.5 und 25 nM bei einer Behandlung von 8 Stunden sogar zu einem Anstieg der extrazellulären  $A\beta_{1-40}$  und  $A\beta_{1-42}$  Gehalte im Zellmedium führten, wobei höhere DAPT-Konzentrationen eine eindeutige Reduktion  $A\beta_{1-42}$  Gehalte zur Folge hatten (Barnwell et al., 2014). Aus diesem Grund wurden bei den Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit Konzentrationen von 1  $\mu$ M DAPT für einen Inkubationszeit von 24 Stunden zur Inhibition der  $\gamma$ -Sekretase verwendet.

Die Inhibition der  $\gamma$ -Sekretase mittels 1  $\mu$ M DAPT zeigte eine signifikante Reduktion des  $A\beta_{1-42}$  Gehaltes in den beiden APP-transfizierten Zelllinien HEK293-APP695wt Zellen und HEK293-APPsw Zellen. Dieses Ergebnis deckt sich mit zahlreichen Publikationen über die Senkung der  $A\beta_{1-42}$  Gehalte in diversen transgenen Zell- und Tiermodellen (Dovey et al., 2001; Yagishita et al., 2006). Jedoch bewirkte die Behandlung mit dem  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor DAPT keinen signifikanten Unterschied bei den untransfizierten HEK293 Zellen zwischen den unbehandelten Kontrollen und den Inhibitor-behandelten Zellen. Diese Effekte des  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitors DAPT in den APP-transfizierten HEK293-APP695wt Zellen und den untransfizierten HEK293 Zellen wurden auch von Peters et al. beobachtet (I. Peters et al., 2009).

In humanen Mock- und APP695-transfizierten SH-SY5Y Zellen bewirkt DAPT keine Veränderung der zellulären Cholesterolgehalte, wobei verschiedene Präkursoren des Cholesterols verändert vorliegen (Wirhth et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit konnten gezeigt werden, dass die beiden Isoprenoide FPP und GGPP in den beiden APP-transfizierten HEK293-APP695wt Zellen und HEK293-APPsw Zellen signifikant höher vorliegen als in den untransfizierten HEK293 Zellen. Durch die Behandlung mit DAPT konnten die erhöhten FPP-Gehalte in beiden APP-transfizierten HEK293 Zelllinien (HEK293-APP695wt Zellen und HEK293-APPsw Zellen) reduziert werden, jedoch zeigte sich durch die in vitro Behandlung mit DAPT keine Veränderung der GGPP und Cholesterolgehalte.

Die Inhibition durch den  $\gamma$ -Sekretase Inhibitor DAPT führte zu keiner Veränderung der untersuchten Proteingehalte der Rho-GTPasen Rac1, Cdc42, RhoA, der Ras-GTPase H-Ras und der Rab-GTPase Rab3A.

Anhand von Versuchen mit dem Rac1-spezifischen Inhibitor NSC23766 wurde in hippocampalen Primärneuronen nachgewiesen, dass Rac1 an der Regulation der Transkription des APP Gens beteiligt ist (P.-L. Wang et al., 2009). Und abhängig von dem Status der Rac1-Aktivierung ändert sich die Substratspezifität der  $\gamma$ -Sekretase zwischen APP und Notch1 (Boo et al., 2008). So wurde von Boo et al. gezeigt, dass die Inhibition der Rac1-Aktivität mittels NSC23766 eine Veränderung der Substratspezifität der  $\gamma$ -Sekretase weg von APP und hin zu Notch1 verursacht. Andererseits zeigen die Daten der vorliegenden Arbeit, dass in umgekehrter Weise die direkte Inhibition der  $\gamma$ -Sekretase mittels DAPT keinen Einfluss auf das Membran-gebundene prenylierte Rac1 ausübt.

Die Daten der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass die Aktivität der  $\gamma$ -Sekretase ausschließlich einen direkten Einfluss auf das Isoprenoid FPP hat. Da alle untersuchten Rho-, Ras- und Rab-GTPasen keine Veränderung der Membran-gebundenen prenylierten Proteine durch die Inhibition der  $\gamma$ -Sekretase zeigen, deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Aktivitäten der Transferasen FTase, GGTase-I und GGTase-II von der Aktivität der  $\gamma$ -Sekretase unbeeinflusst sind. Um diese Vermutung zu bestätigen sind jedoch weitere Untersuchungen erforderlich.

Neben seiner Funktion als  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor ist DAPT auch ein spezifischer Inhibitor des Notch-Signalweges (L.-Z. Cai, Lin, Hu, & Zheng, 2008). Der Nachteil der Inhibition der  $\gamma$ -Sekretase besteht darin, dass einige  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitoren neben APP noch weitere Targets besitzen, zu welchen auch Notch und dessen Liganden gehören. So führten Untersuchungen mit dem  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor LY-411,575 in C57BL/6 und APP-transfizierten TgCRND8 Mäusen über die Inhibition der Notch-Prozessierung zu negativen Veränderungen des Immunsystems und im Gastrointestinaltrakt (G. T. Wong et al., 2004). Generell führen Veränderungen des Notch-Signalweges zu Lern- und Gedächtnis-Defiziten (Costa, Honjo, & Silva, 2003). Aus diesem Grund gibt es bereits Bestrebungen hin zu mehr selektiven Inhibitoren der Rac1-vermittelten Signalwege, die die Produktion von  $A\beta_{1-40}$  und  $A\beta_{1-42}$  inhibieren. So zeigten beispielsweise Versuche mit dem Inhibitor EHT 1864, der Rac1-Signalwege blockt, dass dieser in der Lage ist intrazelluläres und extrazelluläres  $A\beta$  zu senken, ohne die  $\gamma$ -Sekretase zu inhibieren und den Notch-

Signalweg zu beeinflussen (Désiré et al., 2005). Um spezifischere Aussagen zu treffen, sind weitere Untersuchungen nötig.

### **5.3.5 Inhibition der $\beta$ -Sekretase mittels $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV**

Die  $\beta$ -Sekretase, die auch als BACE 1 ( $\beta$ -site of APP cleaving enzyme) bezeichnet wird, ist eine integrale Membran-Aspartyl-Protease und ist die Geschwindigkeitsbestimmende Protease bei der A $\beta$ -Spaltung. So führt die Überexpression von BACE1 zu einem Anstieg von A $\beta$  und der Knockdown von BACE1 führt zu einer Erniedrigung von A $\beta$  (R Vassar et al., 1999). Für die Aktivität der  $\beta$ -Sekretase spielt ihre Sequenz-Spezifität eine wichtige Rolle und BACE1 schneidet APP mit der schwedischen Mutation bis zu 100-fach effizienter als Wildtyp-APP (APPwt) (Citron et al., 1992; Sinha et al., 1999).

Verschiedene Tierversuche an transgenen Mäusen haben gezeigt, dass es durch die Eliminierung der BACE1-Spaltung zu unerwünschten Nebeneffekten wie Krämpfen und Hypomyelinisierung kommen kann (Hitt, Jaramillo, Chetkovich, & Vassar, 2010; X. Hu et al., 2006, 2010). Mechanistisch konnten diese Effekte aber noch nicht aufgeklärt werden. Es ist jedoch bekannt, dass BACE1 an essentiellen physiologischen Prozessen wie beispielsweise an der Regulation synaptischer Funktionen beteiligt ist. So wird vermutet, dass BACE1 durch Interaktion mit der Adenylatzyklase unabhängig von A $\beta$  den cAMP/PKA/CREB Signalweg reguliert und hierüber Defizite der Gedächtnisleistung und kognitiver Fähigkeiten auslöst wie sie typischerweise in der Alzheimer Demenz auftreten (Y. Chen et al., 2012). Die  $\beta$ -Sekretase wurde lange Zeit als vielversprechendes therapeutisches Target bei der Alzheimer Demenz angesehen und bedarf vermutlich einer engen Dosisstufung des Inhibitors (Dominguez, De Strooper, & Annaert, 2001; Robert Vassar & Kandalepas, 2011). Leider schlugen in den letzten Jahren klinische Studien zahlreicher  $\beta$ -Sekretase-Inhibitoren wegen schwerwiegenden Nebenwirkungen fehl, die auf die physiologischen Funktionen der  $\beta$ -Sekretase zurückzuführen sind (MacLeod, Hillert, Cameron, & Baillie, 2015). Diese essentiellen physiologischen Funktionen der  $\beta$ -Sekretase liegen beispielsweise in der Natrium-Homöostase und der Myelinisierung (X. Hu et al., 2006; H.-K. Wong et al., 2005). Neueste Bestrebungen liegen in der Entwicklung spezieller  $\beta$ -



Sekretase-Inhibitoren, die spezifisch die APP-Prozessierung inhibieren ohne die nicht-amyloidogenen Substrate zu beeinflussen (Ben Halima et al., 2016).

Der  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV (Synonym: 3-N-[(2S,3R)-4-(Cyclopropylamino)-3-hydroxy-1-phenylbutan-2-yl]-5-[methyl(methylsulfonyl)amino]-1-N-[(1R)-1-phenylethyl]benzen-1,3-dicarboxamid; Summenformel:  $C_{31}H_{38}N_4O_5S$ ) besitzt mit einem  $IC_{50} = 15$  nM für die humane  $\beta$ -Sekretase eine hohe Wirksamkeit und gleichzeitig eine sehr hohe Selektivität im Vergleich zu anderen Aspartyl-Proteasen (Ben Halima et al., 2016; Stachel et al., 2004).

Die Inhibition der  $\beta$ -Sekretase mittels 1  $\mu$ M  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV führte zu einer signifikante Reduktion des extrazellulären  $A\beta_{1-42}$  Gehaltes in den beiden APP-transfizierten Zelllinien HEK293-APP695wt Zellen und HEK293-APPsw Zellen. Bei den untransfizierten HEK293 Zellen bewirkte der  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV keine Veränderung des  $A\beta_{1-42}$  Gehaltes. Diese Daten lassen darauf schließen, dass die  $\beta$ -Sekretase erfolgreich inhibiert wurde.

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen erstmals, dass die Inhibition der  $\beta$ -Sekretase in vitro zu einer Reduktion der beiden Isoprenoide FPP und GGPP in APP-trasfizierten Zellen führt ohne die Cholesterolgehalte zu beeinflussen.

Es existieren nur wenige Studien, die den Zusammenhang zwischen der  $\beta$ -Sekretase und der Regulation kleiner GTPasen untersucht haben.

Die GTPase Rheb ist in Hirnen mit Alzheimer Demenz herunterreguliert und es konnte gezeigt werden, dass Rheb physiologisch die Stabilität und Aktivität von BACE1 reguliert, indem die GTPase mit BACE1 interagiert und so an dem proteasomalen und lysosomaler Abbau von BACE1 beteiligt ist (Shahani et al., 2014). Außerdem kontrolliert die Rab-GTPase Rab11 das endosomale Recycling der  $\beta$ -Sekretase zur Plasmamembran und beeinflusst darüber die  $A\beta$ -Produktion (Buggia-Prévot et al., 2014; Udayar et al., 2013).

Zum ersten Mal konnte im Zuge der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Inhibition der  $\beta$ -Sekretase zur Reduktion des Membran-gebundenen prenylierten Rac1 in APP-transfizierten Zellen führt. Dies deutet auf eine reduzierte Aktivität von Rac1 hin. Die Verminderung des Membran-gebundenen prenylierten Rac1 könnte durch die Reduktion von GGPP zustande kommen, die ebenfalls durch die Inhibition der  $\beta$ -Sekretase ausgelöst wurde. Weiterführende Versuche müssen nun zeigen, wie diese Effekte mechanistisch zusammenhängen.

Interessanter Weise zeigen die Daten der vorliegenden Arbeit ebenfalls, dass sowohl das Gesamtprotein als auch das Membran-gebundene prenylierte H-Ras durch die Inhibition der  $\beta$ -Sekretase in den HEK293-APPsw Zellen erhöht sind. Da dieser Effekt nur in der APP-transfizierten HEK293-APPsw Zellen auftritt, die die schwedische Mutation aufweisen, muss es sich um einen hoch spezifischen Effekt handeln, der mit der sehr hohen Aktivität der  $\beta$ -Sekretase in diesen Zellen zusammenhängt. Denn die Aktivität der  $\beta$ -Sekretase ist abhängig von ihrer Sequenz-Spezifität, die bei der schwedischen Mutation bis zu 100-fach effizienter ist als bei dem Wildtyp-APP (APPwt) (Citron et al., 1992; Sinha et al., 1999). Da die beiden Isoprenoide FPP und GGPP durch die Inhibition der  $\beta$ -Sekretase in den APP-transfizierten Zellen reduziert werden, könnten die erhöhten Gehalte des Membran-gebundenen prenylierten H-Ras auf eine erhöhte Aktivität der FTase hindeuten, die in der Lage ist das reduzierte FPP zu kompensieren. Studien mit Simvastatin an C57BL/6 Mäusen belegen, dass die Reduzierung von FPP und die damit verbundene Inhibition der Farnesylierung, jedoch nicht der Geranylgeranylierung, die Langzeit-Potenzierung (LTP) und somit die synaptische Plastizität erhöhen (Mans et al., 2010). Außerdem konnte in einem Mausmodell der Alzheimer Demenz durch die Haplodefizienz der Farnesyltransferase, aber nicht der GGTase-I, die kognitive Funktionen verbessert und die A $\beta$ -Ablagerungen und Neuroinflammation gemindert werden (S. Cheng et al., 2013b). Farnesyltransferase-Inhibitoren werden als potentielle therapeutische Agentien für die Behandlung der Alzheimer Demenz vorgeschlagen, aber erste positive Ergebnisse konnten bislang nicht erklärt werden (D. A. Hottman & Li, 2014). Die Daten der vorliegenden Arbeit liefern möglicherweise einen weiteren Hinweis für eine wichtige Rolle der Farnesyltransferase im Zusammenhang mit der Alzheimer Demenz. Diese Vermutung muss in nachfolgenden Untersuchungen geklärt werden.

Der Zusammenhang zwischen den Isoprenoiden FPP und GGPP, der Rho- und Ras-GTPasen und der Alzheimer Demenz ist ein sehr komplexes Gefüge und noch weit davon entfernt vollständig aufgeklärt zu sein. Zusammengefasst zeigen die Daten der vorliegenden Arbeit anhand von in vitro Studien, dass sowohl die  $\beta$ - als auch die  $\gamma$ -Sekretase an der Regulation der Isoprenoide FPP und GGPP beteiligt sind. Generell liegen die beiden Isoprenoide FPP und GGPP in APP-transfizierten HEK293 Zellen erhöht vor. Es zeigt sich anhand der Inhibition der beiden Sekretasen, dass die Aktivität der  $\gamma$ -Sekretase ausschließlich mit dem Gehalt des

Isoprenoids FPP korreliert und keinen Einfluss auf GGPP hat, wobei die reduzierte Aktivität der  $\beta$ -Sekretase zur Reduktion von FPP und GGPP führt.

In den untersuchten APP-transfizierten HEK293 Zellen liegen die Membran-gebundenen prenylierten Rho-GTPasen Rac1, Cdc42 und RhoA erhöht vor. Das Membran-gebundene prenylierte H-Ras kommt aber in beiden APP-transfizierten HEK293 Zelllinien in deutlich niedrigeren Mengen vor als in den untransfizierten Zellen.

Während die Inhibition der  $\gamma$ -Sekretase keine Veränderung der Proteingehalte der Rho-GTPasen Rac1, Cdc42, RhoA, der Ras-GTPase H-Ras und der Rab-GTPase Rab3A verursacht, führt die Inhibition der  $\beta$ -Sekretase zu Veränderungen bei Rac1 und H-Ras. So führt sie in APP-transfizierten Zellen zur Reduktion des Membran-gebundenen prenylierten Rac1, wobei das Membran-gebundene prenylierte H-Ras lediglich in den APP-transfizierten HEK293-APPsw Zellen durch die Inhibition der  $\beta$ -Sekretase reduziert wird.

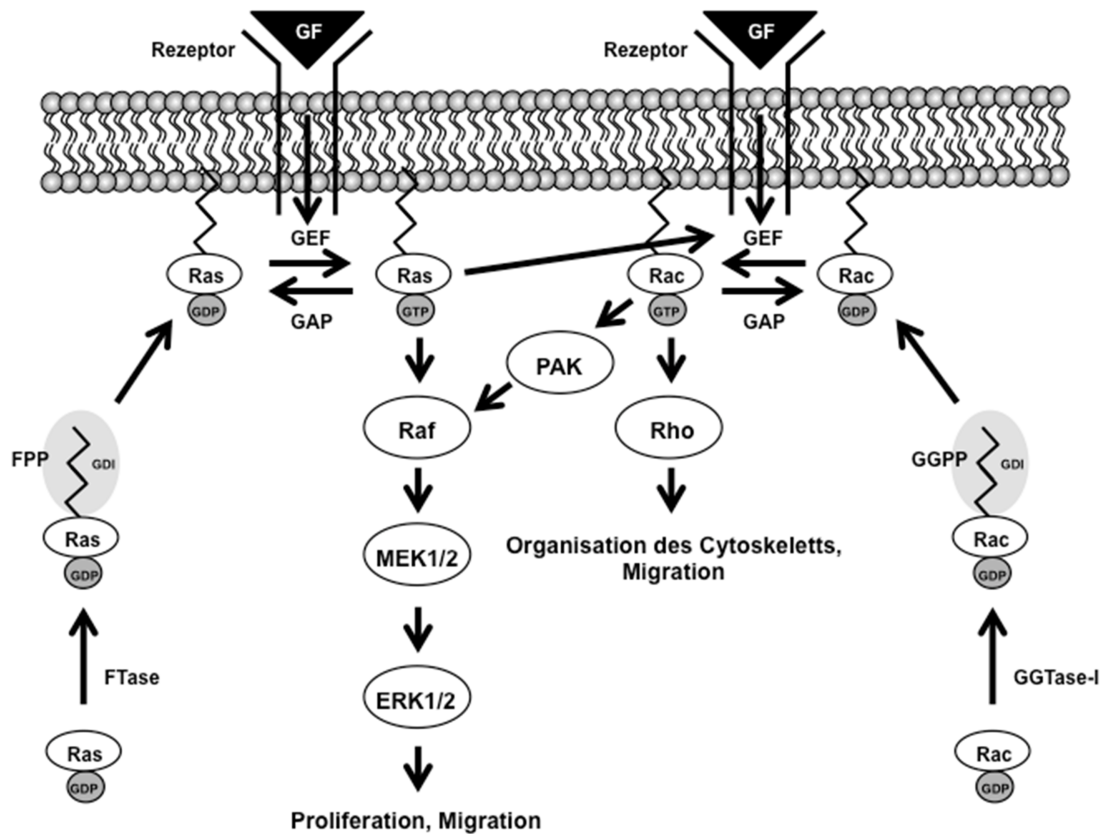
Es konnte somit ein klarer Zusammenhang zwischen der Regulation der beiden Sekretasen  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase, den Isoprenoiden FPP und GGPP und der Regulation der Rho-GTPase Rac1 und der Ras-GTPase H-Ras aufgezeigt werden.

## 5.4 Glioblastoma multiforme

Die konstitutive Überaktivierung von Signalwegen, die zur Zellproliferation, Migration und Invasion führen, sind die ausschlaggebenden Prozesse in der Gliomaentwicklung und deren Progression. Die Isoprenoide FPP und GGPP sind Intermediate des Mevalonatweges und in diese Schlüsselprozesse über ihre Funktion als post-translationale Modifikation kleiner GTPasen involviert (F. L. Zhang & Casey, 1996). Die kleinen GTPasen fungieren als molekulare Schalter in einer Vielzahl intrazellulärer Signalwege und aktivieren direkt nachgeschaltete Effektoren wie beispielsweise RAF, MEK, ERK und haben dabei einen umfassenden Einfluss auf die Onkogenese und die Konstitution von Tumoren (Lo, 2010b). Beispielsweise hat die phosphorylierte Form von ERK Tumor-promovierende Eigenschaften indem sie das Tumor-Wachstum stimuliert (Peñaranda Fajardo, Meijer, & Kruyt, 2016).

FPP (15 Carbon-Isoprenoid) und GGPP (20 Carbon-Isoprenoid) werden katalysiert von den Geranylgeranyltransferasen (GGTase) und der Farnesyltransferase (FTase) kovalent an den C-terminalen Cystein-Rest des CAAX Motivs kleiner GTPasen gebunden (Swanson & Hohl, 2006). Die Prenylierung der kleinen GTPasen ist erforderlich für ihre Insertion in Membranen, wo ihre Transformation zwischen der inaktiven GDP-gebundenen und der aktiven GTP-gebundenen Form stattfindet (Samuel & Hynds, 2010).

Statine inhibieren die HMG-CoA-Reduktase, das Geschwindigkeits-bestimmende Enzym des Mevalonatweges. Im Vergleich zu nicht malignen Zellen scheinen Statine in malignen Zellen effektiver die Proliferation zu hemmen und Apoptose zu induzieren (W. W. L. Wong et al., 2002). Diese Wirkung der Statine ist auf ihre Cholesterol-unabhängigen Effekte zurückzuführen, die möglicherweise aus der Veränderung der Isoprenoid-Gehalte von FPP und GGPP resultiert (Ling & Tejada-Simon, 2016). Jedoch gab es bis dato eine Lücke bezüglich direkt korrelierender Gehalte von Isoprenoiden und prenylierten GTPasen in der GBM. Frühere Studien fokussierten sich bereits auf funktionale Effekte des Statins Lovastatin in der GBM, hierbei wurden die Inhibition der Zellproliferation und der Migration betrachtet, sowie die Induktion der Apoptose (Bouterfa et al., 2000; Crick et al., 1998; F. Schmidt et al., 2001). Die Effekte der Statine wurden sowohl in Zellmodellen der GBM als auch im Tierversuch ausgiebig untersucht (Swanson & Hohl, 2006).



**Abbildung 56. Vereinfachter Signalweg über die Regulation der Migration und Proliferation in GBM.** Inaktive GDP-gebundene Ras-GTPasen werden bevorzugt mit FPP durch die Farnesyltransferase (FTase) prenyliert. Diese Prenylierung ist notwendig für die Insertion in der Membran, wo die GTPase durch GEFs (guanine nucleotide exchange factors) aktiviert wird. Die GEFs selbst werden aufgrund der Bindung eines Wachstumsfaktors (growth factor = GF) an einen adequate Receptor aktiviert. Die Aktivierung der GDP-gebundenen Ras-GTPase resultiert aus der Phosphorylierung zur GTP-gebundenen Form. Die aktive Ras-GTPase kann durch diverse GAPs (GTPase-activating proteins) deaktiviert werden. Die aktiven Ras-GTPasen, besonders H-Ras, können nachgeschaltete Signalkaskaden unter anderem über Raf, MEK und ERK aktivieren, die letztendlich zu einer gesteigerten Proliferation und Migration führen. Rac-GTPasen, wie beispielsweise Rac1, werden bevorzugt mit GGPP durch die Geranylgeranyltransferase-I (GGTase-I) prenyliert. Der spezifische Rac1 GEF Tiam1 zum Beispiel kann entweder durch die Bindung eines Wachstumsfaktors an den spezifischen Receptor (Bindung von BDNF an den TrkB-Rezeptor) oder durch eine aktivierte Ras-GTPase aktiviert werden. Das aktive Membran-gebundene Rac1-GTP ist in der Lage weitere Rho-GTPasen zu aktivieren und hat dadurch Prozesse der Organisation des Cytoskeletts und der Migration zur Folge. Außerdem ist das aktive Rac1-GTP im Stande über die Aktivierung der PAK (p21-activated kinase) den Raf/MEK/ERK Signalweg zu aktivieren und so zu einer erhöhten Proliferation und Migration zu führen.

In der vorliegenden Arbeit konnten frühere Daten über die Suppression der Migration, Invasion und Proliferation durch Statine (Bouterfa et al., 2000; Gliemroth, Zulewski, Arnold, & Terzis, 2003; H. Wu et al., 2009) in weiteren Zellmodellen der GBM bestätigt werden. Weiterhin führte die *in vitro* Inhibition der HMG-CoA Reduktase mittels Lovastatin in den untersuchten Glioblastoma-Zelllinien U87 und U343, die für die vorliegende Arbeit durchgeführt wurde, zu einer signifikanten Reduktion der Gehalte der beiden Isoprenoide FPP und GGPP. Es konnte gezeigt werden, dass die Reduktion der Isoprenoide FPP und GGPP

die Inhibition der Prenylierung und Insertion in der Zellmembran der beiden GTPasen H-Ras und Rac1 zur Folge hatte. Diese Daten sind konform mit einer weiteren Publikation über die Inhibition der Prenylierung von Ras und Rho-Proteinen durch Statine (Soma, Corsini, & Paoletti, 1992). Es existiert eine Studie, die einen anti-onkogenen Effekt für Digeranylbisphosphonat aufzeigt, welches in einer Brustkrebs-Zelllinie für die Abreicherung von GGPP verantwortlich ist (Dudakovic et al., 2008). Die Gruppe von Yanae et al. zeigten, dass Mevastatin, Fluvastatin und Simvastatin über die Suppression der ERK1/2 Aktivierung und die Inhibition der GGPP-Synthese in C6 Glioma-Zellen Apoptose induzierte (Yanae et al., 2011). Hierbei wurden Konzentrationen von bis zu 5 µM Mevastatin, 5 µM Fluvastatin und 10 µM Simvastatin für eine Inkubation von 72 Stunden verwendet. Für die Versuche der vorliegenden Arbeit wurde eine Konzentration von 10 µM Lovastatin für eine Inkubationsdauer von 24 Stunden gewählt, da diese in Vorversuchen an humanen Astrozyten und SH-SY5Y Zellen keine apoptotische Wirkung zeigte.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass durch die Lovastatin-Behandlung der untersuchten GBM-Zelllinien U87 und U343 die reduzierten GGPP-Gehalte von einer reduzierten ERK Phosphorylierung begleitet werden. Diese Daten implizieren die Beteiligung von GGPP und der Prenylierung von Rho-GTPasen bei der Aktivierung von ERK. Allerdings könnten auch andere Statin-induzierte Effekte wie beispielsweise reduzierte Cholesterolgehalte (H. Y. Li, Appelbaum, Willman, Zager, & Banker, 2003), die reduzierte N-gebundene Glykosylierung (Larsson, 1996), die Begünstigung des Zellzyklus-Arrests (Hirai et al., 1997; Rao, Lowe, Herliczek, & Keyomarsi, 1998), die reduzierte MT1-MMP (membrane type 1 metalloproteinase) Expression in Mikroglia (Yongjun et al., 2013) und die Inhibition des Proteasoms (B. Kumar et al., 2002; Rao et al., 1999) an dem anti-onkogenen Effekt, der in der vorliegenden Studie beobachtet wurde, beteiligt sein.

Das natürlich vorkommende Monoterpen Perillylalkohol wurde als potentiell anti-onkogenes Agens evaluiert (Clovis Orlando da Fonseca et al., 2016; X.-G. Lu et al., 2004; Swanson & Hohl, 2006; M. Xu et al., 2004; Yuri et al., 2004). Perillylalkohol inhibiert die FTase, die GGTase-I und die GGTase-II in vitro (End, 1999; Ren et al., 1997; Unlu et al., 2000). In einer Vielzahl von Publikationen konnte die Inhibition der Prenylierung mit GGPP und FPP durch Perillylalkohol nachgewiesen werden (Gelb et al., 1995; Hardcastle et al., 1999; Holstein & Hohl,

2003; Ren et al., 1997). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen, dass Perillylalkohol die Farnesylierung und Geranylgeranylierung kleiner GTPasen inhibiert.

Nachfolgend wird die Aktivierung von ERK und weiteren nachgeschalteten Effektoren inhibiert. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Inhibition der ERK-Phosphorylierung durch Perillylalkohol stimmt mit Proteomic Daten über den Effekt von Perillylalkohol in der GBM Zelllinie A172 überein, denn auch in dieser GBM Zelllinie konnte die Inhibition der ERK Phosphorylierung mittels Perillylalkohol nachgewiesen werden (Fischer et al., 2010). Es existieren noch weitere anti-onkogene Mechanismen und Effekte, die durch Perillylalkohol hervorgerufen werden, wie beispielsweise die Induktion des Zellzyklus-Arrests (Bardon, Foussard, Fournel, & Loubat, 2002; Clark, Perman, Sahin, Jenkins, & Elegbede, 2002), die Inhibition der Na/K-ATPase (D. G. Garcia et al., 2010; Lefranc et al., 2013) und das Auslösen von TGF- $\beta$  vermittelten Signalwegen (Clovis O da Fonseca et al., 2011; Clovis Orlando da Fonseca, Linden, et al., 2008; Fernandes et al., 2005). Auch diese Wirkungen von Perillylalkohol könnten an den in der vorliegenden Arbeit beobachteten anti-onkogenen Effekten beteiligt sein.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Perillylalkohol in den beiden GBM Zelllinien U87 und U343 zwar die FTase inhibiert, aber keine Veränderung der Gehalte des Isoprenoids FPP verursacht. Weiterhin inhibiert Perillylalkohol die GGTase und sorgt für eine Erhöhung der Gehalte des Isoprenoids GGPP in U343 Zellen, was auf eine Substrat-Akkumulation hinweisen könnte.

In vivo wird Perillylalkohol schnell zu Perillylsäure metabolisiert und es besteht die Vermutung, dass es sich bei der Perillylsäure um die aktive Komponente des Monoterpens handelt (Gelb et al., 1995; Swanson & Hohl, 2006). Demzufolge könnte die niedrigere Metabolisierungsrate in vitro die Erklärung für die relativ hohen Konzentrationen an Perillylalkohol darstellen, die für das Erzielen der anti-onkogenen Effekte in den untersuchten GBM Zelllinien erforderlich waren. Wobei die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Perillylalkohol-Konzentrationen im Vergleich zu zahlreichen anderen Publikationen eher im niedrigen Bereich liegen (Berchtold et al., 2005; Cerda et al., 1999; Cho et al., 2012; Fernandes et al., 2005; Fischer et al., 2010; D. G. Garcia et al., 2010; Gómez-Contreras et al., 2006; Hudes et al., 2000; Rajesh et al., 2003; Sundin et al., 2013, 2012; Yeruva et al., 2007; Yuri et al., 2004).

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit auf, dass sowohl Lovastatin als auch Perillylalkohol die Signaltransduktion des Ras-Raf-MEK-ERK Signalweges in den Glioblastoma-Zelllinien U87 und U343 beeinträchtigt. Beide Substanzen beeinflussen die post-translationale Modifikation der beiden GTPasen H-Ras und Rac1. Lovastatin sorgt für eine Reduktion der Isoprenoid-Substrate der Transferase, die die Prenylierung der GTPasen katalysiert. Und Perillylalkohol inhibiert die Transferasen selbst. Die Daten der vorliegenden Arbeit unterstreichen den Einfluss der Isoprenoide FPP und GGPP durch ihre Funktion als post-translationale Modifikation kleiner GTPasen, die bei der Proliferation, Migration und Invasion von GBM Zellen involviert sind.



## 6 Zusammenfassung

FPP und GGPP sind Intermediate des Mevalonat-Weges und fungieren als post-translationale Modifikation kleiner GTPasen. Die Prenylierung kleiner GTPasen erfolgt katalysiert von spezifischen Prenyltransferasen und ist notwendig um die kleinen GTPasen in Membranen zu verankern, wo ihre Aktivierung stattfindet. Zu den intrazellulären Funktionen der GTPasen gehören unter anderem der Aufbau des Cytoskeletts, das neuronale Zellwachstum, die Leitung und Ausläuferbildung von Axonen, das Dendritenwachstum, die Synapsenformation, die synaptische Plastizität und die Apoptose. Diese Funktionen spielen in der Gehirnalterung sowie in neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer Demenz (AD) und auch bei der Glioblastoma multiforme (GBM) eine wichtige Rolle.

Im Zuge einer *in vivo* Studie an C57BL/6 Mäusen konnten in der vorliegenden Arbeit altersbedingte Veränderungen der Lokalisation verschiedener Rho- und Rab-GTPasen in Membran- und Cytosol-Präparationen sowie der GGTase-I in Gehirnen gealterter Tiere gezeigt werden. Die zelluläre Lokalisation der Rho GTPasen Rac1, RhoA und Cdc42 verschiebt sich im Alter zu reduzierten Membran-gebundenen und erhöhten cytosolischen Gehalten. Dies ist mit einer Reduktion der Protein- und mRNA- Gehalte des Enzyms GGTase-I $\beta$  assoziiert, der Untereinheit der GGTase-I, die die Bindung des Isoprenoids GGPP an die Rho-GTPasen reguliert. Diese wiederum korrelieren direkt mit der altersbedingten Reduktion der relativen GGTase-Aktivität. Die *in vitro* Inhibition der GGTase-I mittels GGTI-2133 an SH-SY5Y Zellen erwies sich als Modell, welches die gleichen Effekte wie die gealterten Gehirne *in vivo* zeigt.

7, 8-Dihydroxyflavon (7, 8-DHF) ist ein natürlich vorkommendes Flavon, welches als hoch affiner selektiver TrkB-Rezeptor-Agonist fungiert und hierdurch wie das Neurotrophin BDNF das Überleben von Neuronen, deren Differenzierung, synaptische Plastizität und Neurogenese vermittelt. *In vivo* verursacht die orale Gabe von 7, 8-Dihydroxyflavon in Gehirnen alter Tiere eine Abnahme des Isoprenoids GGPP, die Zunahme der prenylierten Membran-gebundenen GTPase Rac1 und eine Reduktion des Gehaltes an Membran-gebundenem Rab3A auf das Niveau der Gehalte in den Gehirnen der jungen Kontroll-Tiere. Das Neurotrophin BDNF interagiert mit dem TrkB-Rezeptor und ist in der Lage direkt an den Rac1-spezifischen GEF Tiam1 zu binden, wodurch dieser aktiviert wird und Veränderungen der zellulären Morphologie der betroffenen Neurone induziert. Während das Alter und die orale Gabe von 7, 8-Dihydroxyflavon *in vivo* keine

Effekte auf die Proteingehalte von BDNF und TrkB in der Tierstudie aufzeigten, konnte eine alterbedingte Reduktion von Tiam1 im Hirngewebe detektiert werden, die wiederum durch 7, 8-Dihydroxyflavon aufgehoben werden konnte.

Die Isoprenoide FPP und GGPP, sowie die Regulation kleiner GTPasen spielen auch eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit Veränderungen der APP-Prozessierung in der molekularen Pathogenese der AD. Bei der APP-Prozessierung sind die beiden Sekretasen  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase für die Bildung des  $\beta$ -Amyloid-Peptids verantwortlich. *In vitro* Studien mit dem  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV und dem  $\gamma$ -Sekretase-Inhibitor DAPT an untransfizierten und APP-transfizierten HEK293 Zellen (HEK293-APP695wt und HEK293-APPsw Zellen) konnten zeigen, dass sowohl die  $\beta$ - als auch die  $\gamma$ -Sekretase an der Regulation der Isoprenoide FPP und GGPP beteiligt sind. FPP und GGPP liegen in APP-transfizierten HEK293 Zellen erhöht vor. Die Inhibition der  $\beta$ -Sekretase führt zur Reduktion von FPP und GGPP. Durch die Inhibition der  $\gamma$ -Sekretase wird ausschließlich FPP reduziert. Weiterhin liegen in APP-transfizierten HEK293 Zellen die Membran-gebundenen prenylierten Rho-GTPasen Rac1, Cdc42 und RhoA erhöht vor. Das Membran-gebundene prenylierte H-Ras kommt jedoch in APP-transfizierten Zellen im Vergleich zu untransfizierten HEK293 Zellen in deutlich niedrigeren Mengen vor. Die Inhibition der  $\beta$ -Sekretase bedingt die Reduktion von Membran-gebundenem prenylierten Rac1 und auch von Membran-gebundenem H-Ras in HEK293-APPsw Zellen.

Veränderungen von Signaltransduktionswegen, die durch kleine GTPasen vermittelt werden, haben sich auch bei der GBM als zentraler Teil der molekularen Pathogenese herausgestellt. Hierbei ist die Prenylierung durch FPP und GGPP die Voraussetzung für die Membran-Insertion und onkogenen Funktion der Ras- und Rho-Proteine über die Stimulierung des Ras-Raf-MEK-ERK Signalweges. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der HMG-CoA-Reduktase Inhibitor Lovastatin die Bildung der beiden Isoprenoide FPP und GGPP in U87 und U343 Glioblastoma Zellen verringert und hierdurch die Isoprenylierung von H-Ras und Rac1 reduziert. Das natürlich vorkommende Monoterpen Perillylalkohol hingegen inhibiert die Prenyltransferasen FTase und GGTase und verändert dadurch die post-translationalen Prenylierung der GTPasen Rac1 und H-Ras in U87 und U343 Zellen ohne die Isoprenoide FPP und GGPP signifikant zu beeinflussen. Jedoch bewirkt Perillylalkohol in U343 Zellen eine Erhöhung des GGPPs. Beide Substanzen bewirkten die Reduktion der ERK-Phosphorylierung und der Migration, Invasion und Proliferation der untersuchten U87 und U343 Glioblastoma Zellen.

## Bibliographie

- Acosta, M. J., Vazquez Fonseca, L., Desbats, M. A., Cerqua, C., Zordan, R., Trevisson, E., & Salviati, L. (2016). Coenzyme Q biosynthesis in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1857*(8), 1079–1085. <http://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.03.036>
- Acquati, F., Accarino, M., Nucci, C., Fumagalli, P., Jovine, L., Ottolenghi, S., & Taramelli, R. (2000). The gene encoding DRAP (BACE2), a glycosylated transmembrane protein of the aspartic protease family, maps to the down critical region. *FEBS Letters*, *468*(1), 59–64. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10683441>
- Adra, C. N., Manor, D., Ko, J. L., Zhu, S., Horiuchi, T., Van Aelst, L., Lim, B. (1997). RhoGDIgamma: a GDP-dissociation inhibitor for Rho proteins with preferential expression in brain and pancreas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(9), 4279–84. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=20713&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Afshordel, S., Wood, W. G., Igbavboa, U., Muller, W. E., & Eckert, G. P. (2014). Impaired geranylgeranyltransferase-I regulation reduces membrane-associated Rho protein levels in aged mouse brain. *Journal of Neurochemistry*, *129*(4), 732–42. <http://doi.org/10.1111/jnc.12654>
- Aguilar, B. J., Zhu, Y., & Lu, Q. (2017). Rho GTPases as therapeutic targets in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research & Therapy*, *9*(1), 97. <http://doi.org/10.1186/s13195-017-0320-4>
- Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G. M., Wyss-Coray, T. (2000). Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, *21*(3), 383–421. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10858586>
- Alberdi, E., Sánchez-Gómez, M. V., Cavaliere, F., Pérez-Samartín, A., Zugaza, J. L., Trullas, R., ... Matute, C. (2010). Amyloid beta oligomers induce Ca<sup>2+</sup> dysregulation and neuronal death through activation of ionotropic glutamate receptors. *Cell Calcium*, *47*(3), 264–72. <http://doi.org/10.1016/j.ceca.2009.12.010>
- Albini, A., Iwamoto, Y., Kleinman, H. K., Martin, G. R., Aaronson, S. A., Kozlowski, J. M., & McEwan, R. N. (1987). A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Research*, *47*(12), 3239–45. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2438036>
- Alcázar-Fabra, M., Navas, P., & Brea-Calvo, G. (2016). Coenzyme Q biosynthesis and its role in the respiratory chain structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1857*(8), 1073–1078. <http://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.03.010>
- Alexander, S., & Friedl, P. (2012). Cancer invasion and resistance: interconnected processes of disease progression and therapy failure. *Trends in Molecular Medicine*, *18*(1), 13–26. <http://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.11.003>

- Alexandrov, K., Horiuchi, H., Steele-Mortimer, O., Seabra, M. C., & Zerial, M. (1994). Rab escort protein-1 is a multifunctional protein that accompanies newly prenylated rab proteins to their target membranes. *The EMBO Journal*, *13*(22), 5262–73. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=395482&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Allen, J. A., Halverson-Tamboli, R. A., & Rasenick, M. M. (2007). Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. *Nature Reviews Neuroscience*, *8*(2), 128–140. <http://doi.org/10.1038/nrn2059>
- Allen, S. J., Watson, J. J., Shoemark, D. K., Barua, N. U., & Patel, N. K. (2013). GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. *Pharmacology & Therapeutics*, *138*(2), 155–75. <http://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.01.004>
- Almeida, C. G., Takahashi, R. H., & Gouras, G. K. (2006). Beta-amyloid accumulation impairs multivesicular body sorting by inhibiting the ubiquitin-proteasome system. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *26*(16), 4277–88. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5078-05.2006>
- Alory, C., & Balch, W. E. (2001). Organization of the Rab-GDI/CHM superfamily: the functional basis for choroideremia disease. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, *2*(8), 532–43. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11489211>
- Alsina, B., Vu, T., & Cohen-Cory, S. (2001). Visualizing synapse formation in arborizing optic axons in vivo: dynamics and modulation by BDNF. *Nature Neuroscience*, *4*(11), 1093–101. <http://doi.org/10.1038/nn735>
- Amigoni, L., Ceriani, M., Belotti, F., Minopoli, G., & Martegani, E. (2011). Activation of amyloid precursor protein processing by growth factors is dependent on Ras GTPase activity. *Neurochemical Research*, *36*(3), 392–8. <http://doi.org/10.1007/s11064-010-0343-8>
- Anant, J. S., Desnoyers, L., Machius, M., Demeler, B., Hansen, J. C., Westover, K. D., ... Seabra, M. C. (1998). Mechanism of Rab geranylgeranylation: formation of the catalytic ternary complex. *Biochemistry*, *37*(36), 12559–68. <http://doi.org/10.1021/bi980881a>
- Andero, R., Heldt, S. A., Ye, K., Liu, X., Armario, A., & Ressler, K. J. (2011). Effect of 7,8-dihydroxyflavone, a small-molecule TrkB agonist, on emotional learning. *The American Journal of Psychiatry*, *168*(2), 163–72. <http://doi.org/10.1176/appi.ajp.2010.10030326>
- Anderson, B., & Rutledge, V. (1996). Age and hemisphere effects on dendritic structure. *Brain : A Journal of Neurology*, *119* ( Pt 6), 1983–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9010002>
- Andersson, M., Aberg, F., Teclebrhan, H., Edlund, C., & Appelkvist, E. L. (1995). Age-dependent modifications in the metabolism of mevalonate pathway lipids in rat brain. *Mechanisms of Ageing and Development*, *85*(1), 1–14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8789251>

- Andersson, M., Elmberger, P. G., Edlund, C., Kristensson, K., & Dallner, G. (1990). Rates of cholesterol, ubiquinone, dolichol and dolichyl-P biosynthesis in rat brain slices. *FEBS Letters*, *269*(1), 15–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2387395>
- Anstey, K. J., Lipnicki, D. M., & Low, L.-F. (2008). Cholesterol as a risk factor for dementia and cognitive decline: a systematic review of prospective studies with meta-analysis. *The American Journal of Geriatric Psychiatry: Official Journal of the American Association for Geriatric Psychiatry*, *16*(5), 343–54. <http://doi.org/10.1097/JGP.0b013e31816b72d4>
- Arancio, O., Zhang, H. P., Chen, X., Lin, C., Trinchese, F., Puzzo, D., Du Yan, S. S. (2004). RAGE potentiates Abeta-induced perturbation of neuronal function in transgenic mice. *The EMBO Journal*, *23*(20), 4096–105. <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600415>
- Araujo, D. M., Chabot, J. G., & Quirion, R. (1990). Potential neurotrophic factors in the mammalian central nervous system: functional significance in the developing and aging brain. *International Review of Neurobiology*, *32*, 141–74. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1981884>
- Asami-Odaka, A., Ishibashi, Y., Kikuchi, T., Kitada, C., & Suzuki, N. (1995). Long amyloid beta-protein secreted from wild-type human neuroblastoma IMR-32 cells. *Biochemistry*, *34*(32), 10272–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7640283>
- Bababeygy, S. R., Polevaya, N. V., Youssef, S., Sun, A., Xiong, A., Prugpichailers, T., Tse, V. (2009). HMG-CoA reductase inhibition causes increased necrosis and apoptosis in an in vivo mouse glioblastoma multiforme model. *Anticancer Research*, *29*(12), 4901–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20044596>
- Babri, S., Amani, M., Mohaddes, G., Alihemmati, A., & Ebrahimi, H. (2012). Effect of Aggregated  $\beta$ -Amyloid (1-42) on Synaptic Plasticity of Hippocampal Dentate Gyrus Granule Cells in Vivo. *BioImpacts: BI*, *2*(4), 189–94. <http://doi.org/10.5681/bi.2012.022>
- Bahr, B. A., & Bendiske, J. (2002). The neuropathogenic contributions of lysosomal dysfunction. *Journal of Neurochemistry*, *83*(3), 481–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12390510>
- Bardon, S., Foussard, V., Fournel, S., & Loubat, A. (2002). Monoterpenes inhibit proliferation of human colon cancer cells by modulating cell cycle-related protein expression. *Cancer Letters*, *181*(2), 187–94. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12175534>
- Barnwell, E., Padmaraju, V., Baranello, R., Pacheco-Quinto, J., Crosson, C., Ablonczy, Z., Sambamurti, K. (2014). Evidence of a novel mechanism for partial  $\gamma$ -secretase inhibition induced paradoxical increase in secreted amyloid  $\beta$  protein. *PLoS One*, *9*(3), e91531. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0091531>
- Barone, E., Di Domenico, F., & Butterfield, D. A. (2013). Statins more than cholesterol lowering agents in Alzheimer disease: Their pleiotropic functions as potential therapeutic targets. *Biochemical Pharmacology*. <http://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.10.030>

- Barykin, E. P., Mitkevich, V. A., Kozin, S. A., & Makarov, A. A. (2017). Amyloid  $\beta$  Modification: A Key to the Sporadic Alzheimer's Disease? *Frontiers in Genetics*, 8, 58. <http://doi.org/10.3389/fgene.2017.00058>
- Baumketner, A., Bernstein, S. L., Wyttenbach, T., Bitan, G., Teplow, D. B., Bowers, M. T., & Shea, J.-E. (2006). Amyloid beta-protein monomer structure: a computational and experimental study. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 15(3), 420–8. <http://doi.org/10.1110/ps.051762406>
- Bax, B. (1998). Domains of rasGAP and rhoGAP are related. *Nature*, 392(6675), 447–8. <http://doi.org/10.1038/33037>
- Behl, C. (2012). Brain aging and late-onset Alzheimer's disease: many open questions. *International Psychogeriatrics / IPA*, 24 Suppl 1, S3-9. <http://doi.org/10.1017/S104161021200052X>
- Behl, C., Davis, J. B., Lesley, R., & Schubert, D. (1994). Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell*, 77(6), 817–27. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8004671>
- Behnia, R., & Munro, S. (2005). Organelle identity and the signposts for membrane traffic. *Nature*, 438(7068), 597–604. <http://doi.org/10.1038/nature04397>
- Bell, R. D. (2012). The imbalance of vascular molecules in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 32(3), 699–709. <http://doi.org/10.3233/JAD-2012-121060>
- Ben Halima, S., Mishra, S., Raja, K. M. P., Willem, M., Baici, A., Simons, K., Rajendran, L. (2016). Specific Inhibition of  $\beta$ -Secretase Processing of the Alzheimer Disease Amyloid Precursor Protein. *Cell Reports*, 14(9), 2127–41. <http://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.01.076>
- Bendiske, J., & Bahr, B. A. (2003). Lysosomal activation is a compensatory response against protein accumulation and associated synaptopathogenesis--an approach for slowing Alzheimer disease? *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 62(5), 451–63. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12769185>
- Benowitz, L. I., Perrone-Bizzozero, N. I., Finklestein, S. P., & Bird, E. D. (1989). Localization of the growth-associated phosphoprotein GAP-43 (B-50, F1) in the human cerebral cortex. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 9(3), 990–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2466968>
- Benowitz, L. I., & Routtenberg, A. (1997). GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends in Neurosciences*, 20(2), 84–91. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9023877>
- Berchtold, C. M., Chen, K.-S., Miyamoto, S., & Gould, M. N. (2005). Perillyl alcohol inhibits a calcium-dependent constitutive nuclear factor-kappaB pathway. *Cancer Research*, 65(18), 8558–66. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-4072>
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Gatto, G. J., & Stryer, L. (2018). Stryer Biochemie. In *Stryer Biochemie* (pp. 947–978). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. [http://doi.org/10.1007/978-3-662-54620-8\\_27](http://doi.org/10.1007/978-3-662-54620-8_27)

- Berkemeier, L. R., Winslow, J. W., Kaplan, D. R., Nikolics, K., Goeddel, D. V., & Rosenthal, A. (1991). Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trk and trkB. *Neuron*, *7*(5), 857–66. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1742028>
- Bernards, A., & Settleman, J. (2004). GAP control: regulating the regulators of small GTPases. *Trends in Cell Biology*, *14*(7), 377–85. <http://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.05.003>
- Beyreuther, K., & Masters, C. L. (1991). Amyloid precursor protein (APP) and beta A4 amyloid in the etiology of Alzheimer's disease: precursor-product relationships in the derangement of neuronal function. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, *1*(4), 241–51. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1669714>
- Bi, X., Gall, C. M., Zhou, J., & Lynch, G. (2002). Uptake and pathogenic effects of amyloid beta peptide 1-42 are enhanced by integrin antagonists and blocked by NMDA receptor antagonists. *Neuroscience*, *112*(4), 827–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12088742>
- Bibel, M., Hoppe, E., & Barde, Y. A. (1999). Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR. *The EMBO Journal*, *18*(3), 616–22. <http://doi.org/10.1093/emboj/18.3.616>
- Bien-Ly, N., Gillespie, A. K., Walker, D., Yoon, S. Y., & Huang, Y. (2012). Reducing human apolipoprotein E levels attenuates age-dependent A $\beta$  accumulation in mutant human amyloid precursor protein transgenic mice. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *32*(14), 4803–11. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0033-12.2012>
- Bitan, G., Vollers, S. S., & Teplow, D. B. (2003). Elucidation of primary structure elements controlling early amyloid beta-protein oligomerization. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(37), 34882–9. <http://doi.org/10.1074/jbc.M300825200>
- Björkhem, I. (2006). Crossing the barrier: oxysterols as cholesterol transporters and metabolic modulators in the brain. *Journal of Internal Medicine*, *260*(6), 493–508. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2006.01725.x>
- Björkhem, I., & Meaney, S. (2004). Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *24*(5), 806–15. <http://doi.org/10.1161/01.ATV.0000120374.59826.1b>
- Björkqvist, M., Ohlsson, M., Minthon, L., & Hansson, O. (2012). Evaluation of a previously suggested plasma biomarker panel to identify Alzheimer's disease. *PloS One*, *7*(1), e29868. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0029868>
- Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., ... Cerretti, D. P. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature*, *385*(6618), 729–33. <http://doi.org/10.1038/385729a0>
- Bloss, E. B., Janssen, W. G., McEwen, B. S., & Morrison, J. H. (2010). Interactive effects of stress and aging on structural plasticity in the prefrontal cortex. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *30*(19), 6726–31. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0759-10.2010>

- Bloss, E. B., Puri, R., Yuk, F., Punsoni, M., Hara, Y., Janssen, W. G., Morrison, J. H. (2013). Morphological and molecular changes in aging rat prelimbic prefrontal cortical synapses. *Neurobiology of Aging*, *34*(1), 200–10. <http://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.05.014>
- Bock, J. B., Matern, H. T., Peden, A. A., & Scheller, R. H. (2001). A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature*, *409*(6822), 839–41. <http://doi.org/10.1038/35057024>
- Boeshore, K. L., Luckey, C. N., Zigmond, R. E., & Large, T. H. (1999). TrkB isoforms with distinct neurotrophin specificities are expressed in predominantly nonoverlapping populations of avian dorsal root ganglion neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *19*(12), 4739–47. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10366607>
- Bogdanovic, N., Bretillon, L., Lund, E. G., Diczfalusy, U., Lannfelt, L., Winblad, B., Björkhem, I. (2001). On the turnover of brain cholesterol in patients with Alzheimer's disease. Abnormal induction of the cholesterol-catabolic enzyme CYP46 in glial cells. *Neuroscience Letters*, *314*(1–2), 45–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11698143>
- Bollen, E., Vanmierlo, T., Akkerman, S., Wouters, C., Steinbusch, H. M. W., & Prickaerts, J. (2013). 7,8-Dihydroxyflavone improves memory consolidation processes in rats and mice. *Behavioural Brain Research*, *257*, 8–12. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.09.029>
- Bongmba, O. Y. N., Martinez, L. A., Elhardt, M. E., Butler, K., & Tejada-Simon, M. V. (2011). Modulation of dendritic spines and synaptic function by Rac1: a possible link to Fragile X syndrome pathology. *Brain Research*, *1399*, 79–95. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.05.020>
- Boo, J. H., Sohn, J. H., Kim, J. E., Song, H., & Mook-Jung, I. (2008). Rac1 changes the substrate specificity of gamma-secretase between amyloid precursor protein and Notch1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *372*(4), 913–7. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.05.153>
- Bos, J. L. (1989). ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Research*, *49*(17), 4682–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2547513>
- Bouillot, C., Prochiantz, A., Rougon, G., & Allinquant, B. (1996). Axonal amyloid precursor protein expressed by neurons in vitro is present in a membrane fraction with caveolae-like properties. *The Journal of Biological Chemistry*, *271*(13), 7640–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8631800>
- Boulter, E., Garcia-Mata, R., Guilluy, C., Dubash, A., Rossi, G., Brennwald, P. J., & Burridge, K. (2010). Regulation of Rho GTPase crosstalk, degradation and activity by RhoGDI1. *Nature Cell Biology*, *12*(5), 477–83. <http://doi.org/10.1038/ncb2049>
- Boureux, A., Vignal, E., Faure, S., & Fort, P. (2007). Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution*, *24*(1), 203–16. <http://doi.org/10.1093/molbev/msl145>



- Bouterfa, H. L., Sattelmeyer, V., Czub, S., Vordermark, D., Roosen, K., & Tonn, J. C. (2000). Inhibition of Ras farnesylation by lovastatin leads to downregulation of proliferation and migration in primary cultured human glioblastoma cells. *Anticancer Research*, 20(4), 2761–71. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10953355>
- Brecht, W. J., Harris, F. M., Chang, S., Tesseur, I., Yu, G.-Q., Xu, Q., Huang, Y. (2004). Neuron-specific apolipoprotein e4 proteolysis is associated with increased tau phosphorylation in brains of transgenic mice. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(10), 2527–34. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4315-03.2004>
- Breen, K. C., Bruce, M., & Anderton, B. H. (1991). Beta amyloid precursor protein mediates neuronal cell-cell and cell-surface adhesion. *Journal of Neuroscience Research*, 28(1), 90–100. <http://doi.org/10.1002/jnr.490280109>
- Brera, B., Serrano, A., & de Ceballos, M. L. (2000). beta-amyloid peptides are cytotoxic to astrocytes in culture: a role for oxidative stress. *Neurobiology of Disease*, 7(4), 395–405. <http://doi.org/10.1006/nbdi.2000.0313>
- Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (1997). The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*, 89(3), 331–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9150132>
- Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (1999). A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(20), 11041–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10500120>
- Brunholz, S., Sisodia, S., Lorenzo, A., Deyts, C., Kins, S., & Morfini, G. (2012). Axonal transport of APP and the spatial regulation of APP cleavage and function in neuronal cells. *Experimental Brain Research. Experimentelle Hirnforschung. Expérimentation Cérébrale*, 217(3–4), 353–64. <http://doi.org/10.1007/s00221-011-2870-1>
- Bu, G. (2009). Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(5), 333–344. <http://doi.org/10.1038/nrn2620>
- Bu, G., Cam, J., & Zerbinatti, C. (2006). LRP in amyloid-beta production and metabolism. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1086, 35–53. <http://doi.org/10.1196/annals.1377.005>
- Buggia-Prévo, V., Fernandez, C. G., Riordan, S., Vetrivel, K. S., Roseman, J., Waters, J., Thinakaran, G. (2014). Axonal BACE1 dynamics and targeting in hippocampal neurons: a role for Rab11 GTPase. *Molecular Neurodegeneration*, 9, 1. <http://doi.org/10.1186/1750-1326-9-1>
- Bundesamt, S. (2002). Vierter Bericht zur Lage der älteren Generation in der Bundesrepublik Deutschland vom Bundesministerium für Familie, Senioren, Frauen und Jugend: Risiken, Lebensqualität und Versorgung Hochaltriger - unter besonderer Berücksichtigung demenzieller Erkranku. Retrieved from <https://www.bmfsfj.de/blob/94658/4a99f36664eba951dd911974f883b956/prm-21786-4--altenbericht-teil-i-data.pdf>

- Burdick, D., Soreghan, B., Kwon, M., Kosmoski, J., Knauer, M., Henschen, A., ... Glabe, C. (1992). Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(1), 546–54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1730616>
- Burke, S. N., & Barnes, C. A. (2006). Neural plasticity in the ageing brain. *Nature Reviews. Neuroscience*, 7(1), 30–40. <http://doi.org/10.1038/nrn1809>
- Burke, S. N., & Barnes, C. A. (2010). Senescent synapses and hippocampal circuit dynamics. *Trends in Neurosciences*, 33(3), 153–61. <http://doi.org/10.1016/j.tins.2009.12.003>
- Burke, S. N., Wallace, J. L., Nematollahi, S., Uprety, A. R., & Barnes, C. A. (2010). Pattern separation deficits may contribute to age-associated recognition impairments. *Behavioral Neuroscience*, 124(5), 559–73. <http://doi.org/10.1037/a0020893>
- Busciglio, J., Gabuzda, D. H., Matsudaira, P., & Yankner, B. A. (1993). Generation of beta-amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(5), 2092–6. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=46027&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Bustelo, X. R., Sauzeau, V., & Berenjeno, I. M. (2007). GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 29(4), 356–70. <http://doi.org/10.1002/bies.20558>
- Buxbaum, J. D., Liu, K. N., Luo, Y., Slack, J. L., Stocking, K. L., Peschon, J. J., Black, R. A. (1998). Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(43), 27765–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9774383>
- Cai, L.-Z., Lin, L., Hu, J.-S., & Zheng, Z.-H. (2008). [Effects of gamma-secretase inhibitor N-(3, 5-difluorophenacetyl-L-alanyl)-S-phenylglycine t-butyl ester on proliferation and differentiation of neural stem cells]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 88(7), 480–3. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18642791>
- Cai, X. D., Golde, T. E., & Younkin, S. G. (1993). Release of excess amyloid beta protein from a mutant amyloid beta protein precursor. *Science (New York, N.Y.)*, 259(5094), 514–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8424174>
- Calamandrei, G., & Alleva, E. (1995). Neuronal growth factors, neurotrophins and memory deficiency. *Behavioural Brain Research*, 66(1–2), 129–32. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7755882>
- Cameron, B., & Landreth, G. E. (2010). Inflammation, microglia, and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, 37(3), 503–9. <http://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.10.006>
- Carazo-Salas, R. E., Gruss, O. J., Mattaj, I. W., & Karsenti, E. (2001). Ran-GTP coordinates regulation of microtubule nucleation and dynamics during mitotic-spindle assembly. *Nature Cell Biology*, 3(3), 228–34. <http://doi.org/10.1038/35060009>

- Carbone, L. D., Rosenberg, E. W., Tolley, E. A., Holick, M. F., Hughes, T. A., Watsky, M. A., ... Weber, K. T. (2008). 25-Hydroxyvitamin D, cholesterol, and ultraviolet irradiation. *Metabolism: Clinical and Experimental*, *57*(6), 741–8. <http://doi.org/10.1016/j.metabol.2008.01.011>
- Carroll, K. K., Guthrie, N., & Ravi, K. (1992). Dolichol: function, metabolism, and accumulation in human tissues. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire*, *70*(6), 382–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1449704>
- Cartocci, V., Segatto, M., Di Tunno, I., Leone, S., Pfrieder, F. W., & Pallottini, V. (2016). Modulation of the Isoprenoid/Cholesterol Biosynthetic Pathway During Neuronal Differentiation In Vitro. *Journal of Cellular Biochemistry*, *117*(9), 2036–44. <http://doi.org/10.1002/jcb.25500>
- Casey, P. J. (1992). Biochemistry of protein prenylation. *Journal of Lipid Research*, *33*(12), 1731–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1479283>
- Casey, P. J. (1995a). Mechanisms of protein prenylation and role in G protein function. *Biochemical Society Transactions*, *23*(1), 161–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7758720>
- Casey, P. J. (1995b). Protein lipidation in cell signaling. *Science (New York, N. Y.)*, *268*(5208), 221–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7716512>
- Casey, P. J., & Seabra, M. C. (1996). Protein prenyltransferases. *The Journal of Biological Chemistry*, *271*(10), 5289–92. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8621375>
- Casoli, T., Spagna, C., Fattoretti, P., Gesuita, R., & Bertoni-Freddari, C. (1996). Neuronal plasticity in aging: a quantitative immunohistochemical study of GAP-43 distribution in discrete regions of the rat brain. *Brain Research*, *714*(1–2), 111–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8861615>
- Castellano, J. M., Kim, J., Stewart, F. R., Jiang, H., DeMattos, R. B., Patterson, B. W., ... Holtzman, D. M. (2011). Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid- $\beta$  peptide clearance. *Science Translational Medicine*, *3*(89), 89ra57. <http://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002156>
- Cemeus, C., Zhao, T. T., Barrett, G. M., Lorimer, I. A., & Dimitroulakos, J. (2008). Lovastatin enhances gefitinib activity in glioblastoma cells irrespective of EGFRvIII and PTEN status. *Journal of Neuro-Oncology*, *90*(1), 9–17. <http://doi.org/10.1007/s11060-008-9627-0>
- Cengel, K. A., & McKenna, W. G. (2005). Molecular targets for altering radiosensitivity: lessons from Ras as a pre-clinical and clinical model. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *55*(2), 103–16. <http://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2005.02.001>
- Cerda, S. R., Wilkinson, J., Thorgeirsdottir, S., & Broitman, S. A. (1999). R-(+)-perillyl alcohol-induced cell cycle changes, altered actin cytoskeleton, and decreased ras and p34(cdc2) expression in colonic adenocarcinoma SW480 cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *10*(1), 19–30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15539246>

- Cernescu, M., Stark, T., Kalden, E., Kurz, C., Leuner, K., Deller, T., Brutschy, B. (2012). Laser-induced liquid bead ion desorption mass spectrometry: an approach to precisely monitor the oligomerization of the  $\beta$ -amyloid peptide. *Analytical Chemistry*, *84*(12), 5276–84. <http://doi.org/10.1021/ac300258m>
- Chalimoniuk, M., Stolecka, A., Cakała, M., Hauptmann, S., Schulz, K., Lipka, U., ... Strosznajder, J. B. (2007). Amyloid beta enhances cytosolic phospholipase A2 level and arachidonic acid release via nitric oxide in APP-transfected PC12 cells. *Acta Biochimica Polonica*, *54*(3), 611–23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17713604>
- Chan, D. Y. L., Chen, G. G., Poon, W. S., & Liu, P. C. (2008). Lovastatin sensitized human glioblastoma cells to TRAIL-induced apoptosis. *Journal of Neuro-Oncology*, *86*(3), 273–83. <http://doi.org/10.1007/s11060-007-9475-3>
- Chantry, A., & Glynn, P. (1990). A novel metalloproteinase originally isolated from brain myelin membranes is present in many tissues. *The Biochemical Journal*, *268*(1), 245–8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1131420&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
- Chávez-Gutiérrez, L., Bammens, L., Benilova, I., Vandersteen, A., Benurwar, M., Borgers, M., ... De Strooper, B. (2012). The mechanism of  $\gamma$ -Secretase dysfunction in familial Alzheimer disease. *The EMBO Journal*, *31*(10), 2261–74. <http://doi.org/10.1038/emboj.2012.79>
- Chávez-Gutiérrez, L., Tolia, A., Maes, E., Li, T., Wong, P. C., & de Strooper, B. (2008). Glu(332) in the Nicastrin ectodomain is essential for gamma-secretase complex maturation but not for its activity. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(29), 20096–105. <http://doi.org/10.1074/jbc.M803040200>
- Chen, C., Li, X.-H., Zhang, S., Tu, Y., Wang, Y.-M., & Sun, H.-T. (2013). 7,8-Dihydroxyflavone ameliorates Scopolamine induced Alzheimer-like pathologic dysfunction. *Rejuvenation Research*. <http://doi.org/10.1089/rej.2013.1519>
- Chen, C., Wirth, A., & Ponimaskin, E. (2012). Cdc42: an important regulator of neuronal morphology. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *44*(3), 447–51. <http://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.11.022>
- Chen, J., Chua, K.-W., Chua, C. C., Yu, H., Pei, A., Chua, B. H. L., Liu, C.-F. (2011). Antioxidant activity of 7,8-dihydroxyflavone provides neuroprotection against glutamate-induced toxicity. *Neuroscience Letters*, *499*(3), 181–5. <http://doi.org/10.1016/j.neulet.2011.05.054>
- Chen, J., Zhang, X., Kusumo, H., Costa, L. G., & Guizzetti, M. (2013). Cholesterol efflux is differentially regulated in neurons and astrocytes: implications for brain cholesterol homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1831*(2), 263–75. <http://doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.09.007>
- Chen, Y. C., Chen, Q. S., Lei, J. L., & Wang, S. L. (1998). Physical training modifies the age-related decrease of GAP-43 and synaptophysin in the hippocampal formation in C57BL/6J mouse. *Brain Research*, *806*(2), 238–45. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9739145>

- Chen, Y., Huang, X., Zhang, Y., Rockenstein, E., Bu, G., Golde, T. E., Xu, H. (2012). Alzheimer's  $\beta$ -secretase (BACE1) regulates the cAMP/PKA/CREB pathway independently of  $\beta$ -amyloid. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(33), 11390–5. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0757-12.2012>
- Cheng, A., Coksaygan, T., Tang, H., Khatri, R., Balice-Gordon, R. J., Rao, M. S., & Mattson, M. P. (2007). Truncated tyrosine kinase B brain-derived neurotrophic factor receptor directs cortical neural stem cells to a glial cell fate by a novel signaling mechanism. *Journal of Neurochemistry*, 100(6), 1515–30. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04337.x>
- Cheng, B., Gong, H., Xiao, H., Petersen, R. B., Zheng, L., & Huang, K. (2013). Inhibiting toxic aggregation of amyloidogenic proteins: a therapeutic strategy for protein misfolding diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830(10), 4860–71. <http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.06.029>
- Cheng, S., Cao, D., Hottman, D. A., Yuan, L., Bergo, M. O., & Li, L. (2013a). Farnesyl Transferase Haplodeficiency Reduces Neuropathology and Rescues Cognitive Function in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(50), 35952–60. <http://doi.org/10.1074/jbc.M113.503904>
- Cheng, S., Cao, D., Hottman, D. A., Yuan, L., Bergo, M. O., & Li, L. (2013b). Farnesyltransferase haplodeficiency reduces neuropathology and rescues cognitive function in a mouse model of Alzheimer disease. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(50), 35952–60. <http://doi.org/10.1074/jbc.M113.503904>
- Cherfils, J., & Chardin, P. (1999). GEFs: structural basis for their activation of small GTP-binding proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 24(8), 306–11. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10431174>
- Cherfils, J., & Zeghouf, M. (2013). Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiological Reviews*, 93(1), 269–309. <http://doi.org/10.1152/physrev.00003.2012>
- Chételat, G., Villemagne, V. L., Bourgeat, P., Pike, K. E., Jones, G., Ames, D., Rowe, C. C. (2010). Relationship between atrophy and beta-amyloid deposition in Alzheimer disease. *Annals of Neurology*, 67(3), 317–24. <http://doi.org/10.1002/ana.21955>
- Chimon, S., Shaibat, M. A., Jones, C. R., Calero, D. C., Aizezi, B., & Ishii, Y. (2007). Evidence of fibril-like  $\beta$ -sheet structures in a neurotoxic amyloid intermediate of Alzheimer's  $\beta$ -amyloid. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14(12), 1157–64. <http://doi.org/10.1038/nsmb1345>
- Cho, H.-Y., Wang, W., Jhaveri, N., Torres, S., Tseng, J., Leong, M. N., Chen, T. C. (2012). Perillyl alcohol for the treatment of temozolomide-resistant gliomas. *Molecular Cancer Therapeutics*, 11(11), 2462–72. <http://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-12-0321>
- Choi, B.-H., Hur, E.-M., Lee, J.-H., Jun, D.-J., & Kim, K.-T. (2006). Protein kinase Cdelta-mediated proteasomal degradation of MAP kinase phosphatase-1 contributes to glutamate-induced neuronal cell death. *Journal of Cell Science*, 119(Pt 7), 1329–40. <http://doi.org/10.1242/jcs.02837>

- Choi, D. C., Maguschak, K. A., Ye, K., Jang, S.-W., Myers, K. M., & Ressler, K. J. (2010). Prelimbic cortical BDNF is required for memory of learned fear but not extinction or innate fear. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(6), 2675–80. <http://doi.org/10.1073/pnas.0909359107>
- Chui, D. H., Dobo, E., Makifuchi, T., Akiyama, H., Kawakatsu, S., Petit, A., Tabira, T. (2001). Apoptotic neurons in Alzheimer's disease frequently show intracellular Abeta42 labeling. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, *3*(2), 231–239. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12214064>
- Citron, M., Oltersdorf, T., Haass, C., McConlogue, L., Hung, A. Y., Seubert, P., Selkoe, D. J. (1992). Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature*, *360*(6405), 672–4. <http://doi.org/10.1038/360672a0>
- Clark, S. S., Perman, S. M., Sahin, M. B., Jenkins, G. J., & Elegbede, J. A. (2002). Antileukemia activity of perillyl alcohol (POH): uncoupling apoptosis from G0/G1 arrest suggests that the primary effect of POH on Bcr/Abl-transformed cells is to induce growth arrest. *Leukemia*, *16*(2), 213–22. <http://doi.org/10.1038/sj.leu.2402369>
- Clarke, J., Butowski, N., & Chang, S. (2010). Recent advances in therapy for glioblastoma. *Archives of Neurology*, *67*(3), 279–83. <http://doi.org/10.1001/archneurol.2010.5>
- Clarke, S., Vogel, J. P., Deschenes, R. J., & Stock, J. (1988). Posttranslational modification of the Ha-ras oncogene protein: evidence for a third class of protein carboxyl methyltransferases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *85*(13), 4643–7. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=280491&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract>
- Clifford, P. M., Zarrabi, S., Siu, G., Kinsler, K. J., Kosciuk, M. C., Venkataraman, V., ... Nagele, R. G. (2007). Abeta peptides can enter the brain through a defective blood-brain barrier and bind selectively to neurons. *Brain Research*, *1142*, 223–36. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.01.070>
- Cole, S. L., Grudzien, A., Manhart, I. O., Kelly, B. L., Oakley, H., & Vassar, R. (2005). Statins cause intracellular accumulation of amyloid precursor protein, beta-secretase-cleaved fragments, and amyloid beta-peptide via an isoprenoid-dependent mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(19), 18755–70. <http://doi.org/10.1074/jbc.M413895200>
- Cole, S. L., & Vassar, R. (2006). Isoprenoids and Alzheimer's disease: a complex relationship. *Neurobiology of Disease*, *22*(2), 209–22. <http://doi.org/10.1016/j.nbd.2005.11.007>
- Coles, M., Bicknell, W., Watson, A. A., Fairlie, D. P., & Craik, D. J. (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. <http://doi.org/10.1021/bi972979f>
- Colicelli, J. (2004). Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Science's STKE : Signal Transduction Knowledge Environment*, *2004*(250), RE13. <http://doi.org/10.1126/stke.2502004re13>

- Colurso, G. J., Nilson, J. E., & Vervoort, L. G. (2003). Quantitative assessment of DNA fragmentation and beta-amyloid deposition in insular cortex and midfrontal gyrus from patients with Alzheimer's disease. *Life Sciences*, 73(14), 1795–803. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12888118>
- Connor, B., & Dragunow, M. (1998). The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 27(1), 1–39. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9639663>
- Cordey, M., & Pike, C. J. (2006). Conventional protein kinase C isoforms mediate neuroprotection induced by phorbol ester and estrogen. *Journal of Neurochemistry*, 96(1), 204–17. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03545.x>
- Cordy, J. M., Hooper, N. M., & Turner, A. J. (2006). The involvement of lipid rafts in Alzheimer's disease. *Molecular Membrane Biology*, 23(1), 111–22. <http://doi.org/10.1080/09687860500496417>
- Cordy, J. M., Hussain, I., Dingwall, C., Hooper, N. M., & Turner, A. J. (2003). Exclusively targeting beta-secretase to lipid rafts by GPI-anchor addition up-regulates beta-site processing of the amyloid precursor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(20), 11735–40. <http://doi.org/10.1073/pnas.1635130100>
- Costa, R. M., Federov, N. B., Kogan, J. H., Murphy, G. G., Stern, J., Ohno, M., ... Silva, A. J. (2002). Mechanism for the learning deficits in a mouse model of neurofibromatosis type 1. *Nature*, 415(6871), 526–30. <http://doi.org/10.1038/nature711>
- Costa, R. M., Honjo, T., & Silva, A. J. (2003). Learning and memory deficits in Notch mutant mice. *Current Biology : CB*, 13(15), 1348–54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12906797>
- Côté, S., Laghaei, R., Derreumaux, P., & Mousseau, N. (2012). Distinct dimerization for various alloforms of the amyloid-beta protein: A $\beta$ (1-40), A $\beta$ (1-42), and A $\beta$ (1-40)(D23N). *The Journal of Physical Chemistry. B*, 116(13), 4043–55. <http://doi.org/10.1021/jp2126366>
- Cramer, P. E., Cirrito, J. R., Wesson, D. W., Lee, C. Y. D., Karlo, J. C., Zinn, A. E., ... Landreth, G. E. (2012). ApoE-directed therapeutics rapidly clear  $\beta$ -amyloid and reverse deficits in AD mouse models. *Science*, 335(6075), 1503–1506. <http://doi.org/10.1126/science.1217697>
- Crescenzi, O., Tomaselli, S., Guerrini, R., Salvadori, S., D'Ursi, A. M., Temussi, P. A., & Picone, D. (2002). Solution structure of the Alzheimer amyloid beta-peptide (1-42) in an apolar microenvironment. Similarity with a virus fusion domain. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 269(22), 5642–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12423364>
- Crick, D. C., Andres, D. A., Danesi, R., Macchia, M., & Waechter, C. J. (1998). Geranylgeraniol overcomes the block of cell proliferation by lovastatin in C6 glioma cells. *Journal of Neurochemistry*, 70(6), 2397–405. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9603204>

- Crowell, P. L. (1999). Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. *The Journal of Nutrition*, 129(3), 775S–778S. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10082788>
- Crowell, P. L., Chang, R. R., Ren, Z. B., Elson, C. E., & Gould, M. N. (1991). Selective inhibition of isoprenylation of 21–26-kDa proteins by the anticarcinogen d-limonene and its metabolites. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(26), 17679–85. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1894647>
- Crowell, P. L., Ren, Z., Lin, S., Vedejs, E., & Gould, M. N. (1994). Structure-activity relationships among monoterpene inhibitors of protein isoprenylation and cell proliferation. *Biochemical Pharmacology*, 47(8), 1405–15. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8185648>
- Cuello, A. C. (1993). Trophic responses of forebrain cholinergic neurons: a discussion. *Progress in Brain Research*, 98, 265–77. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8248516>
- Cutler, R. G., Kelly, J., Storie, K., Pedersen, W. A., Tammara, A., Hatanpaa, K., Mattson, M. P. (2004). Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(7), 2070–5. <http://doi.org/10.1073/pnas.0305799101>
- Czuba, E., Steliga, A., Lietzau, G., & Kowiański, P. (2017). Cholesterol as a modifying agent of the neurovascular unit structure and function under physiological and pathological conditions. *Metabolic Brain Disease*. <http://doi.org/10.1007/s11011-017-0015-3>
- D'Alessandro, R., Racchetti, G., & Meldolesi, J. (2010). Outgrowth of neurites is a dual process. *Communicative & Integrative Biology*, 3(6), 576–8. <http://doi.org/10.4161/cib.3.6.13093>
- da Fonseca, C. O., Khandelua, H., Salazar, M. D., Schönthal, A. H., Meireles, O. C., & Quirico-Santos, T. (2016). Perillyl alcohol: Dynamic interactions with the lipid bilayer and implications for long-term inhalational chemotherapy for gliomas. *Surgical Neurology International*, 7(1), 1. <http://doi.org/10.4103/2152-7806.173301>
- da Fonseca, C. O., Linden, R., Futuro, D., Gattass, C. R., & Quirico-Santos, T. (2008). Ras pathway activation in gliomas: a strategic target for intranasal administration of perillyl alcohol. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 56(4), 267–76. <http://doi.org/10.1007/s00005-008-0027-0>
- da Fonseca, C. O., Schwartzmann, G., Fischer, J., Nagel, J., Futuro, D., Quirico-Santos, T., & Gattass, C. R. (2008). Preliminary results from a phase I/II study of perillyl alcohol intranasal administration in adults with recurrent malignant gliomas. *Surgical Neurology*, 70(3), 259–66; discussion 266–7. <http://doi.org/10.1016/j.surneu.2007.07.040>
- da Fonseca, C. O., Simão, M., Lins, I. R., Caetano, R. O., Futuro, D., & Quirico-Santos, T. (2011). Efficacy of monoterpene perillyl alcohol upon survival rate of patients with recurrent glioblastoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 137(2), 287–93. <http://doi.org/10.1007/s00432-010-0873-0>



- DA Fonseca, C. O., Teixeira, R. M., Silva, J. C. T., DE Saldanha DA Gama Fischer, J., Meirelles, O. C., Landeiro, J. A., & Quirico-Santos, T. (2013). Long-term outcome in patients with recurrent malignant glioma treated with Perillyl alcohol inhalation. *Anticancer Research*, 33(12), 5625–31. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24324108>
- Dafnis, I., Stratikos, E., Tzinia, A., Tsilibary, E. C., Zannis, V. I., & Chroni, A. (2010). An apolipoprotein E4 fragment can promote intracellular accumulation of amyloid peptide beta 42. *Journal of Neurochemistry*, 115(4), 873–84. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06756.x>
- de Oliveira, F., Bertolucci, P. F., Chen, E., & Smith, M. (2014). Assessment of risk factors for earlier onset of sporadic Alzheimer's disease dementia. *Neurology India*, 62(6), 625. <http://doi.org/10.4103/0028-3886.149384>
- de Saldanha da Gama Fischer, J., Costa Carvalho, P., da Fonseca, C. O., Liao, L., Degrave, W. M., da Gloria da Costa Carvalho, M., Domont, G. B. (2011). Chemo-resistant protein expression pattern of glioblastoma cells (A172) to perillyl alcohol. *Journal of Proteome Research*, 10(1), 153–60. <http://doi.org/10.1021/pr100677g>
- Deane, R., Bell, R. D., Sagare, A., & Zlokovic, B. V. (2009). Clearance of amyloid-beta peptide across the blood-brain barrier: implication for therapies in Alzheimer's disease. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, 8(1), 16–30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19275634>
- Deleye, S., Waldron, A. M., Verhaeghe, J., Bottelbergs, A., Wyffels, L., Van Broeck, B., ... Staelens, S. (2017). Evaluation of  $\mu$ PET outcome measures to detect disease modification induced by BACE inhibition in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Nuclear Medicine : Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, jnumed.116.187625. <http://doi.org/10.2967/jnumed.116.187625>
- Demierre, M.-F., Higgins, P. D. R., Gruber, S. B., Hawk, E., & Lippman, S. M. (2005). Statins and cancer prevention. *Nature Reviews. Cancer*, 5(12), 930–42. <http://doi.org/10.1038/nrc1751>
- DerMardirossian, C., & Bokoch, G. M. (2005). GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends in Cell Biology*, 15(7), 356–63. <http://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.05.001>
- Désiré, L., Bourdin, J., Loiseau, N., Peillon, H., Picard, V., De Oliveira, C., Schweighoffer, F. (2005). RAC1 inhibition targets amyloid precursor protein processing by gamma-secretase and decreases Abeta production in vitro and in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(45), 37516–25. <http://doi.org/10.1074/jbc.M507913200>
- Desnoyers, L., & Seabra, M. C. (1998). Single prenyl-binding site on protein prenyl transferases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(21), 12266–70. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=22820&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Devi, L., & Ohno, M. (2012). 7,8-dihydroxyflavone, a small-molecule TrkB agonist, reverses memory deficits and BACE1 elevation in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 37(2), 434–44. <http://doi.org/10.1038/npp.2011.191>

- Di Paolo, G., & De Camilli, P. (2006). Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature*, *443*(7112), 651–7. <http://doi.org/10.1038/nature05185>
- Diana, G., Valentini, G., Travaglione, S., Falzano, L., Pieri, M., Zona, C., Fiorentini, C. (2007). Enhancement of learning and memory after activation of cerebral Rho GTPases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(2), 636–41. <http://doi.org/10.1073/pnas.0610059104>
- DiChiara, T., DiNunno, N., Clark, J., Bu, R. Lo, Cline, E. N., Rollins, M. G., Klein, W. L. (2017). Alzheimer's Toxic Amyloid Beta Oligomers: Unwelcome Visitors to the Na/K ATPase alpha3 Docking Station. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, *90*(1), 45–61. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28356893>
- Dickey, C. A., Loring, J. F., Montgomery, J., Gordon, M. N., Eastman, P. S., & Morgan, D. (2003). Selectively reduced expression of synaptic plasticity-related genes in amyloid precursor protein + presenilin-1 transgenic mice. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *23*(12), 5219–26. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12832546>
- Didsbury, J., Weber, R. F., Bokoch, G. M., Evans, T., & Snyderman, R. (1989). rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates. *The Journal of Biological Chemistry*, *264*(28), 16378–82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2674130>
- Dietschy, J. M. (1997). Theoretical considerations of what regulates low-density-lipoprotein and high-density-lipoprotein cholesterol. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *65*(5 Suppl), 1581S–1589S. <http://doi.org/10.1093/ajcn/65.5.1581S>
- Dietschy, J. M. (2009). Central nervous system: cholesterol turnover, brain development and neurodegeneration. *Biological Chemistry*, *390*(4), 287–93. <http://doi.org/10.1515/BC.2009.035>
- Dietschy, J. M., & Turley, S. D. (2001). Cholesterol metabolism in the brain. *Current Opinion in Lipidology*, *12*(2), 105–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11264981>
- Dietschy, J. M., & Turley, S. D. (2004a). Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *Journal of Lipid Research*, *45*(8), 1375–97. <http://doi.org/10.1194/jlr.R400004-JLR200>
- Dietschy, J. M., & Turley, S. D. (2004b). Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *Journal of Lipid Research*, *45*(8), 1375–97. <http://doi.org/10.1194/jlr.R400004-JLR200>
- Dimitroulakos, J., Thai, S., Wasfy, G. H., Hedley, D. W., Minden, M. D., & Penn, L. Z. (2000). Lovastatin induces a pronounced differentiation response in acute myeloid leukemias. *Leukemia & Lymphoma*, *40*(1–2), 167–78. <http://doi.org/10.3109/10428190009054894>

- Do, T. M., Dodacki, A., Alata, W., Calon, F., Nolic, S., Scherrmann, J.-M., Bourasset, F. (2016). Age-Dependent Regulation of the Blood-Brain Barrier Influx/Efflux Equilibrium of Amyloid- $\beta$  Peptide in a Mouse Model of Alzheimer's Disease (3xTg-AD). *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 49(2), 287–300. <http://doi.org/10.3233/JAD-150350>
- Dolphin, G. T., Dumy, P., & Garcia, J. (2006). Control of amyloid beta-peptide protofibril formation by a designed template assembly. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 45(17), 2699–702. <http://doi.org/10.1002/anie.200600395>
- Dominguez, D. I., De Strooper, B., & Annaert, W. (2001). Secretases as therapeutic targets for the treatment of Alzheimer's disease. *Amyloid : The International Journal of Experimental and Clinical Investigation : The Official Journal of the International Society of Amyloidosis*, 8(2), 124–42. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11409035>
- Dona, O., Thompson, J., & Druchok, C. (2016). Comprehensive Review on Magnetic Resonance Imaging in Alzheimer's Disease. *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, 44(3), 213–225. <http://doi.org/10.1615/CritRevBiomedEng.2016019544>
- Dovas, A., & Couchman, J. R. (2005). RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities. *The Biochemical Journal*, 390(Pt 1), 1–9. <http://doi.org/10.1042/BJ20050104>
- Dovey, H. F., John, V., Anderson, J. P., Chen, L. Z., de Saint Andrieu, P., Fang, L. Y., Audia, J. E. (2001). Functional gamma-secretase inhibitors reduce beta-amyloid peptide levels in brain. *Journal of Neurochemistry*, 76(1), 173–81. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11145990>
- Drews, A., Flint, J., Shivji, N., Jönsson, P., Wirthensohn, D., De Genst, E., Klenerman, D. (2016). Individual aggregates of amyloid beta induce temporary calcium influx through the cell membrane of neuronal cells. *Scientific Reports*, 6(1), 31910. <http://doi.org/10.1038/srep31910>
- Dudakovic, A., Wiemer, A. J., Lamb, K. M., Vonnahme, L. A., Dietz, S. E., & Hohl, R. J. (2008). Inhibition of geranylgeranyl diphosphate synthase induces apoptosis through multiple mechanisms and displays synergy with inhibition of other isoprenoid biosynthetic enzymes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 324(3), 1028–36. <http://doi.org/10.1124/jpet.107.132217>
- Dugich-Djordjevic, M. M., Peterson, C., Isono, F., Ohsawa, F., Widmer, H. R., Denton, T. L., ... Hefti, F. (1995). Immunohistochemical visualization of brain-derived neurotrophic factor in the rat brain. *The European Journal of Neuroscience*, 7(9), 1831–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8528456>
- Eckert, G. P., Cairns, N. J., Maras, A., Gattaz, W. F., & Müller, W. E. (2000). Cholesterol modulates the membrane-disordering effects of beta-amyloid peptides in the hippocampus: specific changes in Alzheimer's disease. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 11(4), 181–6. <http://doi.org/17234>

- Eckert, G. P., Hooff, G. P., Strandjord, D. M., Igbavboa, U., Volmer, D. A., Müller, W. E., & Wood, W. G. (2009a). Regulation of the brain isoprenoids farnesyl- and geranylgeranylpyrophosphate is altered in male Alzheimer patients. *Neurobiology of Disease*, *35*(2), 251–7. <http://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.05.005>
- Eckert, G. P., Hooff, G. P., Strandjord, D. M., Igbavboa, U., Volmer, D. A., Müller, W. E., & Wood, W. G. (2009b). Regulation of the brain isoprenoids farnesyl- and geranylgeranylpyrophosphate is altered in male Alzheimer patients. *Neurobiology of Disease*, *35*(2), 251–7. <http://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.05.005>
- Eckert, G. P., Kirsch, C., Leutz, S., Wood, W. G., & Müller, W. E. (2003). Cholesterol modulates amyloid beta-peptide's membrane interactions. *Pharmacopsychiatry*, *36 Suppl 2*, S136–43. <http://doi.org/10.1055/s-2003-43059>
- Eckert, G. P., Kirsch, C., & Mueller, W. E. (2001). Differential effects of lovastatin treatment on brain cholesterol levels in normal and apoE-deficient mice. *Neuroreport*, *12*(5), 883–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11303752>
- Eckert, G. P., Wood, W. G., & Müller, W. E. (2005). Membrane disordering effects of beta-amyloid peptides. *Sub-Cellular Biochemistry*, *38*, 319–37. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15709486>
- Eckmann, J., Eckert, S. H., Leuner, K., Muller, W. E., & Eckert, G. P. (2013). Mitochondria: mitochondrial membranes in brain ageing and neurodegeneration. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *45*(1), 76–80. <http://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.06.009>
- Edlund, C., Söderberg, M., & Kristensson, K. (1994). Isoprenoids in aging and neurodegeneration. *Neurochemistry International*, *25*(1), 35–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7950967>
- Edlund, C., Söderberg, M., Kristensson, K., & Dallner, G. (1992). Ubiquinone, dolichol, and cholesterol metabolism in aging and Alzheimer's disease. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire*, *70*(6), 422–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1449707>
- Eehalt, R., Keller, P., Haass, C., Thiele, C., & Simons, K. (2003). Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *The Journal of Cell Biology*, *160*(1), 113–23. <http://doi.org/10.1083/jcb.200207113>
- Eehalt, R., Michel, B., De Pietri Tonelli, D., Zacchetti, D., Simons, K., & Keller, P. (2002). Splice variants of the beta-site APP-cleaving enzyme BACE1 in human brain and pancreas. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *293*(1), 30–7. [http://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00169-9](http://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00169-9)
- Eikelenboom, P., Bate, C., Van Gool, W. A., Hoozemans, J. J. M., Rozemuller, J. M., Veerhuis, R., & Williams, A. (2002). Neuroinflammation in Alzheimer's disease and prion disease. *Glia*, *40*(2), 232–9. <http://doi.org/10.1002/glia.10146>

- Eisa-Beygi, S., Hatch, G., Noble, S., Ekker, M., & Moon, T. W. (2013). The 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR) pathway regulates developmental cerebral-vascular stability via prenylation-dependent signalling pathway. *Developmental Biology*, 373(2), 258–66. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.11.024>
- Eisele, Y. S. (2013). From soluble  $\alpha\beta$  to progressive  $\alpha\beta$  aggregation: could prion-like templated misfolding play a role? *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 23(3), 333–41. <http://doi.org/10.1111/bpa.12049>
- El Oualid, F., Cohen, L. H., van der Marel, G. A., & Overhand, M. (2006). Inhibitors of protein: geranylgeranyl transferases. *Current Medicinal Chemistry*, 13(20), 2385–427. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16918362>
- Elliott, D. A., Tsoi, K., Holinkova, S., Chan, S. L., Kim, W. S., Halliday, G. M., Garner, B. (2011). Isoform-specific proteolysis of apolipoprotein-E in the brain. *Neurobiology of Aging*, 32(2), 257–71. <http://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2009.02.006>
- End, D. W. (1999). Farnesyl protein transferase inhibitors and other therapies targeting the Ras signal transduction pathway. *Investigational New Drugs*, 17(3), 241–58. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10665477>
- Ernster, L., & Dallner, G. (1995). Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1271(1), 195–204. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7599208>
- Fahrenholz, F., & Postina, R. (2006). Alpha-secretase activation--an approach to Alzheimer's disease therapy. *Neuro-Degenerative Diseases*, 3(4–5), 255–61. <http://doi.org/10.1159/000095264>
- Farid, K., Charidimou, A., & Baron, J.-C. (2017). Amyloid positron emission tomography in sporadic cerebral amyloid angiopathy: A systematic critical update. *NeuroImage. Clinical*, 15, 247–263. <http://doi.org/10.1016/j.nicl.2017.05.002>
- Farnsworth, C. C., Kawata, M., Yoshida, Y., Takai, Y., Gelb, M. H., & Glomset, J. A. (1991). C terminus of the small GTP-binding protein smg p25A contains two geranylgeranylated cysteine residues and a methyl ester. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(14), 6196–200. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=52049&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Farzan, M., Schnitzler, C. E., Vasilieva, N., Leung, D., & Choe, H. (2000). BACE2, a beta -secretase homolog, cleaves at the beta site and within the amyloid-beta region of the amyloid-beta precursor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(17), 9712–7. <http://doi.org/10.1073/pnas.160115697>
- Fassbender, K., Simons, M., Bergmann, C., Stroick, M., Lutjohann, D., Keller, P., Hartmann, T. (2001). Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta -amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(10), 5856–61. <http://doi.org/10.1073/pnas.081620098>

- Fassbender, K., Stroick, M., Bertsch, T., Ragoschke, A., Kuehl, S., Walter, S., Lütjohann, D. (2002). Effects of statins on human cerebral cholesterol metabolism and secretion of Alzheimer amyloid peptide. *Neurology*, *59*(8), 1257–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12391360>
- Feldman, H. H., Doody, R. S., Kivipelto, M., Sparks, D. L., Waters, D. D., Jones, R. W., ... Breazna, A. (2010). Randomized controlled trial of atorvastatin in mild to moderate Alzheimer disease: LEADe. *Neurology*, *74*(12), 956–64. <http://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181d6476a>
- Feltri, M. L., Suter, U., & Relvas, J. B. (2008). The function of RhoGTPases in axon ensheathment and myelination. *Glia*, *56*(14), 1508–17. <http://doi.org/10.1002/glia.20752>
- Fernandes, J., da Fonseca, C. O., Teixeira, A., & Gattass, C. R. (2005). Perillyl alcohol induces apoptosis in human glioblastoma multiforme cells. *Oncology Reports*, *13*(5), 943–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15809762>
- Fernandez-Perez, E. J., Peters, C., & Aguayo, L. G. (2016). Membrane Damage Induced by Amyloid Beta and a Potential Link with Neuroinflammation. *Current Pharmaceutical Design*, *22*(10), 1295–304. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26972288>
- Ferris, J. S., McCoy, L., Neugut, A. I., Wrensch, M., & Lai, R. (2012). HMG CoA reductase inhibitors, NSAIDs and risk of glioma. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, *131*(6), E1031-7. <http://doi.org/10.1002/ijc.27536>
- Ferrone, F. (1999). Analysis of protein aggregation kinetics. *Methods in Enzymology*, *309*, 256–74. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10507029>
- Fischer, J. de S. da G., Liao, L., Carvalho, P. C., Barbosa, V. C., Domont, G. B., Carvalho, M. da G. da C., & Yates, J. R. (2010). Dynamic proteomic overview of glioblastoma cells (A172) exposed to perillyl alcohol. *Journal of Proteomics*, *73*(5), 1018–27. <http://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.01.003>
- Forloni, G., Demicheli, F., Giorgi, S., Bendotti, C., & Angeretti, N. (1992). Expression of amyloid precursor protein mRNAs in endothelial, neuronal and glial cells: modulation by interleukin-1. *Brain Research. Molecular Brain Research*, *16*(1–2), 128–34. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1334190>
- Foti, M., Piattelli, M., Baratta, M. T., & Ruberto, G. (1996). Flavonoids, Coumarins, and Cinnamic Acids as Antioxidants in a Micellar System. Structure–Activity Relationship †. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *44*(2), 497–501. <http://doi.org/10.1021/jf950378u>
- Frisén, J., Verge, V. M., Fried, K., Risling, M., Persson, H., Trotter, J., Lindholm, D. (1993). Characterization of glial trkB receptors: differential response to injury in the central and peripheral nervous systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*(11), 4971–5. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=46635&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- Fritz, G. (2009). Targeting the mevalonate pathway for improved anticancer therapy. *Current Cancer Drug Targets*, 9(5), 626–38. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19508172>
- Fu, B. Y., Ma, S. L., Tang, N. L. S., Tam, C. W. C., Lui, V. W. C., Chiu, H. F. K., & Lam, L. C. W. (2009). Cholesterol 24-hydroxylase (CYP46A1) polymorphisms are associated with faster cognitive deterioration in Chinese older persons: a two-year follow up study. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 24(9), 921–6. <http://doi.org/10.1002/gps.2196>
- Fu, H. W., Moomaw, J. F., Moomaw, C. R., & Casey, P. J. (1996). Identification of a cysteine residue essential for activity of protein farnesyltransferase. Cys299 is exposed only upon removal of zinc from the enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(45), 28541–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8910483>
- Fu, L., Sun, Y., Guo, Y., Chen, Y., Yu, B., Zhang, H., Wu, H. (2017). Comparison of neurotoxicity of different aggregated forms of A $\beta$ 40, A $\beta$ 42 and A $\beta$ 43 in cell cultures. *Journal of Peptide Science : An Official Publication of the European Peptide Society*, 23(3), 245–251. <http://doi.org/10.1002/psc.2975>
- Fugmann, B., Lang-Fugmann, S., & Steglich, W. (2014). *RÖMPP Encyclopedia Natural Products, 1st Edition, 2000*. Thieme. Retrieved from <http://books.google.com/books?id=vVCGAAQBAJ&pgis=1>
- Fukumoto, Y., Kaibuchi, K., Hori, Y., Fujioka, H., Araki, S., Ueda, T., Takai, Y. (1990). Molecular cloning and characterization of a novel type of regulatory protein (GDI) for the rho proteins, ras p21-like small GTP-binding proteins. *Oncogene*, 5(9), 1321–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2120668>
- Gaist, D., Andersen, L., Hallas, J., Sørensen, H. T., Schrøder, H. D., & Friis, S. (2013). Use of statins and risk of glioma: a nationwide case-control study in Denmark. *British Journal of Cancer*, 108(3), 715–20. <http://doi.org/10.1038/bjc.2012.536>
- Gamblin, S. J., & Smerdon, S. J. (1998). GTPase-activating proteins and their complexes. *Current Opinion in Structural Biology*, 8(2), 195–201. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9631293>
- Ganz, M. L., Tawah, A. F., Guo, S., Chitnis, A. S., Silies, H., Schäuble, B., Foster, N. L. (2017). The impact of  $\beta$ -amyloid positron emission tomography on the diagnostic and treatment decisions of dementia experts. *Neurodegenerative Disease Management*, 7(2), 107–117. <http://doi.org/10.2217/nmt-2016-0059>
- Gao, L., Tian, M., Zhao, H.-Y., Xu, Q.-Q., Huang, Y.-M., Si, Q.-C., ... Zeng, Y. (2016). TrkB activation by 7, 8-dihydroxyflavone increases synapse AMPA subunits and ameliorates spatial memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 136(3), 620–36. <http://doi.org/10.1111/jnc.13432>
- Gao, S., Yu, R., & Zhou, X. (2016). The Role of Geranylgeranyltransferase I-Mediated Protein Prenylation in the Brain. *Molecular Neurobiology*, 53(10), 6925–6937. <http://doi.org/10.1007/s12035-015-9594-3>
- García-Mata, R., & Burridge, K. (2007). Catching a GEF by its tail. *Trends in Cell Biology*, 17(1), 36–43. <http://doi.org/10.1016/j.tcb.2006.11.004>

- Garcia, A. N. M., Muniz, M. T. C., Souza e Silva, H. R., da Silva, H. A., & Athayde-Junior, L. (2009). Cyp46 polymorphisms in Alzheimer's disease: a review. *Journal of Molecular Neuroscience*, 39(3), 342–345. <http://doi.org/10.1007/s12031-009-9227-2>
- Garcia, D. G., Amorim, L. M. F., de Castro Faria, M. V, Freire, A. S., Santelli, R. E., Da Fonseca, C. O., ... Burth, P. (2010). The anticancer drug perillyl alcohol is a Na/K-ATPase inhibitor. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 345(1–2), 29–34. <http://doi.org/10.1007/s11010-010-0556-9>
- Gärtner, U., Holzer, M., & Arendt, T. (1999). Elevated expression of p21ras is an early event in Alzheimer's disease and precedes neurofibrillary degeneration. *Neuroscience*, 91(1), 1–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10336054>
- Gärtner, U., Holzer, M., Heumann, R., & Arendt, T. (1995). Induction of p21ras in Alzheimer pathology. *Neuroreport*, 6(10), 1441–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7488744>
- Garzon-Rodriguez, W., Sepulveda-Becerra, M., Milton, S., & Glabe, C. G. (1997). Soluble amyloid Abeta-(1–40) exists as a stable dimer at low concentrations. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(34), 21037–44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9261105>
- Gasic-Milenkovic, J., Dukic-Stefanovic, S., Deuther-Conrad, W., Gärtner, U., & Münch, G. (2003). Beta-amyloid peptide potentiates inflammatory responses induced by lipopolysaccharide, interferon -gamma and "advanced glycation endproducts" in a murine microglia cell line. *The European Journal of Neuroscience*, 17(4), 813–21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12603271>
- Gelb, M. H., Tamanoi, F., Yokoyama, K., Ghomashchi, F., Esson, K., & Gould, M. N. (1995). The inhibition of protein prenyltransferases by oxygenated metabolites of limonene and perillyl alcohol. *Cancer Letters*, 91(2), 169–75. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7767906>
- Geppert, M., Goda, Y., Stevens, C. F., & Südhof, T. C. (1997). The small GTP-binding protein Rab3A regulates a late step in synaptic vesicle fusion. *Nature*, 387(6635), 810–4. <http://doi.org/10.1038/42954>
- Ghijzen, W. E. J. M., & Leenders, A. G. M. (2005). Differential signaling in presynaptic neurotransmitter release. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 62(9), 937–54. <http://doi.org/10.1007/s00018-004-4525-0>
- Ghribi, O., Herman, M. M., & Savory, J. (2003). Lithium inhibits Abeta-induced stress in endoplasmic reticulum of rabbit hippocampus but does not prevent oxidative damage and tau phosphorylation. *Journal of Neuroscience Research*, 71(6), 853–62. <http://doi.org/10.1002/jnr.10511>
- Gibson Wood, W., Eckert, G. P., Igbavboa, U., & Müller, W. E. (2003). Amyloid beta-protein interactions with membranes and cholesterol: causes or casualties of Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1610(2), 281–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12648781>
- Gil, C., Cubí, R., Blasi, J., & Aguilera, J. (2006). Synaptic proteins associate with a sub-set of lipid rafts when isolated from nerve endings at physiological temperature. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 348(4), 1334–42. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.07.201>



- Gillies, R. J., Didier, N., & Denton, M. (1986). Determination of cell number in monolayer cultures. *Analytical Biochemistry*, *159*(1), 109–13. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3812988>
- Girgert, R., Vogt, Y., Becke, D., Bruchelt, G., & Schweizer, P. (1999). Growth inhibition of neuroblastoma cells by lovastatin and L-ascorbic acid is based on different mechanisms. *Cancer Letters*, *137*(2), 167–72. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10374838>
- Glass, C. K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M. C., & Gage, F. H. (2010). Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*, *140*(6), 918–34. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.016>
- Gliemroth, J., Zulewski, H., Arnold, H., & Terzis, A. J. A. (2003). Migration, proliferation, and invasion of human glioma cells following treatment with simvastatin. *Neurosurgical Review*, *26*(2), 117–24. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12962298>
- Glomset, J. A., & Farnsworth, C. C. (1994). Role of protein modification reactions in programming interactions between ras-related GTPases and cell membranes. *Annual Review of Cell Biology*, *10*, 181–205. <http://doi.org/10.1146/annurev.cb.10.110194.001145>
- Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (1990). Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*, *343*(6257), 425–30. <http://doi.org/10.1038/343425a0>
- Gómez-Contreras, P. C., Hernández-Flores, G., Ortiz-Lazareno, P. C., Del Toro-Arreola, S., Delgado-Rizo, V., Lerma-Díaz, J. M., ... Bravo Cuellar, A. (2006). In vitro induction of apoptosis in U937 cells by perillyl alcohol with sensitization by pentoxifylline: increased BCL-2 and BAX protein expression. *Chemotherapy*, *52*(6), 308–15. <http://doi.org/10.1159/000096003>
- Gómez, J., Martínez-A, C., González, a, & Rebollo, a. (1998). Dual role of Ras and Rho proteins: at the cutting edge of life and death. *Immunology and Cell Biology*, *76*(2), 125–34. <http://doi.org/10.1046/j.1440-1711.1998.00723.x>
- Gonzalez-Billault, C., Muñoz-Llancao, P., Henriquez, D. R., Wojnacki, J., Conde, C., & Caceres, A. (2012). The role of small GTPases in neuronal morphogenesis and polarity. *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)*, *69*(7), 464–85. <http://doi.org/10.1002/cm.21034>
- González, R. G., Fischman, A. J., Guimaraes, A. R., Carr, C. A., Stern, C. E., Halpern, E. F., Rosen, B. R. (1995). Functional MR in the evaluation of dementia: correlation of abnormal dynamic cerebral blood volume measurements with changes in cerebral metabolism on positron emission tomography with fludeoxyglucose F 18. *AJNR. American Journal of Neuroradiology*, *16*(9), 1763–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8693972>
- Goossens, L., Deweer, S., Pommery, J., Hénichart, J.-P., & Goossens, J.-F. (2005). Spectroscopic study of fluorescent peptides for prenyl transferase assays. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *37*(3), 417–22. <http://doi.org/10.1016/j.jpba.2004.11.006>
- Gooz, M. (2010). ADAM-17: the enzyme that does it all. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *45*(2), 146–69. <http://doi.org/10.3109/10409231003628015>

- Goritz, C., Mauch, D. H., & Pfrieder, F. W. (2005). Multiple mechanisms mediate cholesterol-induced synaptogenesis in a CNS neuron. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 29(2), 190–201. <http://doi.org/10.1016/j.mcn.2005.02.006>
- Gouras, G. K., Tsai, J., Naslund, J., Vincent, B., Edgar, M., Checler, F., ... Relkin, N. R. (2000). Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain. *The American Journal of Pathology*, 156(1), 15–20. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1868613&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
- Govek, E.-E., Newey, S. E., & Van Aelst, L. (2005). The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes & Development*, 19(1), 1–49. <http://doi.org/10.1101/gad.1256405>
- Graaf, M. R., Richel, D. J., van Noorden, C. J. F., & Guchelaar, H.-J. (2004). Effects of statins and farnesyltransferase inhibitors on the development and progression of cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 30(7), 609–41. <http://doi.org/10.1016/j.ctrv.2004.06.010>
- Grant, M. A., Lazo, N. D., Lomakin, A., Condrón, M. M., Arai, H., Yamin, G., Teplow, D. B. (2007). Familial Alzheimer's disease mutations alter the stability of the amyloid beta-protein monomer folding nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(42), 16522–7. <http://doi.org/10.1073/pnas.0705197104>
- Gravina, S. A., Ho, L., Eckman, C. B., Long, K. E., Otvos, L., Younkin, L. H., Younkin, S. G. (1995). Amyloid beta protein (A beta) in Alzheimer's disease brain. Biochemical and immunocytochemical analysis with antibodies specific for forms ending at A beta 40 or A beta 42(43). *The Journal of Biological Chemistry*, 270(13), 7013–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7706234>
- Grillo, F. W., Song, S., Teles-Grilo Ruivo, L. M., Huang, L., Gao, G., Knott, G. W., De Paola, V. (2013). Increased axonal bouton dynamics in the aging mouse cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(16), E1514–23. <http://doi.org/10.1073/pnas.1218731110>
- Grizot, S., Fauré, J., Fieschi, F., Vignais, P. V., Dagher, M. C., & Pebay-Peyroula, E. (2001). Crystal structure of the Rac1-RhoGDI complex involved in nadph oxidase activation. *Biochemistry*, 40(34), 10007–13. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11513578>
- Grzmil, M., & Hemmings, B. A. (2010). Deregulated signalling networks in human brain tumours. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804(3), 476–83. <http://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.10.018>
- Guerreiro, R., Wojtas, A., Bras, J., Carrasquillo, M., Rogaeva, E., Majounie, E., Hardy, J. (2013). TREM2 variants in Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine*, 368(2), 117–27. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1211851>
- Guo, Z., Wu, Y.-W., Das, D., Delon, C., Cramer, J., Yu, S., ... Blankenfeldt, W. (2008). Structures of RabGGTase-substrate/product complexes provide insights into the evolution of protein prenylation. *The EMBO Journal*, 27(18), 2444–56. <http://doi.org/10.1038/emboj.2008.164>

- Gutierrez, L., Magee, A. I., Marshall, C. J., & Hancock, J. F. (1989). Post-translational processing of p21ras is two-step and involves carboxyl-methylation and carboxy-terminal proteolysis. *The EMBO Journal*, *8*(4), 1093–8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=400919&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Haapasalo, A., Sipola, I., Larsson, K., Akerman, K. E. O., Stoilov, P., Stamm, S., Castren, E. (2002). Regulation of TRKB surface expression by brain-derived neurotrophic factor and truncated TRKB isoforms. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(45), 43160–7. <http://doi.org/10.1074/jbc.M205202200>
- Haass, C., Lemere, C. A., Capell, A., Citron, M., Seubert, P., Schenk, D., ... Selkoe, D. J. (1995). The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway. *Nature Medicine*, *1*(12), 1291–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7489411>
- Haass, C., & Selkoe, D. J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *8*(2), 101–12. <http://doi.org/10.1038/nrm2101>
- Haditsch, U., Leone, D. P., Farinelli, M., Chrostek-Grashoff, A., Brakebusch, C., Mansuy, I. M., Palmer, T. D. (2009). A central role for the small GTPase Rac1 in hippocampal plasticity and spatial learning and memory. *Molecular and Cellular Neurosciences*, *41*(4), 409–19. <http://doi.org/10.1016/j.mcn.2009.04.005>
- Hall, A. (1993). Ras-related proteins. *Current Opinion in Cell Biology*, *5*(2), 265–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8389569>
- Hall, A. (2012). Rho family GTPases. *Biochemical Society Transactions*, *40*(6), 1378–82. <http://doi.org/10.1042/BST20120103>
- Hallböök, F., Ibáñez, C. F., & Persson, H. (1991). Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in Xenopus ovary. *Neuron*, *6*(5), 845–58. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2025430>
- Hancock, J. F., Cadwallader, K., Paterson, H., & Marshall, C. J. (1991). A CAAX or a CAAL motif and a second signal are sufficient for plasma membrane targeting of ras proteins. *The EMBO Journal*, *10*(13), 4033–9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=453151&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Hanzal-Bayer, M., Renault, L., Roversi, P., Wittinghofer, A., & Hillig, R. C. (2002). The complex of Arl2-GTP and PDE delta: from structure to function. *The EMBO Journal*, *21*(9), 2095–106. <http://doi.org/10.1093/emboj/21.9.2095>
- Harborne, J. B., & Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, *55*(6), 481–504. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11130659>
- Hardcastle, I. R., Rowlands, M. G., Barber, A. M., Grimshaw, R. M., Mohan, M. K., Nutley, B. P., & Jarman, M. (1999). Inhibition of protein prenylation by metabolites of limonene. *Biochemical Pharmacology*, *57*(7), 801–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10075086>

- Hardy, J. A., & Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science (New York, N. Y.)*, 256(5054), 184–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1566067>
- Hardy, J., & Allsop, D. (1991). Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, 12(10), 383–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1763432>
- Harper, J. D., Wong, S. S., Lieber, C. M., & Lansbury, P. T. (1997). Observation of metastable A $\beta$  amyloid protofibrils by atomic force microscopy. *Chemistry & Biology*, 4(2), 119–25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9190286>
- Harris, F. M., Brecht, W. J., Xu, Q., Tesseur, I., Kekonius, L., Wyss-Coray, T., Huang, Y. (2003). Carboxyl-terminal-truncated apolipoprotein E4 causes Alzheimer's disease-like neurodegeneration and behavioral deficits in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(19), 10966–71. <http://doi.org/10.1073/pnas.1434398100>
- Hart, M. J., Eva, A., Zangrilli, D., Aaronson, S. A., Evans, T., Cerione, R. A., & Zheng, Y. (1994). Cellular transformation and guanine nucleotide exchange activity are catalyzed by a common domain on the dbl oncogene product. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(1), 62–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8276860>
- Hart, M. J., Sharma, S., elMasry, N., Qiu, R. G., McCabe, P., Polakis, P., & Bollag, G. (1996). Identification of a novel guanine nucleotide exchange factor for the Rho GTPase. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(41), 25452–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8810315>
- Hashimoto, Y., Niikura, T., Chiba, T., Tsukamoto, E., Kadowaki, H., Nishitoh, H., ... Nishimoto, I. (2003). The cytoplasmic domain of Alzheimer's amyloid-beta protein precursor causes sustained apoptosis signal-regulating kinase 1/c-Jun NH2-terminal kinase-mediated neurotoxic signal via dimerization. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 306(3), 889–902. <http://doi.org/10.1124/jpet.103.051383>
- Heart Protection Study Collaborative Group. (2002). MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*, 360(9326), 7–22. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)09327-3](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)09327-3)
- Henderson, B. W., Gentry, E. G., Rush, T., Troncoso, J. C., Thambisetty, M., Montine, T. J., & Herskowitz, J. H. (2016). Rho-associated protein kinase 1 (ROCK1) is increased in Alzheimer's disease and ROCK1 depletion reduces amyloid- $\beta$  levels in brain. *Journal of Neurochemistry*, 138(4), 525–31. <http://doi.org/10.1111/jnc.13688>
- Heverin, M., Meaney, S., Lütjohann, D., Diczfalusy, U., Wahren, J., & Björkhem, I. (2005). Crossing the barrier: net flux of 27-hydroxycholesterol into the human brain. *The Journal of Lipid Research*, 46(5), 1047–1052. <http://doi.org/10.1194/jlr.M500024-JLR200>
- Hilbich, C., Kisters-Woike, B., Reed, J., Masters, C. L., & Beyreuther, K. (1991). Aggregation and secondary structure of synthetic amyloid beta A4 peptides of Alzheimer's disease. *Journal of Molecular Biology*, 218(1), 149–63. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2002499>

- Hindler, K., Cleeland, C. S., Rivera, E., & Collard, C. D. (2006). The role of statins in cancer therapy. *The Oncologist*, *11*(3), 306–15. <http://doi.org/10.1634/theoncologist.11-3-306>
- Hirai, A., Nakamura, S., Noguchi, Y., Yasuda, T., Kitagawa, M., Tatsuno, I., Saito, Y. (1997). Geranylgeranylated rho small GTPase(s) are essential for the degradation of p27Kip1 and facilitate the progression from G1 to S phase in growth-stimulated rat FRTL-5 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *272*(1), 13–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8995216>
- Hitt, B. D., Jaramillo, T. C., Chetkovich, D. M., & Vassar, R. (2010). BACE1-/- mice exhibit seizure activity that does not correlate with sodium channel level or axonal localization. *Molecular Neurodegeneration*, *5*, 31. <http://doi.org/10.1186/1750-1326-5-31>
- Ho, J., Ondos, J., Ning, H., Smith, S., Kreisl, T., Iwamoto, F., Camphausen, K. (2013). Chemoradiation for glioblastoma multiforme: the national cancer institute experience. *PloS One*, *8*(8), e70745. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0070745>
- Ho, R., Ortiz, D., & Shea, T. B. (2001). Amyloid-beta promotes calcium influx and neurodegeneration via stimulation of L voltage-sensitive calcium channels rather than NMDA channels in cultured neurons. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, *3*(5), 479–483. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12214034>
- Hof, P. R., & Morrison, J. H. (2004). The aging brain: morphomolecular senescence of cortical circuits. *Trends in Neurosciences*, *27*(10), 607–13. <http://doi.org/10.1016/j.tins.2004.07.013>
- Höglund, K., Wiklund, O., Vanderstichele, H., Eikenberg, O., Vanmechelen, E., & Blennow, K. (2004). Plasma levels of beta-amyloid(1-40), beta-amyloid(1-42), and total beta-amyloid remain unaffected in adult patients with hypercholesterolemia after treatment with statins. *Archives of Neurology*, *61*(3), 333–7. <http://doi.org/10.1001/archneur.61.3.333>
- Holler, C. J., Webb, R. L., Laux, A. L., Beckett, T. L., Niedowicz, D. M., Ahmed, R. R., Murphy, M. P. (2012). BACE2 expression increases in human neurodegenerative disease. *The American Journal of Pathology*, *180*(1), 337–50. <http://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.09.034>
- Holstein, S. A., & Hohl, R. J. (2003). Monoterpene regulation of Ras and Ras-related protein expression. *Journal of Lipid Research*, *44*(6), 1209–15. <http://doi.org/10.1194/jlr.M300057-JLR200>
- Holstein, S. A., & Hohl, R. J. (2004). Isoprenoids: remarkable diversity of form and function. *Lipids*, *39*(4), 293–309. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15357017>
- Hooff, G. P., Peters, I., Wood, W. G., Müller, W. E., & Eckert, G. P. (2010). Modulation of cholesterol, farnesylpyrophosphate, and geranylgeranylpyrophosphate in neuroblastoma SH-SY5Y-APP695 cells: impact on amyloid beta-protein production. *Molecular Neurobiology*, *41*(2–3), 341–50. <http://doi.org/10.1007/s12035-010-8117-5>

- Hooff, G. P., Volmer, D. a, Wood, W. G., Müller, W. E., & Eckert, G. P. (2008). Isoprenoid quantitation in human brain tissue: a validated HPLC-fluorescence detection method for endogenous farnesyl- (FPP) and geranylgeranylpyrophosphate (GGPP). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392(4), 673–80. <http://doi.org/10.1007/s00216-008-2306-3>
- Hooff, G. P., Wood, W. G., Kim, J.-H., Igbavboa, U., Ong, W.-Y., Muller, W. E., & Eckert, G. P. (2012). Brain isoprenoids farnesyl pyrophosphate and geranylgeranyl pyrophosphate are increased in aged mice. *Molecular Neurobiology*, 46(1), 179–85. <http://doi.org/10.1007/s12035-012-8285-6>
- Hooff, G. P., Wood, W. G., Müller, W. E., & Eckert, G. P. (2010). Isoprenoids, small GTPases and Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1801(8), 896–905. <http://doi.org/10.1016/j.bbali.2010.03.014>
- Hosaka, A., Araki, W., Oda, A., Tomidokoro, Y., & Tamaoka, A. (2013). Statins reduce amyloid  $\beta$ -peptide production by modulating amyloid precursor protein maturation and phosphorylation through a cholesterol-independent mechanism in cultured neurons. *Neurochemical Research*, 38(3), 589–600. <http://doi.org/10.1007/s11064-012-0956-1>
- Hottman, D. A., & Li, L. (2014). Protein prenylation and synaptic plasticity: implications for Alzheimer's disease. *Molecular Neurobiology*, 50(1), 177–85. <http://doi.org/10.1007/s12035-013-8627-z>
- Hottman, D., Cheng, S., Gram, A., LeBlanc, K., Yuan, L.-L., & Li, L. (2018). Systemic or Forebrain Neuron-Specific Deficiency of Geranylgeranyltransferase-1 Impairs Synaptic Plasticity and Reduces Dendritic Spine Density. *Neuroscience*, 373, 207–217. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.01.026>
- Hou, L., Shao, H., Zhang, Y., Li, H., Menon, N. K., Neuhaus, E. B., Zagorski, M. G. (2004). Solution NMR studies of the A $\beta$ (1-40) and A $\beta$ (1-42) peptides establish that the Met35 oxidation state affects the mechanism of amyloid formation. *Journal of the American Chemical Society*, 126(7), 1992–2005. <http://doi.org/10.1021/ja036813f>
- Howard, L., Lu, X., Mitchell, S., Griffiths, S., & Glynn, P. (1996). Molecular cloning of MADM: a catalytically active mammalian disintegrin-metalloprotease expressed in various cell types. *The Biochemical Journal*, 317 ( Pt 1, 45–50. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1217484&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract>
- Hoyer, S. (1994). Neurodegeneration, Alzheimer's disease, and beta-amyloid toxicity. *Life Sciences*, 55(25–26), 1977–83. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7997056>
- Hu, H., Zhou, Y., Leng, T., Liu, A., Wang, Y., You, X., ... Yan, G. (2014). The major cholesterol metabolite cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol functions as an endogenous neuroprotectant. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(34), 11426–38. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0344-14.2014>
- Hu, X., Hicks, C. W., He, W., Wong, P., Macklin, W. B., Trapp, B. D., & Yan, R. (2006). Bace1 modulates myelination in the central and peripheral nervous system. *Nature Neuroscience*, 9(12), 1520–5. <http://doi.org/10.1038/nn1797>

- Hu, X., Zhou, X., He, W., Yang, J., Xiong, W., Wong, P., Yan, R. (2010). BACE1 deficiency causes altered neuronal activity and neurodegeneration. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(26), 8819–29. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1334-10.2010>
- Huang, E. J., & Reichardt, L. F. (2003). Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annual Review of Biochemistry*, 72, 609–42. <http://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161629>
- Huang, T. H., Yang, D. S., Plaskos, N. P., Go, S., Yip, C. M., Fraser, P. E., & Chakrabarty, A. (2000). Structural studies of soluble oligomers of the Alzheimer beta-amyloid peptide. *Journal of Molecular Biology*, 297(1), 73–87. <http://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3559>
- Hübner, J. (2008). *Komplementäre Onkologie: supportive Maßnahmen und evidenzbasierte Empfehlungen ; mit tabellarischen Übersichten im Anhang ; auf CD-ROM: ausdrückbare Patienteninformationen zu allen Komplementärsstoffen*. Schattauer Verlag. Retrieved from <http://books.google.com/books?id=Paw2FmnHCfoC&pgis=1>
- Hudes, G. R., Szarka, C. E., Adams, A., Ranganathan, S., McCauley, R. A., Weiner, L. M., Gallo, J. M. (2000). Phase I pharmacokinetic trial of perillyl alcohol (NSC 641066) in patients with refractory solid malignancies. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 6(8), 3071–80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10955786>
- Huesa, G., Baltrons, M. A., Gómez-Ramos, P., Morán, A., García, A., Hidalgo, J., ... Galea, E. (2010). Altered distribution of RhoA in Alzheimer's disease and AbetaPP overexpressing mice. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 19(1), 37–56. <http://doi.org/10.3233/JAD-2010-1203>
- Huse, J. T., Liu, K., Pijak, D. S., Carlin, D., Lee, V. M.-Y., & Doms, R. W. (2002). Beta-secretase processing in the trans-Golgi network preferentially generates truncated amyloid species that accumulate in Alzheimer's disease brain. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(18), 16278–84. <http://doi.org/10.1074/jbc.M111141200>
- Hutagalung, A. H., & Novick, P. J. (2011). Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiological Reviews*, 91(1), 119–49. <http://doi.org/10.1152/physrev.00059.2009>
- Igbavboa, U., Avdulov, N. A., Schroeder, F., & Wood, W. G. (1996). Increasing age alters transbilayer fluidity and cholesterol asymmetry in synaptic plasma membranes of mice. *Journal of Neurochemistry*, 66(4), 1717–25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8627330>
- Ikonen, E. (2001). Roles of lipid rafts in membrane transport. *Current Opinion in Cell Biology*, 13(4), 470–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11454454>
- Imamura, M., Sasaki, O., Okunishi, K., Nakagome, K., Harada, H., Kawahata, K., ... Dohi, M. (2014). Perillyl alcohol suppresses antigen-induced immune responses in the lung. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 443(1), 266–71. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.11.106>

- Iribarren, P., Zhou, Y., Hu, J., Le, Y., & Wang, J. M. (2005). Role of formyl peptide receptor-like 1 (FPR1/FPR2) in mononuclear phagocyte responses in Alzheimer disease. *Immunologic Research*, 31(3), 165–76. <http://doi.org/10.1385/IR:31:3:165>
- Iso, H., Jacobs, D. R., Wentworth, D., Neaton, J. D., & Cohen, J. D. (1989). Serum cholesterol levels and six-year mortality from stroke in 350,977 men screened for the multiple risk factor intervention trial. *The New England Journal of Medicine*, 320(14), 904–10. <http://doi.org/10.1056/NEJM198904063201405>
- Iwatsubo, T. (2004). The gamma-secretase complex: machinery for intramembrane proteolysis. *Current Opinion in Neurobiology*, 14(3), 379–83. <http://doi.org/10.1016/j.conb.2004.05.010>
- Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, H., Nukina, N., & Ihara, Y. (1994). Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron*, 13(1), 45–53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8043280>
- Jack, C. R., Lowe, V. J., Senjem, M. L., Weigand, S. D., Kemp, B. J., Shiung, M. M., Petersen, R. C. (2008). 11C PiB and structural MRI provide complementary information in imaging of Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment. *Brain: A Journal of Neurology*, 131(Pt 3), 665–80. <http://doi.org/10.1093/brain/awm336>
- Jacobsen, K. T., & Iverfeldt, K. (2009). Amyloid precursor protein and its homologues: a family of proteolysis-dependent receptors. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 66(14), 2299–318. <http://doi.org/10.1007/s00018-009-0020-8>
- Jaffe, A. B., & Hall, A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21, 247–69. <http://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.020604.150721>
- Jahn, R., Schiebler, W., Ouimet, C., & Greengard, P. (1985). A 38,000-dalton membrane protein (p38) present in synaptic vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(12), 4137–41. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=397950&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Jan, A., Adolfsson, O., Allaman, I., Buccarello, A.-L., Magistretti, P. J., Pfeifer, A., Lashuel, H. A. (2011). Abeta42 neurotoxicity is mediated by ongoing nucleated polymerization process rather than by discrete Abeta42 species. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(10), 8585–96. <http://doi.org/10.1074/jbc.M110.172411>
- Jana, M. K., Cappai, R., Pham, C. L. L., & Ciccotosto, G. D. (2016). Membrane-bound tetramer and trimer Aβ oligomeric species correlate with toxicity towards cultured neurons. *Journal of Neurochemistry*, 136(3), 594–608. <http://doi.org/10.1111/jnc.13443>
- Jang, S.-W., Liu, X., Yepes, M., Shepherd, K. R., Miller, G. W., Liu, Y., Ye, K. (2010). A selective TrkB agonist with potent neurotrophic activities by 7,8-dihydroxyflavone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(6), 2687–92. <http://doi.org/10.1073/pnas.0913572107>



- Jarosz-Griffiths, H. H., Noble, E., Rushworth, J. V., & Hooper, N. M. (2016). Amyloid- $\beta$  Receptors: The Good, the Bad, and the Prion Protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(7), 3174–83. <http://doi.org/10.1074/jbc.R115.702704>
- Jarrett, J. T., Berger, E. P., & Lansbury, P. T. (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. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8490014>
- Jarvik, G. P., Wijsman, E. M., Kukull, W. A., Schellenberg, G. D., Yu, C., & Larson, E. B. (1995). Interactions of apolipoprotein E genotype, total cholesterol level, age, and sex in prediction of Alzheimer's disease: a case-control study. *Neurology*, 45(6), 1092–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7783869>
- Jellinger, K. A., & Attems, J. (2013). Neuropathological approaches to cerebral aging and neuroplasticity. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 15(1), 29–43. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3622466&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
- Jeong, A., Suazo, K. F., Wood, W. G., Distefano, M. D., & Li, L. (2018). Isoprenoids and protein prenylation: implications in the pathogenesis and therapeutic intervention of Alzheimer's disease. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 53(3), 279–310. <http://doi.org/10.1080/10409238.2018.1458070>
- Jeuken, J., van den Broecke, C., Gijzen, S., Boots-Sprenger, S., & Wesseling, P. (2007). RAS/RAF pathway activation in gliomas: the result of copy number gains rather than activating mutations. *Acta Neuropathologica*, 114(2), 121–33. <http://doi.org/10.1007/s00401-007-0239-0>
- Jiang, Z., Zheng, X., Lytle, R. A., Higashikubo, R., & Rich, K. M. (2004). Lovastatin-induced up-regulation of the BH3-only protein, Bim, and cell death in glioblastoma cells. *Journal of Neurochemistry*, 89(1), 168–78. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02319.x>
- Jin, H., Chen, T., Li, G., Wang, C., Zhang, B., Cao, X., ... Chen, L. (2016). Dose-Dependent Neuroprotection and Neurotoxicity of Simvastatin through Reduction of Farnesyl Pyrophosphate in Mice Treated with Intracerebroventricular Injection of A $\beta$  1-42. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 50(2), 501–16. <http://doi.org/10.3233/JAD-150782>
- Joachim, C. L., & Selkoe, D. J. (1992). The seminal role of beta-amyloid in the pathogenesis of Alzheimer disease. *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, 6(1), 7–34. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1605946>
- Johnson-Anuna, L. N., Eckert, G. P., Keller, J. H., Igbavboa, U., Franke, C., Fechner, T., Wood, W. G. (2005). Chronic administration of statins alters multiple gene expression patterns in mouse cerebral cortex. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 312(2), 786–93. <http://doi.org/10.1124/jpet.104.075028>
- Johnson, D. S., & Chen, Y. H. (2012). Ras family of small GTPases in immunity and inflammation. *Current Opinion in Pharmacology*, 12(4), 458–63. <http://doi.org/10.1016/j.coph.2012.02.003>

- Johnson, R. A., Lam, M., Punzo, A. M., Li, H., Lin, B. R., Ye, K., Chang, Q. (2012). 7,8-dihydroxyflavone exhibits therapeutic efficacy in a mouse model of Rett syndrome. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 112(5), 704–10. <http://doi.org/10.1152/jappphysiol.01361.2011>
- Johnson, W. J., Phillips, M. C., & Rothblat, G. H. (1997). Lipoproteins and cellular cholesterol homeostasis. *Sub-Cellular Biochemistry*, 28, 235–76. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9090297>
- Jones, K. D., Couldwell, W. T., Hinton, D. R., Su, Y., He, S., Anker, L., & Law, R. E. (1994). Lovastatin induces growth inhibition and apoptosis in human malignant glioma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 205(3), 1681–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7811252>
- Jonsson, T., Stefansson, H., Steinberg, S., Jonsdottir, I., Jonsson, P. V, Snaedal, J., Stefansson, K. (2013). Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine*, 368(2), 107–16. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1211103>
- Kabara, J. J. (1973). A critical review of brain cholesterol metabolism. *Progress in Brain Research*, 40, 363–82. [http://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)60700-1](http://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)60700-1)
- Kahn, R. A., Goddard, C., & Newkirk, M. (1988). Chemical and immunological characterization of the 21-kDa ADP-ribosylation factor of adenylate cyclase. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(17), 8282–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3131341>
- Kandalepas, P. C., & Vassar, R. (2012). Identification and biology of  $\beta$ -secretase. *Journal of Neurochemistry*, 120 Suppl, 55–61. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07512.x>
- Kanekiyo, T., Xu, H., & Bu, G. (2014). ApoE and A $\beta$  in Alzheimer's Disease: Accidental Encounters or Partners? *Neuron*, 81(4), 740–754. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.01.045>
- Kang, D. E., Pietrzik, C. U., Baum, L., Chevallier, N., Merriam, D. E., Kounnas, M. Z., Koo, E. H. (2000). Modulation of amyloid beta-protein clearance and Alzheimer's disease susceptibility by the LDL receptor-related protein pathway. *The Journal of Clinical Investigation*, 106(9), 1159–66. <http://doi.org/10.1172/JCI11013>
- Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., Müller-Hill, B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*, 325(6106), 733–6. <http://doi.org/10.1038/325733a0>
- Kannel, W. B., Castelli, W. P., Gordon, T., & McNamara, P. M. (1971). Serum cholesterol, lipoproteins, and the risk of coronary heart disease. The Framingham study. *Annals of Internal Medicine*, 74(1), 1–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5539274>
- Karlson, J., Borg-Karlson, A. K., Unelius, R., Shoshan, M. C., Wilking, N., Ringborg, U., & Linder, S. (1996). Inhibition of tumor cell growth by monoterpenes in vitro: evidence of a Ras-independent mechanism of action. *Anti-Cancer Drugs*, 7(4), 422–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8826611>

- Karlson Peter; Doenecke Detlef; Koolman Jan; Fuchs Georg; Gerock Wolfgang. (2005). *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie - Karlson Peter; Doenecke Detlef; Koolman Jan; Fuchs Georg; Gerock Wolfgang - 15., komplett überarbeitete und neugestaltete Auflage*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York. Retrieved from [https://books.google.de/books?id=8Eu\\_Hy8aVzMC&pg=PA318&dq=isoprenoide&hl=de&sa=X&ved=0ahUKEwiR4O\\_RiLvUAhWOalAKHQf8BGAQ6AEIKTAB#v=onepage&q=isoprenoide&f=false](https://books.google.de/books?id=8Eu_Hy8aVzMC&pg=PA318&dq=isoprenoide&hl=de&sa=X&ved=0ahUKEwiR4O_RiLvUAhWOalAKHQf8BGAQ6AEIKTAB#v=onepage&q=isoprenoide&f=false)
- Karlsson, I. K., Ploner, A., Song, C., Gatz, M., Pedersen, N. L., & Hägg, S. (2017). Genetic susceptibility to cardiovascular disease and risk of dementia. *Translational Psychiatry*, 7(5), e1142. <http://doi.org/10.1038/tp.2017.110>
- Karran, E., & De Strooper, B. (2016). The amyloid cascade hypothesis: are we poised for success or failure? *Journal of Neurochemistry*, 139, 237–252. <http://doi.org/10.1111/jnc.13632>
- Kato, T., Konishi, Y., Shimohama, S., Beach, T. G., Akatsu, H., & Tooyama, I. (2015). Alpha1-chimaerin, a Rac1 GTPase-activating protein, is expressed at reduced mRNA levels in the brain of Alzheimer's disease patients. *Neuroscience Letters*, 591, 19–24. <http://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.02.013>
- Kawauchi, T., Chihama, K., Nabeshima, Y., & Hoshino, M. (2003). The in vivo roles of STEF/Tiam1, Rac1 and JNK in cortical neuronal migration. *The EMBO Journal*, 22(16), 4190–201. <http://doi.org/10.1093/emboj/cdg413>
- Kayed, R., Pensalfini, A., Margol, L., Sokolov, Y., Sarsoza, F., Head, E., ... Glabe, C. (2009). Annular protofibrils are a structurally and functionally distinct type of amyloid oligomer. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(7), 4230–7. <http://doi.org/10.1074/jbc.M808591200>
- Keleshian, V. L., Modi, H. R., Rapoport, S. I., & Rao, J. S. (2013). Aging is associated with altered inflammatory, arachidonic acid cascade, and synaptic markers, influenced by epigenetic modifications, in the human frontal cortex. *Journal of Neurochemistry*, 125(1), 63–73. <http://doi.org/10.1111/jnc.12153>
- Kelly, E. E., Horgan, C. P., & McCaffrey, M. W. (2012). Rab11 proteins in health and disease. *Biochemical Society Transactions*, 40(6), 1360–7. <http://doi.org/10.1042/BST20120157>
- Kennedy, M. B., Beale, H. C., Carlisle, H. J., & Washburn, L. R. (2005). Integration of biochemical signalling in spines. *Nature Reviews. Neuroscience*, 6(6), 423–34. <http://doi.org/10.1038/nrn1685>
- Khosravi-Far, R., & Der, C. J. (1994). The Ras signal transduction pathway. *Cancer and Metastasis Reviews*, 13(1), 67–89. <http://doi.org/10.1007/BF00690419>
- Kienlen-Campard, P., Miolet, S., Tasiaux, B., & Octave, J.-N. (2002). Intracellular amyloid-beta 1-42, but not extracellular soluble amyloid-beta peptides, induces neuronal apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(18), 15666–70. <http://doi.org/10.1074/jbc.M200887200>
- Kim, I. A., Fernandes, A. T., Gupta, A. K., McKenna, W. G., & Bernhard, E. J. (2004). The influence of Ras pathway signaling on tumor radiosensitivity. *Cancer Metastasis Reviews*, 23(3–4), 227–36. <http://doi.org/10.1023/B:CANC.0000031763.95152.09>

- Kinoshita, A., Fukumoto, H., Shah, T., Whelan, C. M., Irizarry, M. C., & Hyman, B. T. (2003). Demonstration by FRET of BACE interaction with the amyloid precursor protein at the cell surface and in early endosomes. *Journal of Cell Science*, *116*(Pt 16), 3339–46. <http://doi.org/10.1242/jcs.00643>
- Kiraly, D. D., Eipper-Mains, J. E., Mains, R. E., & Eipper, B. A. (2010). Synaptic plasticity, a symphony in GEF. *ACS Chemical Neuroscience*, *1*(5), 348–365. <http://doi.org/10.1021/cn100012x>
- Kirkkitadze, M. D., Condrón, M. M., & Teplow, D. B. (2001). Identification and characterization of key kinetic intermediates in amyloid beta-protein fibrillogenesis. *Journal of Molecular Biology*, *312*(5), 1103–19. <http://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4970>
- Kirsch, C., Eckert, G. P., & Mueller, W. E. (2002). Cholesterol attenuates the membrane perturbing properties of beta-amyloid peptides. *Amyloid: The International Journal of Experimental and Clinical Investigation: The Official Journal of the International Society of Amyloidosis*, *9*(3), 149–59. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12408677>
- Kirsch, C., Eckert, G. P., & Mueller, W. E. (2003). Statin effects on cholesterol micro-domains in brain plasma membranes. *Biochemical Pharmacology*, *65*(5), 843–56. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12628479>
- Kitazume, S., Tachida, Y., Kato, M., Yamaguchi, Y., Honda, T., Hashimoto, Y., ... Taniguchi, N. (2010). Brain endothelial cells produce amyloid {beta} from amyloid precursor protein 770 and preferentially secrete the O-glycosylated form. *The Journal of Biological Chemistry*, *285*(51), 40097–103. <http://doi.org/10.1074/jbc.M110.144626>
- Kivipelto, M., Helkala, E.-L., Laakso, M. P., Hänninen, T., Hallikainen, M., Alhainen, K., Soininen, H. (2002). Apolipoprotein E epsilon4 allele, elevated midlife total cholesterol level, and high midlife systolic blood pressure are independent risk factors for late-life Alzheimer disease. *Annals of Internal Medicine*, *137*(3), 149–55. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12160362>
- Klein, R., Conway, D., Parada, L. F., & Barbacid, M. (1990). The trkB tyrosine protein kinase gene codes for a second neurogenic receptor that lacks the catalytic kinase domain. *Cell*, *61*(4), 647–56. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2160854>
- Klein, R., Martin-Zanca, D., Barbacid, M., & Parada, L. F. (1990). Expression of the tyrosine kinase receptor gene trkB is confined to the murine embryonic and adult nervous system. *Development (Cambridge, England)*, *109*(4), 845–50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2171894>
- Klein, R., Nanduri, V., Jing, S. A., Lamballe, F., Tapley, P., Bryant, S., Barbacid, M. (1991). The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell*, *66*(2), 395–403. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2710095&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
- Klyubin, I., Walsh, D. M., Cullen, W. K., Fadeeva, J. V, Anwyl, R., Selkoe, D. J., & Rowan, M. J. (2004). Soluble Arctic amyloid beta protein inhibits hippocampal long-term potentiation in vivo. *The European Journal of Neuroscience*, *19*(10), 2839–46. <http://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03389.x>

- Koike, H., Tomioka, S., Sorimachi, H., Saido, T. C., Maruyama, K., Okuyama, A., Ishiura, S. (1999). Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. *The Biochemical Journal*, 343 Pt 2, 371–5. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1220563&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
- Kölsch, H., Ptok, U., Mohamed, I., Schmitz, S., Rao, M. L., Maier, W., & Heun, R. (2003). Association of the C766T polymorphism of the low-density lipoprotein receptor-related protein gene with Alzheimer's disease. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics: The Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, 121B(1), 128–30. <http://doi.org/10.1002/ajmg.b.20043>
- Koseoglu, M. M., Ozdilek, B. A., Djakbarova, U., & Gulusur, A. (2016). Targeting Ras Activity Prevented Amyloid Beta-Induced Aberrant Neuronal Cell Cycle Re-Entry and Death. *Current Alzheimer Research*, 13(11), 1267–1276. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27357648>
- Koyuturk, M., Ersoz, M., & Altioek, N. (2004). Simvastatin induces proliferation inhibition and apoptosis in C6 glioma cells via c-jun N-terminal kinase. *Neuroscience Letters*, 370(2–3), 212–7. <http://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.08.020>
- Krafft, G. A., & Klein, W. L. (2010). ADDLs and the signaling web that leads to Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, 59(4–5), 230–42. <http://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.07.012>
- Kuhn, P.-H., Wang, H., Dislich, B., Colombo, A., Zeitschel, U., Ellwart, J. W., Lichtenthaler, S. F. (2010). ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *The EMBO Journal*, 29(17), 3020–32. <http://doi.org/10.1038/emboj.2010.167>
- Kukar, T., Murphy, M. P., Eriksen, J. L., Sagi, S. A., Weggen, S., Smith, T. E., Golde, T. E. (2005). Diverse compounds mimic Alzheimer disease-causing mutations by augmenting Abeta42 production. *Nature Medicine*, 11(5), 545–50. <http://doi.org/10.1038/nm1235>
- Kumar, B., Andreatta, C., Koustas, W. T., Cole, W. C., Edwards-Prasad, J., & Prasad, K. N. (2002). Mevastatin induces degeneration and decreases viability of cAMP-induced differentiated neuroblastoma cells in culture by inhibiting proteasome activity, and mevalonic acid lactone prevents these effects. *Journal of Neuroscience Research*, 68(5), 627–35. <http://doi.org/10.1002/jnr.10241>
- Kumar, S., Wirths, O., Stüber, K., Wunderlich, P., Koch, P., Theil, S., Walter, J. (2016). Phosphorylation of the amyloid  $\beta$ -peptide at Ser26 stabilizes oligomeric assembly and increases neurotoxicity. *Acta Neuropathologica*, 131(4), 525–37. <http://doi.org/10.1007/s00401-016-1546-0>
- Kunda, P., Paglini, G., Quiroga, S., Kosik, K., & Caceres, A. (2001). Evidence for the involvement of Tiam1 in axon formation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(7), 2361–72. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11264310>

- LaFerla, F. M., Green, K. N., & Oddo, S. (2007). Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nature Reviews. Neuroscience*, 8(7), 499–509. <http://doi.org/10.1038/nrn2168>
- LaFerla, F. M., Tinkle, B. T., Bieberich, C. J., Haudenschild, C. C., & Jay, G. (1995). The Alzheimer's A beta peptide induces neurodegeneration and apoptotic cell death in transgenic mice. *Nature Genetics*, 9(1), 21–30. <http://doi.org/10.1038/ng0195-21>
- Lai, C.-L., Liou, L.-M., Liu, C.-K., Yang, Y.-H., & Lin, R.-T. (2014). Effects of metabolic syndrome, apolipoprotein E, and CYP46 on cognition among Taiwanese Chinese. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 30(7), 343–9. <http://doi.org/10.1016/j.kjms.2014.03.005>
- Lai, F., Stubbs, L., & Artzt, K. (1994). Molecular analysis of mouse Rab11b: a new type of mammalian YPT/Rab protein. *Genomics*, 22(3), 610–6. <http://doi.org/10.1006/geno.1994.1434>
- Lai, K.-O., Wong, A. S. L., Cheung, M.-C., Xu, P., Liang, Z., Lok, K.-C., Ip, N. Y. (2012). TrkB phosphorylation by Cdk5 is required for activity-dependent structural plasticity and spatial memory. *Nature Neuroscience*, 15(11), 1506–15. <http://doi.org/10.1038/nn.3237>
- Laird, F. M., Cai, H., Savonenko, A. V., Farah, M. H., He, K., Melnikova, T., Wong, P. C. (2005). BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid-beta amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(50), 11693–709. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2766-05.2005>
- Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Fahrenholz, F. (1999). Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(7), 3922–7. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=22396&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Lane, K. T. (2006). Thematic review series: Lipid Posttranslational Modifications. Structural biology of protein farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase type I. *The Journal of Lipid Research*, 47(4), 681–699. <http://doi.org/10.1194/jlr.R600002-JLR200>
- Lantry, L. E., Zhang, Z., Crist, K. A., Wang, Y., Hara, M., Zeeck, A., You, M. (2000). Chemopreventive efficacy of promising farnesyltransferase inhibitors. *Experimental Lung Research*, 26(8), 773–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11195470>
- Larner, J., Jane, J., Laws, E., Packer, R., Myers, C., & Shaffrey, M. (1998). A phase I-II trial of lovastatin for anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. *American Journal of Clinical Oncology*, 21(6), 579–83. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9856659>
- Larsson, O. (1996). HMG-CoA reductase inhibitors: role in normal and malignant cells. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 22(3), 197–212. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8793275>

- Lashuel, H. A., Hartley, D., Petre, B. M., Walz, T., & Lansbury, P. T. (2002). Neurodegenerative disease: amyloid pores from pathogenic mutations. *Nature*, *418*(6895), 291. <http://doi.org/10.1038/418291a>
- LeBlanc, A. C. (2017). Novel therapeutic target against Alzheimer. *Oncotarget*. <http://doi.org/10.18632/oncotarget.18210>
- Ledreux, A., Wang, X., Schultzberg, M., Granholm, A.-C., & Freeman, L. R. (2016). Detrimental effects of a high fat/high cholesterol diet on memory and hippocampal markers in aged rats. *Behavioural Brain Research*, *312*, 294–304. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.06.012>
- Lee, D. H. S., & Wang, H.-Y. (2003). Differential physiologic responses of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors to beta-amyloid1-40 and beta-amyloid1-42. *Journal of Neurobiology*, *55*(1), 25–30. <http://doi.org/10.1002/neu.10203>
- Lee, M., You, H.-J., Cho, S.-H., Woo, C.-H., Yoo, M.-H., Joe, E.-H., & Kim, J.-H. (2002). Implication of the small GTPase Rac1 in the generation of reactive oxygen species in response to beta-amyloid in C6 astrogloma cells. *The Biochemical Journal*, *366*(Pt 3), 937–43. <http://doi.org/10.1042/BJ20020453>
- Leeuwen, F. N., Kain, H. E., Kammen, R. A., Michiels, F., Kranenburg, O. W., & Collard, J. G. (1997). The guanine nucleotide exchange factor Tiam1 affects neuronal morphology; opposing roles for the small GTPases Rac and Rho. *The Journal of Cell Biology*, *139*(3), 797–807. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2141700&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Lefranc, F., Xu, Z., Burth, P., Mathieu, V., Revelant, G., de Castro Faria, M. V., Kiss, R. (2013). 4-Bromo-2-(piperidin-1-yl)thiazol-5-yl-phenyl methanone (12b) inhibits Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and Ras oncogene activity in cancer cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *63*, 213–23. <http://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.01.046>
- Leoni, V., & Caccia, C. (2011). Oxysterols as biomarkers in neurodegenerative diseases. *Chemistry and Physics of Lipids*, *164*(6), 515–24. <http://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2011.04.002>
- Lesné, S., Koh, M. T., Kotilinek, L., Kaye, R., Glabe, C. G., Yang, A., Ashe, K. H. (2006). A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature*, *440*(7082), 352–7. <http://doi.org/10.1038/nature04533>
- Lev, S. (2010). Non-vesicular lipid transport by lipid-transfer proteins and beyond. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *11*(10), 739–50. <http://doi.org/10.1038/nrm2971>
- Levi-Montalcini, R. (1987). The nerve growth factor: thirty-five years later. *The EMBO Journal*, *6*(5), 1145–54. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=553912&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- LEVI-MONTALCINI, R., & HAMBURGER, V. (1951). Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *The Journal of Experimental Zoology*, *116*(2), 321–61. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14824426>

- Lewin, G. R., & Barde, Y. A. (1996). Physiology of the neurotrophins. *Annual Review of Neuroscience*, *19*, 289–317. <http://doi.org/10.1146/annurev.ne.19.030196.001445>
- Li, B., Yuan, M., Kim, I.-A., Chang, C.-M., Bernhard, E. J., & Shu, H.-K. G. (2004). Mutant epidermal growth factor receptor displays increased signaling through the phosphatidylinositol-3 kinase/AKT pathway and promotes radioresistance in cells of astrocytic origin. *Oncogene*, *23*(26), 4594–602. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1207602>
- Li, H., Kuwajima, T., Oakley, D., Nikulina, E., Hou, J., Yang, W. S., Henderson, C. E. (2016). Protein Prenylation Constitutes an Endogenous Brake on Axonal Growth. *Cell Reports*, *16*(2), 545–58. <http://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.06.013>
- Li, H. Y., Appelbaum, F. R., Willman, C. L., Zager, R. A., & Banker, D. E. (2003). Cholesterol-modulating agents kill acute myeloid leukemia cells and sensitize them to therapeutics by blocking adaptive cholesterol responses. *Blood*, *101*(9), 3628–34. <http://doi.org/10.1182/blood-2002-07-2283>
- Li, L., Cao, D., Kim, H., Lester, R., & Fukuchi, K.-I. (2006). Simvastatin enhances learning and memory independent of amyloid load in mice. *Annals of Neurology*, *60*(6), 729–39. <http://doi.org/10.1002/ana.21053>
- Li, L., Zhang, W., Cheng, S., Cao, D., & Parent, M. (2012). Isoprenoids and related pharmacological interventions: potential application in Alzheimer's disease. *Molecular Neurobiology*, *46*(1), 64–77. <http://doi.org/10.1007/s12035-012-8253-1>
- Li, M., Chen, L., Lee, D. H. S., Yu, L.-C., & Zhang, Y. (2007). The role of intracellular amyloid beta in Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology*, *83*(3), 131–9. <http://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2007.08.002>
- Li, M., Wang, W., Li, Y., Wang, L., Shen, X., & Tang, Z. (2013). CYP46A1 intron-2T/C polymorphism and Alzheimer's disease: an updated meta-analysis of 16 studies including 3,960 cases and 3,828 controls. *Neuroscience Letters*, *549*, 18–23. <http://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.06.011>
- Li, X.-H., Dai, C.-F., Chen, L., Zhou, W.-T., Han, H.-L., & Dong, Z.-F. (2016). 7,8-dihydroxyflavone Ameliorates Motor Deficits Via Suppressing  $\alpha$ -synuclein Expression and Oxidative Stress in the MPTP-induced Mouse Model of Parkinson's Disease. *CNS Neuroscience & Therapeutics*. <http://doi.org/10.1111/cns.12555>
- Li, Z., Sun, C., Zhang, T., Mo, J., Shi, Q., Zhang, X., Zhou, X. (2013). Geranylgeranyltransferase I mediates BDNF-induced synaptogenesis. *Journal of Neurochemistry*, *125*(5), 698–712. <http://doi.org/10.1111/jnc.12249>
- Liang CC, Park AY, G. J. (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. - PubMed - NCBI. Retrieved April 19, 2016, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17406593>
- Liang, P.-H., Ko, T.-P., & Wang, A. H.-J. (2002). Structure, mechanism and function of prenyltransferases. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, *269*(14), 3339–54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12135472>



- Liao, J. K. (2002). Isoprenoids as mediators of the biological effects of statins. *The Journal of Clinical Investigation*, 110(3), 285–8. <http://doi.org/10.1172/JC116421>
- Liao, J. K., & Laufs, U. (2005). Pleiotropic effects of statins. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45, 89–118. <http://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095748>
- Lilja, A. M., Rödner, J., Mustafiz, T., Thomé, C. M., Storelli, E., Gonzalez, D., Marutle, A. (2013). Age-dependent neuroplasticity mechanisms in Alzheimer Tg2576 mice following modulation of brain amyloid- $\beta$  levels. *PLoS One*, 8(3), e58752. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0058752>
- Ling, Q., & Tejada-Simon, M. V. (2016). Statins and the brain: New perspective for old drugs. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 66, 80–6. <http://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.11.013>
- Lingwood, D., & Simons, K. (2010). Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle. *Science*, 327(5961), 46–50. <http://doi.org/10.1126/science.1174621>
- Liu, X., Chan, C.-B., Jang, S.-W., Pradoldej, S., Huang, J., He, K., Ye, K. (2010). A synthetic 7,8-dihydroxyflavone derivative promotes neurogenesis and exhibits potent antidepressant effect. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(23), 8274–86. <http://doi.org/10.1021/jm101206p>
- Lo, H.-W. (2010a). Targeting Ras-RAF-ERK and its interactive pathways as a novel therapy for malignant gliomas. *Current Cancer Drug Targets*, 10(8), 840–8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3615246&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
- Lo, H.-W. (2010b). Targeting Ras-RAF-ERK and its interactive pathways as a novel therapy for malignant gliomas. *Current Cancer Drug Targets*, 10(8), 840–848. <http://doi.org/10.2174/156800910793357970>
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6), 1194–217. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>
- Lopez, E. M., Bell, K. F. S., Ribeiro-da-Silva, A., & Cuello, A. C. (2004). Early changes in neurons of the hippocampus and neocortex in transgenic rats expressing intracellular human  $\alpha$ -beta. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 6(4), 421–31; discussion 443–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15345813>
- Lorenzo, A., & Yankner, B. A. (1994). Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(25), 12243–7. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=45413&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
- Lorenzo, A., & Yankner, B. A. (1996). Amyloid fibril toxicity in Alzheimer's disease and diabetes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 777, 89–95. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8624132>
- Lu, J.-X., Qiang, W., Yau, W.-M., Schwieters, C. D., Meredith, S. C., & Tycko, R. (2013). Molecular structure of  $\beta$ -amyloid fibrils in Alzheimer's disease brain tissue. *Cell*, 154(6), 1257–68. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.035>

- Lu, X.-G., Zhan, L.-B., Feng, B.-A., Qu, M.-Y., Yu, L.-H., & Xie, J.-H. (2004). Inhibition of growth and metastasis of human gastric cancer implanted in nude mice by d-limonene. *World Journal of Gastroenterology*, *10*(14), 2140–4. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4572353&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
- Lührs, T., Ritter, C., Adrian, M., Riek-Loher, D., Bohrmann, B., Döbeli, H., Riek, R. (2005). 3D structure of Alzheimer's amyloid-beta(1-42) fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(48), 17342–7. <http://doi.org/10.1073/pnas.0506723102>
- Luo, D., Shi, Y., Wang, J., Lin, Q., Sun, Y., Ye, K., ... Zhang, H. (2016). 7,8-dihydroxyflavone protects 6-OHDA and MPTP induced dopaminergic neurons degeneration through activation of TrkB in rodents. *Neuroscience Letters*, *620*, 43–9. <http://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.03.042>
- Luo, L. (2000). Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nature Reviews. Neuroscience*, *1*(3), 173–80. <http://doi.org/10.1038/35044547>
- Luo, Z. G., Je, H.-S., Wang, Q., Yang, F., Dobbins, G. C., Yang, Z.-H., Mei, L. (2003). Implication of geranylgeranyltransferase I in synapse formation. *Neuron*, *40*(4), 703–17. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14622576>
- Lütjohann, D., Papassotiropoulos, A., Björkhem, I., Locatelli, S., Bagli, M., Oehring, R. D., ... Heun, R. (2000). Plasma 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) is increased in Alzheimer and vascular demented patients. *Journal of Lipid Research*, *41*(2), 195–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10681402>
- Ma, Q.-L., Yang, F., Calon, F., Ubeda, O. J., Hansen, J. E., Weisbart, R. H., Cole, G. M. (2008). p21-activated kinase-aberrant activation and translocation in Alzheimer disease pathogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(20), 14132–43. <http://doi.org/10.1074/jbc.M708034200>
- MacLeod, R., Hillert, E.-K., Cameron, R. T., & Baillie, G. S. (2015). The role and therapeutic targeting of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretase in Alzheimer's disease. *Future Science OA*, *1*(3), fso.15.9. <http://doi.org/10.4155/fso.15.9>
- Maher, P. (2001, May 1). How protein kinase C activation protects nerve cells from oxidative stress-induced cell death. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *21*(9), 2929–38. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11312276>
- Mahley, R. W. (2016). Central Nervous System Lipoproteins: ApoE and Regulation of Cholesterol Metabolism. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *36*(7), 1305–1315. <http://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.307023>
- Maillet, D., & Rajah, M. N. (2013). Association between prefrontal activity and volume change in prefrontal and medial temporal lobes in aging and dementia: a review. *Ageing Research Reviews*, *12*(2), 479–89. <http://doi.org/10.1016/j.arr.2012.11.001>
- Mailman, T., Hariharan, M., & Karten, B. (2011). Inhibition of neuronal cholesterol biosynthesis with lovastatin leads to impaired synaptic vesicle release even in the presence of lipoproteins or geranylgeraniol. *Journal of Neurochemistry*, *119*(5), 1002–1015. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07474.x>

- Makar, T. K., Nimmagadda, V. K. C., Singh, I. S., Lam, K., Mubariz, F., Judge, S. I. V., Bever, C. T. (2016). TrkB agonist, 7,8-dihydroxyflavone, reduces the clinical and pathological severity of a murine model of multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 292, 9–20. <http://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2016.01.002>
- Maltese, W. A. (1990). Posttranslational modification of proteins by isoprenoids in mammalian cells. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 4(15), 3319–28. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2123808>
- Mancuso, M., Calsolaro, V., Orsucci, D., Carlesi, C., Choub, A., Piazza, S., & Siciliano, G. (2009). Mitochondria, Cognitive Impairment, and Alzheimer's Disease. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2009, 1–8. <http://doi.org/10.4061/2009/951548>
- Maness, L. M., Kastin, A. J., Weber, J. T., Banks, W. A., Beckman, B. S., & Zadina, J. E. (1994). The neurotrophins and their receptors: structure, function, and neuropathology. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 18(1), 143–59. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8170621>
- Mans, R. A., Chowdhury, N., Cao, D., McMahon, L. L., & Li, L. (2010). Simvastatin enhances hippocampal long-term potentiation in C57BL/6 mice. *Neuroscience*, 166(2), 435–44. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.12.062>
- Mans, R. A., McMahon, L. L., & Li, L. (2012). Simvastatin-mediated enhancement of long-term potentiation is driven by farnesyl-pyrophosphate depletion and inhibition of farnesylation. *Neuroscience*, 202, 1–9. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.12.007>
- Manterola, L., Hernando-Rodríguez, M., Ruiz, A., Apraiz, A., Arrizabalaga, O., Vellón, L., Zugaza, J. L. (2013). 1-42  $\beta$ -amyloid peptide requires PDK1/nPKC/Rac 1 pathway to induce neuronal death. *Translational Psychiatry*, 3, e219. <http://doi.org/10.1038/tp.2012.147>
- Mao, P., & Reddy, P. H. (2011). Aging and amyloid beta-induced oxidative DNA damage and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease: implications for early intervention and therapeutics. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1812(11), 1359–70. <http://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.08.005>
- Martinez, L. A., & Tejada-Simon, M. V. (2011). Pharmacological inactivation of the small GTPase Rac1 impairs long-term plasticity in the mouse hippocampus. *Neuropharmacology*, 61(1–2), 305–12. <http://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.04.017>
- Marzesco, A. M., Galli, T., Louvard, D., & Zahraoui, A. (1998). The rod cGMP phosphodiesterase delta subunit dissociates the small GTPase Rab13 from membranes. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(35), 22340–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9712853>
- Masters, C. L., & Beyreuther, K. (1991). Alzheimer's disease: molecular basis of structural lesions. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 1(4), 226–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1669713>

- Masters, C. L., & Selkoe, D. J. (2012). Biochemistry of Amyloid  $\beta$ -Protein and Amyloid Deposits in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(6), a006262–a006262. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a006262>
- Matsui, C., Inoue, E., Kakita, A., Arita, K., Deguchi-Tawarada, M., Togawa, A., ... Takahashi, H. (2012). Involvement of the  $\gamma$ -secretase-mediated EphA4 signaling pathway in synaptic pathogenesis of Alzheimer's disease. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 22(6), 776–87. <http://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2012.00587.x>
- Mattson, M. P., Barger, S. W., Cheng, B., Lieberburg, I., Smith-Swintosky, V. L., & Rydel, R. E. (1993). beta-Amyloid precursor protein metabolites and loss of neuronal  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in Alzheimer's disease. *Trends in Neurosciences*, 16(10), 409–14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7504356>
- Mauch, D. H., Nägler, K., Schumacher, S., Göritz, C., Müller, E. C., Otto, A., & Pfrieger, F. W. (2001). CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5545), 1354–7. <http://doi.org/10.1126/science.294.5545.1354>
- Maulik, M., Westaway, D., Jhamandas, J. H., & Kar, S. (2013). Role of cholesterol in APP metabolism and its significance in Alzheimer's disease pathogenesis. *Molecular Neurobiology*, 47(1), 37–63. <http://doi.org/10.1007/s12035-012-8337-y>
- Mavrakis, K. J., McKinlay, K. J., Jones, P., & Sablitzky, F. (2004). DEF6, a novel PH-DH-like domain protein, is an upstream activator of the Rho GTPases Rac1, Cdc42, and RhoA. *Experimental Cell Research*, 294(2), 335–44. <http://doi.org/10.1016/j.yexcr.2003.12.004>
- McAllister, A. K., Lo, D. C., & Katz, L. C. (1995). Neurotrophins regulate dendritic growth in developing visual cortex. *Neuron*, 15(4), 791–803. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7576629>
- McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D., & Stadlan, E. M. (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. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6610841>
- McKhann, G. M., Knopman, D. S., Chertkow, H., Hyman, B. T., Jack, C. R., Kawas, C. H., Phelps, C. H. (2011). The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia : The Journal of the Alzheimer's Association*, 7(3), 263–9. <http://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.005>
- McTaggart, S. J. (2006). Isoprenylated proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 63(3), 255–67. <http://doi.org/10.1007/s00018-005-5298-6>
- Mendoza-Naranjo, A., Gonzalez-Billault, C., & Maccioni, R. B. (2007). Abeta1-42 stimulates actin polymerization in hippocampal neurons through Rac1 and Cdc42 Rho GTPases. *Journal of Cell Science*, 120(Pt 2), 279–88. <http://doi.org/10.1242/jcs.03323>

- Messina, S., Leonetti, C., De Gregorio, G., Affatigato, V., Ragona, G., Frati, L., Porcellini, A. (2004). Ras inhibition amplifies cisplatin sensitivity of human glioblastoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 320(2), 493–500. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.06.003>
- Michaelson, D., Ali, W., Chiu, V. K., Bergo, M., Silletti, J., Wright, L., Philips, M. (2005). Postprenylation CAAX processing is required for proper localization of Ras but not Rho GTPases. *Molecular Biology of the Cell*, 16(4), 1606–16. <http://doi.org/10.1091/mbc.E04-11-0960>
- Michiels, F., Stam, J. C., Hordijk, P. L., van der Kammen, R. A., Ruuls-Van Stalle, L., Feltkamp, C. A., & Collard, J. G. (1997). Regulated membrane localization of Tiam1, mediated by the NH2-terminal pleckstrin homology domain, is required for Rac-dependent membrane ruffling and C-Jun NH2-terminal kinase activation. *The Journal of Cell Biology*, 137(2), 387–98. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2139766&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
- Miquel, K., Pradines, A., Tercé, F., Selmi, S., & Favre, G. (1998). Competitive inhibition of choline phosphotransferase by geranylgeraniol and farnesol inhibits phosphatidylcholine synthesis and induces apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(40), 26179–86. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9748300>
- Miyamoto, Y., Yamauchi, J., Tanoue, A., Wu, C., & Mobley, W. C. (2006). TrkB binds and tyrosine-phosphorylates Tiam1, leading to activation of Rac1 and induction of changes in cellular morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(27), 10444–9. <http://doi.org/10.1073/pnas.0603914103>
- Mizuguchi, M., Ikeda, K., & Kim, S. U. (1992). Differential distribution of cellular forms of beta-amyloid precursor protein in murine glial cell cultures. *Brain Research*, 584(1–2), 219–25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1515940>
- Mo, H., & Elson, C. E. (2004). Studies of the isoprenoid-mediated inhibition of mevalonate synthesis applied to cancer chemotherapy and chemoprevention. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, 229(7), 567–85. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15229351>
- Mohamed, A., Saavedra, L., Di Pardo, A., Sipione, S., & Posse de Chaves, E. (2012).  $\beta$ -amyloid inhibits protein prenylation and induces cholesterol sequestration by impairing SREBP-2 cleavage. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(19), 6490–500. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0630-12.2012>
- Möller, H.-J., Laux, G., & Kapfhammer, H.-P. (2007). *Psychiatrie und Psychotherapie*. Springer DE. Retrieved from <http://books.google.com/books?id=7PnAa7JDSkAC&pgis=1>
- Monsonogo, A., Imitola, J., Zota, V., Oida, T., & Weiner, H. L. (2003). Microglia-mediated nitric oxide cytotoxicity of T cells following amyloid beta-peptide presentation to Th1 cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 171(5), 2216–24. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12928365>

- Moon, S. Y., & Zheng, Y. (2003). Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends in Cell Biology*, 13(1), 13–22. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12480336>
- Moore, I., Schell, J., & Palme, K. (1995). Subclass-specific sequence motifs identified in Rab GTPases. *Trends in Biochemical Sciences*, 20(1), 10–2. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7878730>
- Morell, P., & Jurevics, H. (1996). Origin of cholesterol in myelin. *Neurochemical Research*, 21(4), 463–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8734440>
- Mori, C., Spooner, E. T., Wisniewsk, K. E., Wisniewski, T. M., Yamaguch, H., Saido, T. C., Lemere, C. A. (2002). Intraneuronal Abeta42 accumulation in Down syndrome brain. *Amyloid : The International Journal of Experimental and Clinical Investigation : The Official Journal of the International Society of Amyloidosis*, 9(2), 88–102. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12440481>
- Morrison, J. H., & Baxter, M. G. (2012). The ageing cortical synapse: hallmarks and implications for cognitive decline. *Nature Reviews. Neuroscience*, 13(4), 240–50. <http://doi.org/10.1038/nrn3200>
- Mostany, R., Anstey, J. E., Crump, K. L., Maco, B., Knott, G., & Portera-Cailliau, C. (2013). Altered synaptic dynamics during normal brain aging. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(9), 4094–104. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4825-12.2013>
- Moutinho, M., Nunes, M. J., Correia, J. C., Gama, M. J., Castro-Caldas, M., Cedazo-Minguez, A., Rodrigues, E. (2016). Neuronal cholesterol metabolism increases dendritic outgrowth and synaptic markers via a concerted action of GGTase-I and Trk. *Scientific Reports*, 6(1), 30928. <http://doi.org/10.1038/srep30928>
- Moutinho, M., Nunes, M. J., & Rodrigues, E. (2017). The mevalonate pathway in neurons: It's not just about cholesterol. *Experimental Cell Research*. <http://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.02.034>
- Mufson, E. J., Kroin, J. S., Sobreviela, T., Burke, M. A., Kordower, J. H., Penn, R. D., & Miller, J. A. (1994). Intrastratial infusions of brain-derived neurotrophic factor: retrograde transport and colocalization with dopamine containing substantia nigra neurons in rat. *Experimental Neurology*, 129(1), 15–26. <http://doi.org/10.1006/exnr.1994.1143>
- Mutemberezi, V., Guillemot-Legris, O., & Muccioli, G. G. (2016). Oxysterols: From cholesterol metabolites to key mediators. *Progress in Lipid Research*, 64, 152–169. <http://doi.org/10.1016/j.plipres.2016.09.002>
- Nagele, R. G., D'Andrea, M. R., Anderson, W. J., & Wang, H.-Y. (2002). Intracellular accumulation of beta-amyloid(1-42) in neurons is facilitated by the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 110(2), 199–211. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11958863>
- Nalivaeva, N. N., & Turner, A. J. (2013). The amyloid precursor protein: a biochemical enigma in brain development, function and disease. *FEBS Letters*, 587(13), 2046–54. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.05.010>

- Navone, F., Jahn, R., Di Gioia, G., Stukenbrok, H., Greengard, P., & De Camilli, P. (1986). Protein p38: an integral membrane protein specific for small vesicles of neurons and neuroendocrine cells. *The Journal of Cell Biology*, *103*(6 Pt 1), 2511–27. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2114586&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
- Neve, R. L., Finch, E. A., & Dawes, L. R. (1988). Expression of the Alzheimer amyloid precursor gene transcripts in the human brain. *Neuron*, *1*(8), 669–77. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2908447>
- Newey, S. E., Velamoor, V., Govak, E.-E., & Van Aelst, L. (2005). Rho GTPases, dendritic structure, and mental retardation. *Journal of Neurobiology*, *64*(1), 58–74. <http://doi.org/10.1002/neu.20153>
- Ng, E. L., & Tang, B. L. (2008). Rab GTPases and their roles in brain neurons and glia. *Brain Research Reviews*, *58*(1), 236–46. <http://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2008.04.006>
- Niederwolfgruber, E., Schmitt, T. L., Blasko, I., Trieb, K., Steger, M. M., Maczek, C., Grubeck-Loebenstien, B. (1998). The production of the Alzheimer amyloid precursor protein (APP) in extraneuronal tissue does not increase in old age. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, *53*(3), B186-90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9597042>
- Nikonova, E., Tsyganov, M. A., Kolch, W., Fey, D., & Kholodenko, B. N. (2013). Control of the G-protein cascade dynamics by GDP dissociation inhibitors. *Molecular BioSystems*, *9*(10), 2454–62. <http://doi.org/10.1039/c3mb70152b>
- Noguchi, A., Matsumura, S., Dezawa, M., Tada, M., Yanazawa, M., Ito, A., ... Hoshi, M. (2009). Isolation and characterization of patient-derived, toxic, high mass amyloid beta-protein (A $\beta$ ) assembly from Alzheimer disease brains. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*(47), 32895–905. <http://doi.org/10.1074/jbc.M109.000208>
- Nykjaer, A., Lee, R., Teng, K. K., Jansen, P., Madsen, P., Nielsen, M. S., Petersen, C. M. (2004). Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature*, *427*(6977), 843–8. <http://doi.org/10.1038/nature02319>
- Nykjaer, A., & Willnow, T. E. (2012). Sortilin: a receptor to regulate neuronal viability and function. *Trends in Neurosciences*, *35*(4), 261–70. <http://doi.org/10.1016/j.tins.2012.01.003>
- Oddo, S., Caccamo, A., Smith, I. F., Green, K. N., & LaFerla, F. M. (2006). A dynamic relationship between intracellular and extracellular pools of A $\beta$ . *The American Journal of Pathology*, *168*(1), 184–94. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1592652&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
- Oh, D., Han, S., Seo, J., Lee, J.-R., Choi, J., Groffen, J., Kim, E. (2010). Regulation of synaptic Rac1 activity, long-term potentiation maintenance, and learning and memory by BCR and ABR Rac GTPase-activating proteins. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *30*(42), 14134–44. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1711-10.2010>

- Olofsson, B. (1999). Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cellular Signalling*, 11(8), 545–54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10433515>
- Olson, M. F., Pasteris, N. G., Gorski, J. L., & Hall, A. (1996). Faciogenital dysplasia protein (FGD1) and Vav, two related proteins required for normal embryonic development, are upstream regulators of Rho GTPases. *Current Biology : CB*, 6(12), 1628–33. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8994827>
- Orsucci, D., Mancuso, M., Ienco, E. C., Simoncini, C., Siciliano, G., & Bonuccelli, U. (2013). Vascular factors and mitochondrial dysfunction: a central role in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Current Neurovascular Research*, 10(1), 76–80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23151073>
- Ostrowski, S. M., Wilkinson, B. L., Golde, T. E., & Landreth, G. (2007). Statins reduce amyloid-beta production through inhibition of protein isoprenylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(37), 26832–44. <http://doi.org/10.1074/jbc.M702640200>
- Page, T. L., Einstein, M., Duan, H., He, Y., Flores, T., Rolshud, D., Hof, P. R. (2002). Morphological alterations in neurons forming corticocortical projections in the neocortex of aged Patas monkeys. *Neuroscience Letters*, 317(1), 37–41. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11750991>
- Pallottini, V., Marino, M., Cavallini, G., Bergamini, E., & Trentalance, A. (2003). Age-related changes of isoprenoid biosynthesis in rat liver and brain. *Biogerontology*, 4(6), 371–378. <http://doi.org/10.1023/B:BGEN.0000006557.92558.60>
- Papassotiropoulos, A., Streffer, J. R., Tzolaki, M., Schmid, S., Thal, D., Nicosia, F., ... Hock, C. (2003). Increased brain beta-amyloid load, phosphorylated tau, and risk of Alzheimer disease associated with an intronic CYP46 polymorphism. *Archives of Neurology*, 60(1), 29–35. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12533085>
- Papassotiropoulos, A., Wollmer, M. A., Tzolaki, M., Brunner, F., Molyva, D., Lütjohann, D., ... Hock, C. (2005). A cluster of cholesterol-related genes confers susceptibility for Alzheimer's disease. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 66(7), 940–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16013913>
- Pardossi-Piquard, R., Yang, S.-P., Kanemoto, S., Gu, Y., Chen, F., Böhm, C., Fraser, P. E. (2009). APH1 polar transmembrane residues regulate the assembly and activity of presenilin complexes. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(24), 16298–307. <http://doi.org/10.1074/jbc.M109.000067>
- Parentini, I., Cavallini, G., Donati, A., Gori, Z., & Bergamini, E. (2005). Accumulation of dolichol in older tissues satisfies the proposed criteria to be qualified a biomarker of aging. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, 60(1), 39–43. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15741281>
- Park, H., & Poo, M. (2013). Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nature Reviews. Neuroscience*, 14(1), 7–23. <http://doi.org/10.1038/nrn3379>



- Parton, R. G., & Richards, A. A. (2003). Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 4(11), 724–38. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14617356>
- Pedrini, S., Carter, T. L., Prendergast, G., Petanceska, S., Ehrlich, M. E., & Gandy, S. (2005). Modulation of statin-activated shedding of Alzheimer APP ectodomain by ROCK. *PLoS Medicine*, 2(1), e18. <http://doi.org/10.1371/journal.pmed.0020018>
- Pelleieux, S., Picard, C., Lamarre-Théroux, L., Dea, D., Leduc, V., Tsantrizos, Y. S., & Poirier, J. (2018). Isoprenoids and tau pathology in sporadic Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 65, 132–139. <http://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2018.01.012>
- Peñaranda Fajardo, N. M., Meijer, C., & Kruyt, F. A. E. (2016). The endoplasmic reticulum stress/unfolded protein response in gliomagenesis, tumor progression and as a therapeutic target in glioblastoma. *Biochemical Pharmacology*, 118, 1–8. <http://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.04.008>
- Pereira-Leal, J. B., & Seabra, M. C. (2000). The mammalian Rab family of small GTPases: definition of family and subfamily sequence motifs suggests a mechanism for functional specificity in the Ras superfamily. *Journal of Molecular Biology*, 301(4), 1077–87. <http://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4010>
- Pereira-Leal, J. B., & Seabra, M. C. (2001). Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *Journal of Molecular Biology*, 313(4), 889–901. <http://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5072>
- Perez-Rando, M., Castillo-Gomez, E., Bueno-Fernandez, C., & Nacher, J. (2018). The TrkB agonist 7,8-dihydroxyflavone changes the structural dynamics of neocortical pyramidal neurons and improves object recognition in mice. *Brain Structure and Function*. <http://doi.org/10.1007/s00429-018-1637-x>
- Pérez-Sala, D., Gilbert, B. A., Tan, E. W., & Rando, R. R. (1992). Prenylated protein methyltransferases do not distinguish between farnesylated and geranylgeranylated substrates. *The Biochemical Journal*, 284 ( Pt 3), 835–40. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1132615&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
- Peters, A., Sethares, C., & Luebke, J. I. (2008). Synapses are lost during aging in the primate prefrontal cortex. *Neuroscience*, 152(4), 970–81. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.07.014>
- Peters, I., Igbavboa, U., Schütt, T., Haidari, S., Hartig, U., Rosello, X., ... Eckert, G. P. (2009). The interaction of beta-amyloid protein with cellular membranes stimulates its own production. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788(5), 964–72. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.01.012>
- Petkova, A. T., Leapman, R. D., Guo, Z., Yau, W.-M., Mattson, M. P., & Tycko, R. (2005). Self-propagating, molecular-level polymorphism in Alzheimer's beta-amyloid fibrils. *Science (New York, N.Y.)*, 307(5707), 262–5. <http://doi.org/10.1126/science.1105850>

- Petratos, S., Li, Q.-X., George, A. J., Hou, X., Kerr, M. L., Unabia, S. E., Small, D. H. (2008). The beta-amyloid protein of Alzheimer's disease increases neuronal CRMP-2 phosphorylation by a Rho-GTP mechanism. *Brain : A Journal of Neurology*, 131(Pt 1), 90–108. <http://doi.org/10.1093/brain/awm260>
- Pfeffer, S., & Aivazian, D. (2004). Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 5(11), 886–96. <http://doi.org/10.1038/nrm1500>
- Pfeffer, S. R. (2013). Rab GTPase regulation of membrane identity. *Current Opinion in Cell Biology*, 25(4), 414–9. <http://doi.org/10.1016/j.ceb.2013.04.002>
- Pfrieger, F. W. (2003). Cholesterol homeostasis and function in neurons of the central nervous system. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 60(6), 1158–71. <http://doi.org/10.1007/s00018-003-3018-7>
- Pfrieger, F. W., & Ungerer, N. (2011). Cholesterol metabolism in neurons and astrocytes. *Progress in Lipid Research*, 50(4), 357–71. <http://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.06.002>
- Pike, C. J., Walencewicz, A. J., Glabe, C. G., & Cotman, C. W. (1991). In vitro aging of beta-amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity. *Brain Research*, 563(1–2), 311–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1786545>
- Pilpel, Y., & Segal, M. (2004). Activation of PKC induces rapid morphological plasticity in dendrites of hippocampal neurons via Rac and Rho-dependent mechanisms. *The European Journal of Neuroscience*, 19(12), 3151–64. <http://doi.org/10.1111/j.0953-816X.2004.03380.x>
- Popp, J., Lewczuk, P., Kölsch, H., Meichsner, S., Maier, W., Kornhuber, J., Lütjohann, D. (2012). Cholesterol metabolism is associated with soluble amyloid precursor protein production in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 123(2), 310–6. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07893.x>
- Popp, J., Meichsner, S., Kölsch, H., Lewczuk, P., Maier, W., Kornhuber, J., Lütjohann, D. (2013). Cerebral and extracerebral cholesterol metabolism and CSF markers of Alzheimer's disease. *Biochemical Pharmacology*, 86(1), 37–42. <http://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.12.007>
- Posse de Chaves, E. (2012). Reciprocal regulation of cholesterol and beta amyloid at the subcellular level in Alzheimer's disease. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 90(6), 753–64. <http://doi.org/10.1139/y2012-076>
- Price, D. L., Sisodia, S. S., & Gandy, S. E. (1995). Amyloid beta amyloidosis in Alzheimer's disease. *Current Opinion in Neurology*, 8(4), 268–74. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7582041>
- Prinzen, C., Müller, U., Endres, K., Fahrenholz, F., & Postina, R. (2005). Genomic structure and functional characterization of the human ADAM10 promoter. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19(11), 1522–4. <http://doi.org/10.1096/fj.04-3619fje>

- Qian, Y., Vogt, A., Vasudevan, A., Sebti, S. M., & Hamilton, A. D. (1998). Selective inhibition of type-I geranylgeranyltransferase in vitro and in whole cells by CAAL peptidomimetics. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 6(3), 293–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9568283>
- Qiang, W., Yau, W.-M., Luo, Y., Mattson, M. P., & Tycko, R. (2012). Antiparallel  $\beta$ -sheet architecture in Iowa-mutant  $\beta$ -amyloid fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(12), 4443–8. <http://doi.org/10.1073/pnas.1111305109>
- Qiu, R. G., Abo, A., McCormick, F., & Symons, M. (1997). Cdc42 regulates anchorage-independent growth and is necessary for Ras transformation. *Molecular and Cellular Biology*, 17(6), 3449–58. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=232198&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Qiu, R. G., Chen, J., Kim, D., McCormick, F., & Symons, M. (1995). An essential role for Rac in Ras transformation. *Nature*, 374(6521), 457–9. <http://doi.org/10.1038/374457a0>
- Qiu, R. G., Chen, J., McCormick, F., & Symons, M. (1995). A role for Rho in Ras transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(25), 11781–5. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=40486&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Rajesh, D., Stenzel, R. A., & Howard, S. P. (2003). Perillyl alcohol as a radio-/chemosensitizer in malignant glioma. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(38), 35968–78. <http://doi.org/10.1074/jbc.M303280200>
- Rao, S., Lowe, M., Herliczek, T. W., & Keyomarsi, K. (1998). Lovastatin mediated G1 arrest in normal and tumor breast cells is through inhibition of CDK2 activity and redistribution of p21 and p27, independent of p53. *Oncogene*, 17(18), 2393–402. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1202322>
- Rao, S., Porter, D. C., Chen, X., Herliczek, T., Lowe, M., & Keyomarsi, K. (1999). Lovastatin-mediated G1 arrest is through inhibition of the proteasome, independent of hydroxymethyl glutaryl-CoA reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(14), 7797–802. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=22141&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Rasteiro, R., & Pereira-Leal, J. B. (2007). Multiple domain insertions and losses in the evolution of the Rab prenylation complex. *BMC Evolutionary Biology*, 7, 140. <http://doi.org/10.1186/1471-2148-7-140>
- Reed, B., Villeneuve, S., Mack, W., DeCarli, C., Chui, H. C., & Jagust, W. (2014). Associations Between Serum Cholesterol Levels and Cerebral Amyloidosis. *JAMA Neurology*, 71(2), 195. <http://doi.org/10.1001/jamaneurol.2013.5390>
- Refolo, L. M., Malester, B., LaFrancois, J., Bryant-Thomas, T., Wang, R., Tint, G. S., Pappolla, M. A. (2000). Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiology of Disease*, 7(4), 321–31. <http://doi.org/10.1006/nbdi.2000.0304>

- Reid, P. C., Urano, Y., Kodama, T., & Hamakubo, T. (2007). Alzheimer's disease: cholesterol, membrane rafts, isoprenoids and statins. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *11*(3), 383–92. <http://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2007.00054.x>
- Reiss, A. B., & Voloshyna, I. (2012). Regulation of cerebral cholesterol metabolism in Alzheimer disease. *Journal of Investigative Medicine : The Official Publication of the American Federation for Clinical Research*, *60*(3), 576–82. <http://doi.org/10.231/JIM.0b013e318246d973>
- Ren, Z., Elson, C. E., & Gould, M. N. (1997). Inhibition of type I and type II geranylgeranyl-protein transferases by the monoterpene perillyl alcohol in NIH3T3 cells. *Biochemical Pharmacology*, *54*(1), 113–20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9296357>
- Repasky, G. A., Chenette, E. J., & Der, C. J. (2004). Renewing the conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis? *Trends in Cell Biology*, *14*(11), 639–47. <http://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.09.014>
- Ricciarelli, R., Canepa, E., Marengo, B., Marinari, U. M., Poli, G., Pronzato, M. A., & Domenicotti, C. (2012). Cholesterol and Alzheimer's disease: a still poorly understood correlation. *IUBMB Life*, *64*(12), 931–5. <http://doi.org/10.1002/iub.1091>
- Ridge, P. G., Karch, C. M., Hsu, S., Arano, I., Teerlink, C. C., Ebbert, M. T. W., Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. (2017). Linkage, whole genome sequence, and biological data implicate variants in RAB10 in Alzheimer's disease resilience. *Genome Medicine*, *9*(1), 100. <http://doi.org/10.1186/s13073-017-0486-1>
- Rilling, H. C., Bruenger, E., Leining, L. M., Buss, J. E., & Epstein, W. W. (1993). Differential prenylation of proteins as a function of mevalonate concentration in CHO cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *301*(2), 210–5. <http://doi.org/10.1006/abbi.1993.1135>
- Rittinger, K., Taylor, W. R., Smerdon, S. J., & Gamblin, S. J. (1998). Support for shared ancestry of GAPs. *Nature*, *392*(6675), 448–9. <http://doi.org/10.1038/33043>
- Rocchi, A., Pellegrini, S., Siciliano, G., & Murri, L. (2003). Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease: a review. *Brain Research Bulletin*, *61*(1), 1–24. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12788204>
- Rodriguez-Concepcion, M., & Boronat, A. (2002). Elucidation of the Methylerythritol Phosphate Pathway for Isoprenoid Biosynthesis in Bacteria and Plastids. A Metabolic Milestone Achieved through Genomics. *PLANT PHYSIOLOGY*, *130*(3), 1079–1089. <http://doi.org/10.1104/pp.007138>
- Roghani, M., Becherer, J. D., Moss, M. L., Atherton, R. E., Erdjument-Bromage, H., Arribas, J., Blobel, C. P. (1999). Metalloprotease-disintegrin MDC9: intracellular maturation and catalytic activity. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*(6), 3531–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9920899>

- Rohan de Silva, H. A., Jen, A., Wickenden, C., Jen, L. S., Wilkinson, S. L., & Patel, A. J. (1997). Cell-specific expression of beta-amyloid precursor protein isoform mRNAs and proteins in neurons and astrocytes. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 47(1–2), 147–56. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9221912>
- Roher, A. E., Chaney, M. O., Kuo, Y. M., Webster, S. D., Stine, W. B., Haverkamp, L. J., Emmerling, M. R. (1996). Morphology and toxicity of Abeta-(1-42) dimer derived from neuritic and vascular amyloid deposits of Alzheimer's disease. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(34), 20631–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8702810>
- Rohn, T. T. (2013). Proteolytic cleavage of apolipoprotein E4 as the keystone for the heightened risk associated with Alzheimer's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(7), 14908–22. <http://doi.org/10.3390/ijms140714908>
- Rosenthal, A., Goeddel, D. V., Nguyen, T., Martin, E., Burton, L. E., Shih, A., ... Nikolics, K. (1991). Primary structure and biological activity of human brain-derived neurotrophic factor. *Endocrinology*, 129(3), 1289–94. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1874171>
- Rossetti, H. C., Munro Cullum, C., Hynan, L. S., & Lacritz, L. H. (2010). The CERAD Neuropsychologic Battery Total Score and the progression of Alzheimer disease. *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, 24(2), 138–42. <http://doi.org/10.1097/WAD.0b013e3181b76415>
- Rossmann, K. L., Der, C. J., & Sondek, J. (2005). GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 6(2), 167–80. <http://doi.org/10.1038/nrm1587>
- Rowinsky, E. K., & Patnaik, A. (2000). The development of protein farnesyltransferase and other ras -directed therapeutics for malignant diseases.
- Rowinsky, E. K., Windle, J. J., & Von Hoff, D. D. (1999). Ras protein farnesyltransferase: A strategic target for anticancer therapeutic development. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 17(11), 3631–52. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10550163>
- Rudney, H., & Sexton, R. C. (1986). Regulation of cholesterol biosynthesis. *Annual Review of Nutrition*, 6, 245–72. <http://doi.org/10.1146/annurev.nu.06.070186.001333>
- Russell, D. W. (1992). Cholesterol biosynthesis and metabolism. *Cardiovascular Drugs and Therapy / Sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy*, 6(2), 103–10. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1390320>
- Sabo, S. L., Ikin, A. F., Buxbaum, J. D., & Greengard, P. (2001). The Alzheimer amyloid precursor protein (APP) and FE65, an APP-binding protein, regulate cell movement. *The Journal of Cell Biology*, 153(7), 1403–14. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2150733&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>

- Saeedi Saravi, S. S., Saeedi Saravi, S. S., Arefidoust, A., & Dehpour, A. R. (2017). The beneficial effects of HMG-CoA reductase inhibitors in the processes of neurodegeneration. *Metabolic Brain Disease*. <http://doi.org/10.1007/s11011-017-0021-5>
- Saetre, P., Jazin, E., & Emilsson, L. (2011). Age-related changes in gene expression are accelerated in Alzheimer's disease. *Synapse (New York, N.Y.)*, 65(9), 971–4. <http://doi.org/10.1002/syn.20933>
- Saito, S., Kobayashi, S., Ohashi, Y., Igarashi, M., Komiya, Y., & Ando, S. (1994). Decreased synaptic density in aged brains and its prevention by rearing under enriched environment as revealed by synaptophysin contents. *Journal of Neuroscience Research*, 39(1), 57–62. <http://doi.org/10.1002/jnr.490390108>
- Salahuddin, P., Fatima, M. T., Abdelhameed, A. S., Nusrat, S., & Khan, R. H. (2016). Structure of amyloid oligomers and their mechanisms of toxicities: Targeting amyloid oligomers using novel therapeutic approaches. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 114, 41–58. <http://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.02.065>
- Samuel, F., & Hynds, D. L. (2010). RHO GTPase signaling for axon extension: is prenylation important? *Molecular Neurobiology*, 42(2), 133–42. <http://doi.org/10.1007/s12035-010-8144-2>
- Samuel, F., Reddy, J., Kaimal, R., Segovia, V., Mo, H., & Hynds, D. L. (2014). Inhibiting geranylgeranylation increases neurite branching and differentially activates cofilin in cell bodies and growth cones. *Molecular Neurobiology*, 50(1), 49–59. <http://doi.org/10.1007/s12035-014-8653-5>
- Sanabria-Castro, A., Alvarado-Echeverria, I., & Monge-Bonilla, C. (2017). Molecular Pathogenesis of Alzheimer's Disease: An Update. *Annals of Neurosciences*, 24(1), 46–54. <http://doi.org/10.1159/000464422>
- Sasaki, N., Toki, S., Chowei, H., Saito, T., Nakano, N., Hayashi, Y., Makita, Z. (2001). Immunohistochemical distribution of the receptor for advanced glycation end products in neurons and astrocytes in Alzheimer's disease. *Brain Research*, 888(2), 256–262. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11150482>
- Sato, N., Shinohara, M., Rakugi, H., & Morishita, R. (2012). Dual effects of statins on A $\beta$  metabolism: upregulation of the degradation of APP-CTF and A $\beta$  clearance. *Neuro-Degenerative Diseases*, 10(1–4), 305–8. <http://doi.org/10.1159/000334534>
- Sato, T., Diehl, T. S., Narayanan, S., Funamoto, S., Ihara, Y., De Strooper, B., ... Wolfe, M. S. (2007). Active gamma-secretase complexes contain only one of each component. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(47), 33985–93. <http://doi.org/10.1074/jbc.M705248200>
- Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D., George-Hyslop, P. H., Pericak-Vance, M. A., Joo, S. H., Alberts, M. J. (1993). Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology*, 43(8), 1467–72. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8350998>
- Scaringi, C., Enrici, R. M., & Minniti, G. (2013). Combining molecular targeted agents with radiation therapy for malignant gliomas. *OncoTargets and Therapy*, 6, 1079–95. <http://doi.org/10.2147/OTT.S48224>

- Schapira, A. H. (1996). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegeneration. *Current Opinion in Neurology*, 9(4), 260–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8858182>
- Scheffzek, K., Stephan, I., Jensen, O. N., Illenberger, D., & Gierschik, P. (2000). The Rac-RhoGDI complex and the structural basis for the regulation of Rho proteins by RhoGDI. *Nature Structural Biology*, 7(2), 122–6. <http://doi.org/10.1038/72392>
- Scherle, P., Behrens, T., & Staudt, L. M. (1993). Ly-GDI, a GDP-dissociation inhibitor of the RhoA GTP-binding protein, is expressed preferentially in lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(16), 7568–72. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=47183&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Schliebs, R., & Arendt, T. (2011). The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behavioural Brain Research*, 221(2), 555–63. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.11.058>
- Schmechel, D. E., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Crain, B. J., Hulette, C. M., Joo, S. H., Roses, A. D. (1993). Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(20), 9649–53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8415756>
- Schmidt, A., & Hall, A. (2002). Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes & Development*, 16(13), 1587–609. <http://doi.org/10.1101/gad.1003302>
- Schmidt, F., Groscurth, P., Kermer, M., Dichgans, J., & Weller, M. (2001). Lovastatin and phenylacetate induce apoptosis, but not differentiation, in human malignant glioma cells. *Acta Neuropathologica*, 101(3), 217–24. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11307620>
- Schubert, V., & Dotti, C. G. (2007). Transmitting on actin: synaptic control of dendritic architecture. *Journal of Cell Science*, 120(Pt 2), 205–12. <http://doi.org/10.1242/jcs.03337>
- Schulz, S., Bühling, F., & Ansorge, S. (1994). Prenylated proteins and lymphocyte proliferation: inhibition by d-limonene related monoterpenes. *European Journal of Immunology*, 24(2), 301–7. <http://doi.org/10.1002/eji.1830240204>
- Schuman, E. M. (1999). Neurotrophin regulation of synaptic transmission. *Current Opinion in Neurobiology*, 9(1), 105–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10072368>
- Schwartzbaum, J. A., Fisher, J. L., Aldape, K. D., & Wrensch, M. (2006). Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nature Clinical Practice. Neurology*, 2(9), 494–503; quiz 1 p following 516. <http://doi.org/10.1038/ncpneuro0289>
- Scita, G., Tenca, P., Frittoli, E., Tocchetti, A., Innocenti, M., Giardina, G., & Di Fiore, P. P. (2000). Signaling from Ras to Rac and beyond: not just a matter of GEFs. *The EMBO Journal*, 19(11), 2393–8. <http://doi.org/10.1093/emboj/19.11.2393>

- Seabra, M. C., Brown, M. S., Slaughter, C. A., Südhof, T. C., & Goldstein, J. L. (1992). Purification of component A of Rab geranylgeranyl transferase: possible identity with the choroideremia gene product. *Cell*, *70*(6), 1049–57. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1525821>
- Seabra, M. C., Goldstein, J. L., Südhof, T. C., & Brown, M. S. (1992). Rab geranylgeranyl transferase. A multisubunit enzyme that prenylates GTP-binding proteins terminating in Cys-X-Cys or Cys-Cys. *The Journal of Biological Chemistry*, *267*(20), 14497–503. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1321151>
- Sebolla, A., Mustata, G.-M., Luo, K., Velasco, P. T., Viola, K. L., Cline, E. N., Klein, W. L. (2014). Elucidating molecular mass and shape of a neurotoxic A $\beta$  oligomer. *ACS Chemical Neuroscience*, *5*(12), 1238–45. <http://doi.org/10.1021/cn500156r>
- Sebti, S. M., Tkalcevic, G. T., & Jani, J. P. (1991). Lovastatin, a cholesterol biosynthesis inhibitor, inhibits the growth of human H-ras oncogene transformed cells in nude mice. *Cancer Communications*, *3*(5), 141–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2043425>
- Segatto, M., Manduca, A., Lecis, C., Rosso, P., Jozwiak, A., Swiezewska, E., Pallottini, V. (2014). Simvastatin treatment highlights a new role for the isoprenoid/cholesterol biosynthetic pathway in the modulation of emotional reactivity and cognitive performance in rats. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *39*(4), 841–54. <http://doi.org/10.1038/npp.2013.284>
- Seilheimer, B., Bohrmann, B., Bondolfi, L., Müller, F., Stüber, D., & Döbeli, H. (1997). The toxicity of the Alzheimer's beta-amyloid peptide correlates with a distinct fiber morphology. *Journal of Structural Biology*, *119*(1), 59–71. <http://doi.org/10.1006/jsbi.1997.3859>
- Sekino, Y., Kojima, N., & Shirao, T. (2007). Role of actin cytoskeleton in dendritic spine morphogenesis. *Neurochemistry International*, *51*(2–4), 92–104. <http://doi.org/10.1016/j.neuint.2007.04.029>
- Selkoe, D. J. (1991). The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron*, *6*(4), 487–98. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1673054>
- Selkoe, D. J. (2008). Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behavioural Brain Research*, *192*(1), 106–13. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.02.016>
- Selznick, L. A., Shamji, M. F., Fecci, P., Gromeier, M., Friedman, A. H., & Sampson, J. (2008). Molecular strategies for the treatment of malignant glioma—genes, viruses, and vaccines. *Neurosurgical Review*, *31*(2), 141–55; discussion 155. <http://doi.org/10.1007/s10143-008-0121-0>
- Serpell, L. C. (2000). Alzheimer's amyloid fibrils: structure and assembly. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1502*(1), 16–30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10899428>
- Shah, S., Lee, S.-F., Tabuchi, K., Hao, Y.-H., Yu, C., LaPlant, Q., ... Yu, G. (2005). Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor. *Cell*, *122*(3), 435–47. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.022>



- Shahani, N., Pryor, W., Swarnkar, S., Kholodilov, N., Thinakaran, G., Burke, R. E., & Subramaniam, S. (2014). Rheb GTPase regulates  $\beta$ -secretase levels and amyloid  $\beta$  generation. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(9), 5799–808. <http://doi.org/10.1074/jbc.M113.532713>
- Shankar, G. M., Li, S., Mehta, T. H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N. E., Smith, I., ... Selkoe, D. J. (2008). Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nature Medicine*, 14(8), 837–42. <http://doi.org/10.1038/nm1782>
- Sheehan, D., Ray, G. S., Calhoun, B. C., & Goldenring, J. R. (1996). A somatodendritic distribution of Rab11 in rabbit brain neurons. *Neuroreport*, 7(7), 1297–300. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8817553>
- Shellman, Y. G., Ribble, D., Miller, L., Gendall, J., Vanbuskirk, K., Kelly, D., Dellavalle, R. P. (2005). Lovastatin-induced apoptosis in human melanoma cell lines. *Melanoma Research*, 15(2), 83–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15846140>
- Shepherd, J., Blauw, G. J., Murphy, M. B., Bollen, E. L. E. M., Buckley, B. M., Cobbe, S. M., Westendorp, R. G. J. (2002). Pravastatin in elderly individuals at risk of vascular disease (PROSPER): a randomised controlled trial. *Lancet*, 360(9346), 1623–30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12457784>
- Sherriff, F. E., Bridges, L. R., Gentleman, S. M., Sivaloganathan, S., & Wilson, S. (1994). Markers of axonal injury in post mortem human brain. *Acta Neuropathologica*, 88(5), 433–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7847072>
- Shibata, M., Yamada, S., Kumar, S. R., Calero, M., Bading, J., Frangione, B., Zlokovic, B. V. (2000). Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *The Journal of Clinical Investigation*, 106(12), 1489–99. <http://doi.org/10.1172/JC110498>
- Shinohara, M., Terada, Y., Iwamatsu, A., Shinohara, A., Mochizuki, N., Higuchi, M., ... Jessberger, R. (2002). SWAP-70 is a guanine-nucleotide-exchange factor that mediates signalling of membrane ruffling. *Nature*, 416(6882), 759–63. <http://doi.org/10.1038/416759a>
- Shirazi Fard, S., Kele, J., Vilar, M., Paratcha, G., & Ledda, F. (2010). Tiam1 as a signaling mediator of nerve growth factor-dependent neurite outgrowth. *PloS One*, 5(3), e9647. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0009647>
- Simons, K., & Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387(6633), 569–72. <http://doi.org/10.1038/42408>
- Simons, K., & Ikonen, E. (2000). How cells handle cholesterol. *Science (New York, N.Y.)*, 290(5497), 1721–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11099405>
- Simons, K., & Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 1(1), 31–9. <http://doi.org/10.1038/35036052>

- Simons, M., Keller, P., De Strooper, B., Beyreuther, K., Dotti, C. G., & Simons, K. (1998). Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(11), 6460–4. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=27798&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Simons, M., Keller, P., Dichgans, J., & Schulz, J. B. (2001). Cholesterol and Alzheimer's disease: is there a link? *Neurology*, *57*(6), 1089–93. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11571339>
- Sinha, S., Anderson, J. P., Barbour, R., Basi, G. S., Caccavello, R., Davis, D., John, V. (1999). Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature*, *402*(6761), 537–40. <http://doi.org/10.1038/990114>
- Skaper, S. D. (2012). The neurotrophin family of neurotrophic factors: an overview. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *846*, 1–12. [http://doi.org/10.1007/978-1-61779-536-7\\_1](http://doi.org/10.1007/978-1-61779-536-7_1)
- Skoog, I., & Gustafson, D. (2002). Hypertension and related factors in the etiology of Alzheimer's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *977*, 29–36. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12480731>
- Skoog, I., Lernfelt, B., Landahl, S., Palmertz, B., Andreasson, L. A., Nilsson, L., Svanborg, A. (1996). 15-year longitudinal study of blood pressure and dementia. *Lancet*, *347*(9009), 1141–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8609748>
- Snipes, G. J., Chan, S. Y., McGuire, C. B., Costello, B. R., Norden, J. J., Freeman, J. A., & Routtenberg, A. (1987). Evidence for the coidentification of GAP-43, a growth-associated protein, and F1, a plasticity-associated protein. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *7*(12), 4066–75. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3694262>
- Snyder, E. M., Nong, Y., Almeida, C. G., Paul, S., Moran, T., Choi, E. Y., Greengard, P. (2005). Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nature Neuroscience*, *8*(8), 1051–8. <http://doi.org/10.1038/nn1503>
- Söderberg, M., Edlund, C., Kristensson, K., & Dallner, G. (1990a). Lipid compositions of different regions of the human brain during aging. *Journal of Neurochemistry*, *54*(2), 415–23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2299344>
- Söderberg, M., Edlund, C., Kristensson, K., & Dallner, G. (1990b). Lipid compositions of different regions of the human brain during aging. *Journal of Neurochemistry*, *54*(2), 415–23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2299344>
- Solomon, A., Kivipelto, M., Wolozin, B., Zhou, J., & Whitmer, R. A. (2009). Midlife serum cholesterol and increased risk of Alzheimer's and vascular dementia three decades later. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, *28*(1), 75–80. <http://doi.org/10.1159/000231980>
- Soma, M. R., Corsini, A., & Paoletti, R. (1992). Cholesterol and mevalonic acid modulation in cell metabolism and multiplication. *Toxicology Letters*, *64–65 Spec*, 1–15. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1471162>

- Soneira, C. F., & Scott, T. M. (1996). Severe cardiovascular disease and Alzheimer's disease: senile plaque formation in cortical areas. *Clinical Anatomy (New York, N.Y.)*, 9(2), 118–27. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2353\(1996\)9:2<118::AID-CA4>3.0.CO;2-D](http://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2353(1996)9:2<118::AID-CA4>3.0.CO;2-D)
- Songyang, Z., Fanning, A. S., Fu, C., Xu, J., Marfatia, S. M., Chishti, A. H., ... Cantley, L. C. (1997). Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science (New York, N.Y.)*, 275(5296), 73–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8974395>
- Soreghan, B., Kosmoski, J., & Glabe, C. (1994). Surfactant properties of Alzheimer's A beta peptides and the mechanism of amyloid aggregation. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(46), 28551–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7961799>
- Sparks, D. L. (1999). Intraneuronal beta-amyloid immunoreactivity in the CNS. *Neurobiology of Aging*, 17(2), 291–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8744411>
- Sparks, D. L., Hunsaker, J. C., Scheff, S. W., Kryscio, R. J., Henson, J. L., & Markesbery, W. R. (1990). Cortical senile plaques in coronary artery disease, aging and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 11(6), 601–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1704106>
- Sparks, D. L., Kuo, Y. M., Roher, A., Martin, T., & Lukas, R. J. (2000). Alterations of Alzheimer's disease in the cholesterol-fed rabbit, including vascular inflammation. Preliminary observations. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 903, 335–44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10818523>
- Sparks, D. L., Sabbagh, M. N., Connor, D. J., Lopez, J., Launer, L. J., Browne, P., Ziolkowski, C. (2005). Atorvastatin for the treatment of mild to moderate Alzheimer disease: preliminary results. *Archives of Neurology*, 62(5), 753–7. <http://doi.org/10.1001/archneur.62.5.753>
- Sparks, D. L., Scheff, S. W., Hunsaker, J. C., Liu, H., Landers, T., & Gross, D. R. (1994). Induction of Alzheimer-like beta-amyloid immunoreactivity in the brains of rabbits with dietary cholesterol. *Experimental Neurology*, 126(1), 88–94. <http://doi.org/10.1006/exnr.1994.1044>
- Spasic, D., & Annaert, W. (2008). Building gamma-secretase: the bits and pieces. *Journal of Cell Science*, 121(Pt 4), 413–20. <http://doi.org/10.1242/jcs.015255>
- Spielberg, J. M., Sadeh, N., Leritz, E. C., McGlinchey, R. E., Milberg, W. P., Hayes, J. P., & Salat, D. H. (2017). Higher serum cholesterol is associated with intensified age-related neural network decoupling and cognitive decline in early- to mid-life. *Human Brain Mapping*, 38(6), 3249–3261. <http://doi.org/10.1002/hbm.23587>
- Spillane, M., & Gallo, G. (2014). Involvement of Rho-family GTPases in axon branching. *Small GTPases*, 5, e27974. <http://doi.org/10.4161/sgtp.27974>
- Stachel, S. J., Coburn, C. A., Steele, T. G., Jones, K. G., Loutzenhiser, E. F., Gregro, A. R., Vacca, J. P. (2004). Structure-based design of potent and selective cell-permeable inhibitors of human beta-secretase (BACE-1). *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(26), 6447–50. <http://doi.org/10.1021/jm049379g>

- Stalder, D., & Antony, B. (2013). Arf GTPase regulation through cascade mechanisms and positive feedback loops. *FEBS Letters*, 587(13), 2028–35. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.05.015>
- Statistisches Bundesamt (Destatis). (2017). Statistisches Bundesamt Deutschland - GENESIS-Online Datenbank. Retrieved from <https://www-genesis.destatis.de/genesis/online>
- Stenmark, H., & Olkkonen, V. M. (2001). The Rab GTPase family. *Genome Biology*, 2(5), REVIEWS3007. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=138937&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Stern, Y. (2012). Cognitive reserve in ageing and Alzheimer's disease. *Lancet Neurology*, 11(11), 1006–12. [http://doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70191-6](http://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70191-6)
- Stettler, O., Moya, K. L., Zahraoui, A., & Tavitian, B. (1994). Developmental changes in the localization of the synaptic vesicle protein rab3A in rat brain. *Neuroscience*, 62(2), 587–600. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7830899>
- Storck, S. E., Meister, S., Nahrath, J., Meißner, J. N., Schubert, N., Di Spiezio, A., Pietrzik, C. U. (2016). Endothelial LRP1 transports amyloid- $\beta$ (1-42) across the blood-brain barrier. *The Journal of Clinical Investigation*, 126(1), 123–36. <http://doi.org/10.1172/JCI81108>
- Straub, R. H. (2006). *Lehrbuch der klinischen Pathophysiologie komplexer chronischer Krankheiten 2: Spezielle Pathophysiologie*. Vandenhoeck & Ruprecht. Retrieved from <http://books.google.com/books?id=LdqXR9liHW4C&pgis=1>
- Strittmatter, W. J., Saunders, A. M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G. S., & Roses, A. D. (1993). Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(5), 1977–81. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=46003&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Strohmaier, C., Carter, B. D., Urfer, R., Barde, Y. A., & Dechant, G. (1996). A splice variant of the neurotrophin receptor trkB with increased specificity for brain-derived neurotrophic factor. *The EMBO Journal*, 15(13), 3332–7. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=451896&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J. B., Mirimanoff, R. O. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England Journal of Medicine*, 352(10), 987–96. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>
- Sultana, R., Perluigi, M., & Butterfield, D. A. (2009). Oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease (AD), mild cognitive impairment and animal models of AD: role of A $\beta$  in pathogenesis. *Acta Neuropathologica*, 118(1), 131–50. <http://doi.org/10.1007/s00401-009-0517-0>

- Sun, M.-Y., Linsenbardt, A. J., Emmett, C. M., Eisenman, L. N., Izumi, Y., Zorumski, C. F., & Mennerick, S. (2016). 24(S)-Hydroxycholesterol as a Modulator of Neuronal Signaling and Survival. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 22(2), 132–44. <http://doi.org/10.1177/1073858414568122>
- Sun, M.-Y., Taylor, A., Zorumski, C. F., & Mennerick, S. (2017). 24S-hydroxycholesterol and 25-hydroxycholesterol differentially impact hippocampal neuronal survival following oxygen-glucose deprivation. *PloS One*, 12(3), e0174416. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0174416>
- Sundin, T., Peffley, D. M., Gauthier, D., & Hentosh, P. (2012). The isoprenoid perillyl alcohol inhibits telomerase activity in prostate cancer cells. *Biochimie*, 94(12), 2639–48. <http://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.07.028>
- Sundin, T., Peffley, D. M., & Hentosh, P. (2013). Disruption of an hTERT-mTOR-RAPTOR protein complex by a phytochemical perillyl alcohol and rapamycin. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 375(1–2), 97–104. <http://doi.org/10.1007/s11010-012-1532-3>
- Suo, Z., Cox, A. A., Bartelli, N., Rasul, I., Festoff, B. W., Premont, R. T., & Arendash, G. W. (2007). GRK5 deficiency leads to early Alzheimer-like pathology and working memory impairment. *Neurobiology of Aging*, 28(12), 1873–88. <http://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2006.08.013>
- Suzuki, T. (2002). Lipid rafts at postsynaptic sites: distribution, function and linkage to postsynaptic density. *Neuroscience Research*, 44(1), 1–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12204288>
- Svedružić, Ž. M., Popović, K., & Šendula-Jengiđ, V. (2013). Modulators of  $\gamma$ -secretase activity can facilitate the toxic side-effects and pathogenesis of Alzheimer's disease. *PloS One*, 8(1), e50759. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0050759>
- Svedružić, Z. M., Popović, K., Smoljan, I., & Sendula-Jengiđ, V. (2012). Modulation of  $\gamma$ -secretase activity by multiple enzyme-substrate interactions: implications in pathogenesis of Alzheimer's disease. *PloS One*, 7(3), e32293. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0032293>
- Svennerholm, L., Boström, K., Helander, C. G., & Jungbjer, B. (1991). Membrane lipids in the aging human brain. *Journal of Neurochemistry*, 56(6), 2051–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2027013>
- Svennerholm, L., Boström, K., & Jungbjer, B. (1997). Changes in weight and compositions of major membrane components of human brain during the span of adult human life of Swedes. *Acta Neuropathologica*, 94(4), 345–52. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9341935>
- Svennerholm, L., Boström, K., Jungbjer, B., & Olsson, L. (1994). Membrane lipids of adult human brain: lipid composition of frontal and temporal lobe in subjects of age 20 to 100 years. *Journal of Neurochemistry*, 63(5), 1802–11. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7931336>
- Swanson, K. M., & Hohl, R. J. (2006). Anti-cancer therapy: targeting the mevalonate pathway. *Current Cancer Drug Targets*, 6(1), 15–37. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16475974>

- Swerdlow, R. H., Burns, J. M., & Khan, S. M. (2010). The Alzheimer's Disease Mitochondrial Cascade Hypothesis. *Journal of Alzheimer's Disease*, *20*(s2), S265–S279. <http://doi.org/10.3233/JAD-2010-100339>
- Swerdlow, R. H., Burns, J. M., & Khan, S. M. (2014). The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: Progress and perspectives. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1842*(8), 1219–1231. <http://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.09.010>
- Swerdlow, R. H., & Khan, S. M. (2004). A "mitochondrial cascade hypothesis" for sporadic Alzheimer's disease. *Medical Hypotheses*, *63*(1), 8–20. <http://doi.org/10.1016/j.mehy.2003.12.045>
- Takahashi, K., Rochford, C. D. P., & Neumann, H. (2005). Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2. *The Journal of Experimental Medicine*, *201*(4), 647–57. <http://doi.org/10.1084/jem.20041611>
- Takahashi, R. H., Nagao, T., & Gouras, G. K. (2017). Plaque formation and the intraneuronal accumulation of  $\beta$ -amyloid in Alzheimer's disease. *Pathology International*, *67*(4), 185–193. <http://doi.org/10.1111/pin.12520>
- Takai, Y., Sasaki, T., & Matozaki, T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiological Reviews*, *81*(1), 153–208. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11152757>
- Takami, M., & Funamoto, S. (2012).  $\gamma$ -Secretase-Dependent Proteolysis of Transmembrane Domain of Amyloid Precursor Protein: Successive Tri- and Tetrapeptide Release in Amyloid  $\beta$ -Protein Production. *International Journal of Alzheimer's Disease*, *2012*, 591392. <http://doi.org/10.1155/2012/591392>
- Takami, M., Nagashima, Y., Sano, Y., Ishihara, S., Morishima-Kawashima, M., Funamoto, S., & Ihara, Y. (2009). gamma-Secretase: successive tripeptide and tetrapeptide release from the transmembrane domain of beta-carboxyl terminal fragment. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *29*(41), 13042–52. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2362-09.2009>
- Tanahashi, H., & Tabira, T. (2001). Three novel alternatively spliced isoforms of the human beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme (BACE) and their effect on amyloid beta-peptide production. *Neuroscience Letters*, *307*(1), 9–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11516562>
- Tanokashira, D., Mamada, N., Yamamoto, F., Taniguchi, K., Tamaoka, A., Lakshmana, M. K., & Araki, W. (2017). The neurotoxicity of amyloid  $\beta$ -protein oligomers is reversible in a primary neuron model. *Molecular Brain*, *10*(1), 4. <http://doi.org/10.1186/s13041-016-0284-5>
- Tapia-Pérez, J. H., Kirches, E., Mawrin, C., Firsching, R., & Schneider, T. (2011). Cytotoxic effect of different statins and thiazolidinediones on malignant glioma cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, *67*(5), 1193–201. <http://doi.org/10.1007/s00280-010-1535-2>
- Tapia-Pérez, J. H., Sanchez-Aguilar, M., & Schneider, T. (2010). The role of statins in neurosurgery. *Neurosurgical Review*, *33*(3), 259–70; discussion 270. <http://doi.org/10.1007/s10143-010-0259-4>

- Tasdemir, D., Kaiser, M., Brun, R., Yardley, V., Schmidt, T. J., Tosun, F., & Rüedi, P. (2006). Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: in vitro, in vivo, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *50*(4), 1352–64. <http://doi.org/10.1128/AAC.50.4.1352-1364.2006>
- Taylor, J. S., Reid, T. S., Terry, K. L., Casey, P. J., & Beese, L. S. (2003). Structure of mammalian protein geranylgeranyltransferase type-I. *The EMBO Journal*, *22*(22), 5963–74. <http://doi.org/10.1093/emboj/cdg571>
- Teng, H. K., Teng, K. K., Lee, R., Wright, S., Tevar, S., Almeida, R. D., Hempstead, B. L. (2005). ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *25*(22), 5455–63. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5123-04.2005>
- Thelen, K. M., Falkai, P., Bayer, T. A., & Lütjohann, D. (2006). Cholesterol synthesis rate in human hippocampus declines with aging. *Neuroscience Letters*, *403*(1–2), 15–9. <http://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.04.034>
- Thinakaran, G., Borchelt, D. R., Lee, M. K., Slunt, H. H., Spitzer, L., Kim, G., Sisodia, S. S. (1996). Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. *Neuron*, *17*(1), 181–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8755489>
- Thinakaran, G., & Koo, E. H. (2008). Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(44), 29615–9. <http://doi.org/10.1074/jbc.R800019200>
- Tindale, L. C., Leach, S., Spinelli, J. J., & Brooks-Wilson, A. R. (2017). Lipid and Alzheimer's disease genes associated with healthy aging and longevity in healthy oldest-old. *Oncotarget*, *8*(13), 20612–20621. <http://doi.org/10.18632/oncotarget.15296>
- Tolias, K. F., Bikoff, J. B., Burette, A., Paradis, S., Harrar, D., Tavazoie, S., Greenberg, M. E. (2005). The Rac1-GEF Tiam1 couples the NMDA receptor to the activity-dependent development of dendritic arbors and spines. *Neuron*, *45*(4), 525–38. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.01.024>
- Tolias, K. F., Bikoff, J. B., Kane, C. G., Tolias, C. S., Hu, L., & Greenberg, M. E. (2007). The Rac1 guanine nucleotide exchange factor Tiam1 mediates EphB receptor-dependent dendritic spine development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(17), 7265–70. <http://doi.org/10.1073/pnas.0702044104>
- Tolias, K. F., Duman, J. G., & Um, K. (2011). Control of synapse development and plasticity by Rho GTPase regulatory proteins. *Progress in Neurobiology*, *94*(2), 133–48. <http://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.04.011>
- Tong, H., Holstein, S. A., & Hohl, R. J. (2005). Simultaneous determination of farnesyl and geranylgeranyl pyrophosphate levels in cultured cells. *Analytical Biochemistry*, *336*(1), 51–59. <http://doi.org/10.1016/j.ab.2004.09.024>
- Tõugu, V., Tiiman, A., & Palumaa, P. (2011). Interactions of Zn(II) and Cu(II) ions with Alzheimer's amyloid-beta peptide. Metal ion binding, contribution to fibrillization and toxicity. *Metallomics : Integrated Biometal Science*, *3*(3), 250–61. <http://doi.org/10.1039/c0mt00073f>

- Tsai, T., Klausmeyer, A., Conrad, R., Gottschling, C., Leo, M., Faissner, A., & Wiese, S. (2013). 7,8-Dihydroxyflavone leads to survival of cultured embryonic motoneurons by activating intracellular signaling pathways. *Molecular and Cellular Neurosciences*, *56*, 18–28. <http://doi.org/10.1016/j.mcn.2013.02.007>
- Tsigelny, I. F., Sharikov, Y., Kouznetsova, V. L., Greenberg, J. P., Wrasidlo, W., Gonzalez, T., Masliah, E. (2013). Structural Diversity of Alzheimer's Disease Amyloid- $\beta$  Dimers and Their Role in Oligomerization and Fibril Formation. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*. <http://doi.org/10.3233/JAD-131589>
- Turner, P. R., O'Connor, K., Tate, W. P., & Abraham, W. C. (2003). Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Progress in Neurobiology*, *70*(1), 1–32. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12927332>
- Udayar, V., Buggia-Prévot, V., Guerreiro, R. L., Siegel, G., Rambabu, N., Soohoo, A. L., Rajendran, L. (2013). A paired RNAi and RabGAP overexpression screen identifies Rab11 as a regulator of  $\beta$ -amyloid production. *Cell Reports*, *5*(6), 1536–51. <http://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.12.005>
- Ullrich, A., Gray, A., Berman, C., & Dull, T. J. (1983). Human beta-nerve growth factor gene sequence highly homologous to that of mouse. *Nature*, *303*(5920), 821–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6688123>
- Um, K., Niu, S., Duman, J. G., Cheng, J. X., Tu, Y.-K., Schwechter, B., ... Tolia, K. F. (2014). Dynamic control of excitatory synapse development by a Rac1 GEF/GAP regulatory complex. *Developmental Cell*, *29*(6), 701–15. <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.05.011>
- United Nations Population Divisions- Population, environment and development. (2001). Retrieved from <http://www.un.org/esa/population/publications/pdewallchart/popenvdev.pdf>
- Unlu, S., Mason, C. D., Schachter, M., & Hughes, A. D. (2000). Perillyl alcohol, an inhibitor of geranylgeranyl transferase, induces apoptosis of immortalized human vascular smooth muscle cells in vitro. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, *35*(2), 341–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10672871>
- Urano, Y., Hayashi, I., Isoo, N., Reid, P. C., Shibasaki, Y., Noguchi, N., Kodama, T. (2005). Association of active gamma-secretase complex with lipid rafts. *Journal of Lipid Research*, *46*(5), 904–12. <http://doi.org/10.1194/jlr.M400333-JLR200>
- Vadukul, D. M., Gbajumo, O., Marshall, K. E., & Serpell, L. C. (2017). Amyloidogenicity and toxicity of the reverse and scrambled variants of amyloid- $\beta$  1-42. *FEBS Letters*, *591*(5), 822–830. <http://doi.org/10.1002/1873-3468.12590>
- van der Wulp, M. Y. M., Verkade, H. J., & Groen, A. K. (2013). Regulation of cholesterol homeostasis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *368*(1–2), 1–16. <http://doi.org/10.1016/j.mce.2012.06.007>
- Vance, J. E., Hayashi, H., & Karten, B. (2005). Cholesterol homeostasis in neurons and glial cells. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *16*(2), 193–212. <http://doi.org/10.1016/j.semcd.2005.01.005>



- Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., Citron, M. (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science (New York, N.Y.)*, 286(5440), 735–41. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10531052>
- Vassar, R., & Kandalepas, P. C. (2011). The  $\beta$ -secretase enzyme BACE1 as a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research & Therapy*, 3(3), 20. <http://doi.org/10.1186/alzrt82>
- Vasudevan, A., Qian, Y., Vogt, A., Blaskovich, M. A., Ohkanda, J., Sebti, S. M., & Hamilton, A. D. (1999). Potent, highly selective, and non-thiol inhibitors of protein geranylgeranyltransferase-I. *Journal of Medicinal Chemistry*, 42(8), 1333–40. <http://doi.org/10.1021/jm9900873>
- Venugopal, C., Demos, C. M., Rao, K. S. J., Pappolla, M. A., & Sambamurti, K. (2008). Beta-secretase: structure, function, and evolution. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, 7(3), 278–94. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2921875&tool=pmc&rentrez&rendertype=abstract>
- Vetrivel, K. S., Cheng, H., Lin, W., Sakurai, T., Li, T., Nukina, N., Thinakaran, G. (2004). Association of gamma-secretase with lipid rafts in post-Golgi and endosome membranes. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(43), 44945–54. <http://doi.org/10.1074/jbc.M407986200>
- Vetrivel, K. S., Zhang, Y., Xu, H., & Thinakaran, G. (2006). Pathological and physiological functions of presenilins. *Molecular Neurodegeneration*, 1, 4. <http://doi.org/10.1186/1750-1326-1-4>
- Vishal, S., Sourabh, A., & Harkirat, S. (2011). Alois Alzheimer (1864-1915) and the Alzheimer syndrome. *Journal of Medical Biography*, 19(1), 32–3. <http://doi.org/10.1258/jmb.2010.010037>
- Wahrle, S., Das, P., Nyborg, A. C., McLendon, C., Shoji, M., Kawarabayashi, T., Golde, T. E. (2002). Cholesterol-dependent gamma-secretase activity in buoyant cholesterol-rich membrane microdomains. *Neurobiology of Disease*, 9(1), 11–23. <http://doi.org/10.1006/nbdi.2001.0470>
- Wallace, M., Frankfurt, M., Arellanos, A., Inagaki, T., & Luine, V. (2007). Impaired recognition memory and decreased prefrontal cortex spine density in aged female rats. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1097, 54–7. <http://doi.org/10.1196/annals.1379.026>
- Walsh, D. M., Hartley, D. M., Kusumoto, Y., Fezoui, Y., Condon, M. M., Lomakin, A., Teplow, D. B. (1999). Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(36), 25945–52. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10464339>
- Walsh, D. M., Klyubin, I., Fadeeva, J. V., Cullen, W. K., Anwyl, R., Wolfe, M. S., Selkoe, D. J. (2002). Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*, 416(6880), 535–9. <http://doi.org/10.1038/416535a>

- Walsh, D. M., Lomakin, A., Benedek, G. B., Condron, M. M., & Teplow, D. B. (1997). Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate. *The Journal of Biological Chemistry*, *272*(35), 22364–72. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9268388>
- Walter, J., Kaether, C., Steiner, H., & Haass, C. (2001). The cell biology of Alzheimer's disease: uncovering the secrets of secretases. *Current Opinion in Neurobiology*, *11*(5), 585–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11595492>
- Wang, C., Chen, T., Li, G., Zhou, L., Sha, S., & Chen, L. (2015). Simvastatin prevents  $\beta$ -amyloid(25-35)-impaired neurogenesis in hippocampal dentate gyrus through  $\alpha$ 7nAChR-dependent cascading PI3K-Akt and increasing BDNF via reduction of farnesyl pyrophosphate. *Neuropharmacology*, *97*, 122–32. <http://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.05.020>
- Wang, H.-L., Wang, Y.-Y., Liu, X.-G., Kuo, S.-H., Liu, N., Song, Q.-Y., & Wang, M.-W. (2016). Cholesterol, 24-Hydroxycholesterol, and 27-Hydroxycholesterol as Surrogate Biomarkers in Cerebrospinal Fluid in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease: A Meta-Analysis. *Journal of Alzheimer's Disease*, *51*(1), 45–55. <http://doi.org/10.3233/JAD-150734>
- Wang, H. Y., Lee, D. H., D'Andrea, M. R., Peterson, P. A., Shank, R. P., & Reitz, A. B. (2000). beta-Amyloid(1-42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(8), 5626–32. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10681545>
- Wang, P.-L., Niidome, T., Akaike, A., Kihara, T., & Sugimoto, H. (2009). Rac1 inhibition negatively regulates transcriptional activity of the amyloid precursor protein gene. *Journal of Neuroscience Research*, *87*(9), 2105–14. <http://doi.org/10.1002/jnr.22039>
- Wang, X., Romine, J. L., Gao, X., & Chen, J. (2017). Aging impairs dendrite morphogenesis of newborn neurons and is rescued by 7, 8-dihydroxyflavone. *Aging Cell*, *16*(2), 304–311. <http://doi.org/10.1111/acer.12553>
- Wasser, C. R., & Kavalali, E. T. (2009). Leaky synapses: regulation of spontaneous neurotransmission in central synapses. *Neuroscience*, *158*(1), 177–88. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.03.028>
- Weidemann, A., Eggert, S., Reinhard, F. B. M., Vogel, M., Paliga, K., Baier, G., Evin, G. (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. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11851430>
- Weinreb, O., Bar-Am, O., Amit, T., Chillag-Talmor, O., & Youdim, M. B. H. (2004). Neuroprotection via pro-survival protein kinase C isoforms associated with Bcl-2 family members. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *18*(12), 1471–3. <http://doi.org/10.1096/fj.04-1916fje>
- Weis, K. (2003). Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell*, *112*(4), 441–51. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12600309>

- Wennerberg, K., & Der, C. J. (2004). Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *Journal of Cell Science*, *117*(Pt 8), 1301–12. <http://doi.org/10.1242/jcs.01118>
- Wennerberg, K., Rossman, K. L., & Der, C. J. (2005). The Ras superfamily at a glance. *Journal of Cell Science*, *118*(Pt 5), 843–6. <http://doi.org/10.1242/jcs.01660>
- Weskamp, G., Cai, H., Brodie, T. A., Higashyama, S., Manova, K., Ludwig, T., & Blobel, C. P. (2002). Mice lacking the metalloprotease-disintegrin MDC9 (ADAM9) have no evident major abnormalities during development or adult life. *Molecular and Cellular Biology*, *22*(5), 1537–44. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=134708&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Weskamp, G., Krätzschar, J., Reid, M. S., & Blobel, C. P. (1996). MDC9, a widely expressed cellular disintegrin containing cytoplasmic SH3 ligand domains. *The Journal of Cell Biology*, *132*(4), 717–26. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2199860&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Wetmore, C., Cao, Y. H., Pettersson, R. F., & Olson, L. (1991). Brain-derived neurotrophic factor: subcellular compartmentalization and interneuronal transfer as visualized with anti-peptide antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *88*(21), 9843–7. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=52817&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Whyte, D. B., Kirschmeier, P., Hockenberry, T. N., Nunez-Oliva, I., James, L., Catino, J. J., Pai, J. K. (1997). K- and N-Ras are geranylgeranylated in cells treated with farnesyl protein transferase inhibitors. *The Journal of Biological Chemistry*, *272*(22), 14459–64. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9162087>
- Wiedenmann, B., & Franke, W. W. (1985). Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell*, *41*(3), 1017–28. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3924408>
- Wierzbicki, A. S., Poston, R., & Ferro, A. (2003). The lipid and non-lipid effects of statins. *Pharmacology & Therapeutics*, *99*(1), 95–112. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12804701>
- Wiesmann, C., Ultsch, M. H., Bass, S. H., & de Vos, A. M. (1999). Crystal structure of nerve growth factor in complex with the ligand-binding domain of the TrkA receptor. *Nature*, *401*(6749), 184–8. <http://doi.org/10.1038/43705>
- Williams, J. (2011, November 28). 7,8-dihydroxyflavone, a selective tyrosine kinase receptor B agonist and BDNF mimic, promotes angiogenesis. Retrieved from [http://honors.epub.etsu.edu/107/1/Jeremy\\_Williams\\_Final\\_Thesis\\_PDF.pdf](http://honors.epub.etsu.edu/107/1/Jeremy_Williams_Final_Thesis_PDF.pdf)
- Wirhth, O., Thelen, K. M., Lütjohann, D., Falkai, P., & Bayer, T. A. (2007). Altered cholesterol metabolism in APP695-transfected neuroblastoma cells. *Brain Research*, *1152*, 209–14. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.03.029>

- Wirhth, O., Weis, J., Szczygielski, J., Multhaup, G., & Bayer, T. A. (2006). Axonopathy in an APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, *111*(4), 312–9. <http://doi.org/10.1007/s00401-006-0041-4>
- Wiseman, D. A., Werner, S. R., & Crowell, P. L. (2007). Cell cycle arrest by the isoprenoids perillyl alcohol, geraniol, and farnesol is mediated by p21(Cip1) and p27(Kip1) in human pancreatic adenocarcinoma cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *320*(3), 1163–70. <http://doi.org/10.1124/jpet.106.111666>
- Wolfe, M. S., Xia, W., Ostaszewski, B. L., Diehl, T. S., Kimberly, W. T., & Selkoe, D. J. (1999). Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature*, *398*(6727), 513–7. <http://doi.org/10.1038/19077>
- Wolozin, B. (2004). Cholesterol and the biology of Alzheimer's disease. *Neuron*, *41*(1), 7–10. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14715130>
- Wolozin, B., Kellman, W., Ruosseau, P., Celesia, G. G., & Siegel, G. (2000). Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Archives of Neurology*, *57*(10), 1439–43. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11030795>
- Wolozin, B., Manger, J., Bryant, R., Cordy, J., Green, R. C., & McKee, A. (2006). Re-assessing the relationship between cholesterol, statins and Alzheimer's disease. *Acta Neurologica Scandinavica. Supplementum*, *185*, 63–70. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2006.00687.x>
- Wong, G. T., Manfra, D., Poulet, F. M., Zhang, Q., Josien, H., Bara, T., Parker, E. M. (2004). Chronic treatment with the gamma-secretase inhibitor LY-411,575 inhibits beta-amyloid peptide production and alters lymphopoiesis and intestinal cell differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(13), 12876–82. <http://doi.org/10.1074/jbc.M311652200>
- Wong, H.-K., Sakurai, T., Oyama, F., Kaneko, K., Wada, K., Miyazaki, H., Nukina, N. (2005). beta Subunits of voltage-gated sodium channels are novel substrates of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme (BACE1) and gamma-secretase. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(24), 23009–17. <http://doi.org/10.1074/jbc.M414648200>
- Wong, J., Rothmond, D. A., Webster, M. J., & Weickert, C. S. (2013). Increases in two truncated TrkB isoforms in the prefrontal cortex of people with schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, *39*(1), 130–40. <http://doi.org/10.1093/schbul/sbr070>
- Wong, R. S., Cechetto, D. F., & Whitehead, S. N. (2016). Assessing the Effects of Acute Amyloid  $\beta$  Oligomer Exposure in the Rat. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(9), 1390. <http://doi.org/10.3390/ijms17091390>
- Wong, W. W. L., Dimitroulakos, J., Minden, M. D., & Penn, L. Z. (2002). HMG-CoA reductase inhibitors and the malignant cell: the statin family of drugs as triggers of tumor-specific apoptosis. *Leukemia*, *16*(4), 508–19. <http://doi.org/10.1038/sj.leu.2402476>

- Wood, W. G., Igbavboa, U., Muller, W. E., & Eckert, G. P. (2013). Statins, Bcl-2, and Apoptosis: Cell Death or Cell Protection? *Molecular Neurobiology*. <http://doi.org/10.1007/s12035-013-8496-5>
- Wood, W. G., Li, L., Müller, W. E., & Eckert, G. P. (2014). Cholesterol as a causative factor in Alzheimer's disease: a debatable hypothesis. *Journal of Neurochemistry*, 129(4), 559–72. <http://doi.org/10.1111/jnc.12637>
- Wood, W. G., Müller, W. E., & Eckert, G. P. (2014). Statins and Neuroprotection: Basic Pharmacology Needed. *Molecular Neurobiology*. <http://doi.org/10.1007/s12035-014-8647-3>
- Wood, W. G., Schroeder, F., Igbavboa, U., Avdulov, N. A., & Chochina, S. V. (2002). Brain membrane cholesterol domains, aging and amyloid beta-peptides. *Neurobiology of Aging*, 23(5), 685–94. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12392774>
- Worthylake, D. K., Rossman, K. L., & Sondek, J. (2000). Crystal structure of Rac1 in complex with the guanine nucleotide exchange region of Tiam1. *Nature*, 408(6813), 682–8. <http://doi.org/10.1038/35047014>
- Wright, L. P., & Philips, M. R. (2006). Thematic review series: lipid posttranslational modifications. CAAX modification and membrane targeting of Ras. *Journal of Lipid Research*, 47(5), 883–91. <http://doi.org/10.1194/jlr.R600004-JLR200>
- Wu, H., Jiang, H., Lu, D., Xiong, Y., Qu, C., Zhou, D., ... Chopp, M. (2009). Effect of simvastatin on glioma cell proliferation, migration, and apoptosis. *Neurosurgery*, 65(6), 1087-96; discussion 1096–7. <http://doi.org/10.1227/01.NEU.0000360130.52812.1D>
- Wu, K.-Y., Zhou, X.-P., & Luo, Z.-G. (2010). Geranylgeranyltransferase I is essential for dendritic development of cerebellar Purkinje cells. *Molecular Brain*, 3, 18. <http://doi.org/10.1186/1756-6606-3-18>
- Wu, S. K., Zeng, K., Wilson, I. A., & Balch, W. E. (1996). Structural insights into the function of the Rab GDI superfamily. *Trends in Biochemical Sciences*, 21(12), 472–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9009830>
- Xie, Z., Dong, Y., Maeda, U., Xia, W., & Tanzi, R. E. (2007). RNA interference silencing of the adaptor molecules ShcC and Fe65 differentially affect amyloid precursor protein processing and Abeta generation. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(7), 4318–25. <http://doi.org/10.1074/jbc.M609293200>
- Xiong, X.-D., & Chen, G.-H. (2010). Research progress on the age-related changes in proteins of the synaptic active zone. *Physiology & Behavior*, 101(1), 1–12. <http://doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.04.025>
- Xu, H., Greengard, P., & Gandy, S. (1995). Regulated formation of Golgi secretory vesicles containing Alzheimer beta-amyloid precursor protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(40), 23243–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7559474>
- Xu, J., Chen, S., Ahmed, S. H., Chen, H., Ku, G., Goldberg, M. P., & Hsu, C. Y. (2001). Amyloid-beta peptides are cytotoxic to oligodendrocytes. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(1), RC118. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11150354>

- Xu, M., Floyd, H. S., Greth, S. M., Chang, W.-C. L., Lohman, K., Stoyanova, R., Miller, M. S. (2004). Perillyl alcohol-mediated inhibition of lung cancer cell line proliferation: potential mechanisms for its chemotherapeutic effects. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 195(2), 232–246. <http://doi.org/10.1016/j.taap.2003.11.013>
- Xu, W., Fang, F., Ding, J., & Wu, C. (2018). Dysregulation of Rab5-mediated endocytic pathways in Alzheimer's disease. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 19(4), 253–262. <http://doi.org/10.1111/tra.12547>
- Yagishita, S., Morishima-Kawashima, M., Tanimura, Y., Ishiura, S., & Ihara, Y. (2006). DAPT-induced intracellular accumulations of longer amyloid beta-proteins: further implications for the mechanism of intramembrane cleavage by gamma-secretase. *Biochemistry*, 45(12), 3952–60. <http://doi.org/10.1021/bi0521846>
- Yamaguchi, Y., & Pasquale, E. B. (2004). Eph receptors in the adult brain. *Current Opinion in Neurobiology*, 14(3), 288–96. <http://doi.org/10.1016/j.conb.2004.04.003>
- Yanae, M., Tsubaki, M., Satou, T., Itoh, T., Imano, M., Yamazoe, Y., & Nishida, S. (2011). Statin-induced apoptosis via the suppression of ERK1/2 and Akt activation by inhibition of the geranylgeranyl-pyrophosphate biosynthesis in glioblastoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, 30, 74. <http://doi.org/10.1186/1756-9966-30-74>
- Yanagisawa, K. (2002). Cholesterol and pathological processes in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience Research*, 70(3), 361–366. <http://doi.org/10.1002/jnr.10348>
- Yankner, B. A., Dawes, L. R., Fisher, S., Villa-Komaroff, L., Oster-Granite, M. L., & Neve, R. L. (1989). Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease. *Science (New York, N.Y.)*, 245(4916), 417–20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2474201>
- Ye, X., & Carew, T. J. (2010). Small G protein signaling in neuronal plasticity and memory formation: the specific role of ras family proteins. *Neuron*, 68(3), 340–61. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.09.013>
- Yeagle, P. L. (1989). Lipid regulation of cell membrane structure and function. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 3(7), 1833–42. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2469614>
- Yeruva, L., Pierre, K. J., Elegbede, A., Wang, R. C., & Carper, S. W. (2007). Perillyl alcohol and perillic acid induced cell cycle arrest and apoptosis in non small cell lung cancer cells. *Cancer Letters*, 257(2), 216–26. <http://doi.org/10.1016/j.canlet.2007.07.020>
- Yongjun, Y., Shuyun, H., Lei, C., Xiangrong, C., Zhilin, Y., & Yiquan, K. (2013). Atorvastatin suppresses glioma invasion and migration by reducing microglial MT1-MMP expression. *Journal of Neuroimmunology*, 260(1–2), 1–8. <http://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2013.04.020>
- Younkin, S. G. (1998). The role of A beta 42 in Alzheimer's disease. *Journal of Physiology, Paris*, 92(3–4), 289–92. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9789825>

- Yuan, J., & Yankner, B. A. (2000). Apoptosis in the nervous system. *Nature*, *407*(6805), 802–9. <http://doi.org/10.1038/35037739>
- Yuri, T., Danbara, N., Tsujita-Kyutoku, M., Kiyozuka, Y., Senzaki, H., Shikata, N., ... Tsubura, A. (2004). Perillyl alcohol inhibits human breast cancer cell growth in vitro and in vivo. *Breast Cancer Research and Treatment*, *84*(3), 251–60. <http://doi.org/10.1023/B:BREA.0000019966.97011.4d>
- Zalcman, G., Closson, V., Camonis, J., Honoré, N., Rousseau-Merck, M. F., Tavitian, A., & Olofsson, B. (1996). RhoGDI-3 is a new GDP dissociation inhibitor (GDI). Identification of a non-cytosolic GDI protein interacting with the small GTP-binding proteins RhoB and RhoG. *The Journal of Biological Chemistry*, *271*(48), 30366–74. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8939998>
- Zambón, D., Quintana, M., Mata, P., Alonso, R., Benavent, J., Cruz-Sánchez, F., ... Pappolla, M. A. (2010). Higher incidence of mild cognitive impairment in familial hypercholesterolemia. *The American Journal of Medicine*, *123*(3), 267–74. <http://doi.org/10.1016/j.amjmed.2009.08.015>
- Zeng, Y., Liu, Y., Wu, M., Liu, J., & Hu, Q. (2012). Activation of TrkB by 7,8-dihydroxyflavone prevents fear memory defects and facilitates amygdalar synaptic plasticity in aging. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, *31*(4), 765–78. <http://doi.org/10.3233/JAD-2012-120886>
- Zeng, Y., Lv, F., Li, L., Yu, H., Dong, M., & Fu, Q. (2012). 7,8-dihydroxyflavone rescues spatial memory and synaptic plasticity in cognitively impaired aged rats. *Journal of Neurochemistry*, *122*(4), 800–11. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07830.x>
- Zeng, Y., Tan, M., Kohyama, J., Sneddon, M., Watson, J. B., Sun, Y. E., & Xie, C.-W. (2011). Epigenetic enhancement of BDNF signaling rescues synaptic plasticity in aging. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *31*(49), 17800–10. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3878-11.2011>
- Zhang, F. L., & Casey, P. J. (1996). Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annual Review of Biochemistry*, *65*, 241–69. <http://doi.org/10.1146/annurev.bi.65.070196.001325>
- Zhang, Y., Appelkvist, E. L., Kristensson, K., & Dallner, G. (1996). The lipid compositions of different regions of rat brain during development and aging. *Neurobiology of Aging*, *17*(6), 869–75. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9363798>
- Zhang, Y., McLaughlin, R., Goodyer, C., & LeBlanc, A. (2002). Selective cytotoxicity of intracellular amyloid beta peptide1-42 through p53 and Bax in cultured primary human neurons. *The Journal of Cell Biology*, *156*(3), 519–29. <http://doi.org/10.1083/jcb.200110119>
- Zhang, Z., Liu, X., Schroeder, J. P., Chan, C.-B., Song, M., Yu, S. P., Ye, K. (2014). 7,8-dihydroxyflavone prevents synaptic loss and memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *39*(3), 638–50. <http://doi.org/10.1038/npp.2013.243>

- Zhao, G., Mao, G., Tan, J., Dong, Y., Cui, M.-Z., Kim, S.-H., & Xu, X. (2004). Identification of a new presenilin-dependent zeta-cleavage site within the transmembrane domain of amyloid precursor protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(49), 50647–50. <http://doi.org/10.1074/jbc.C400473200>
- Zhao, N., Liu, C.-C., Qiao, W., & Bu, G. (2017). Apolipoprotein E, Receptors, and Modulation of Alzheimer's Disease. *Biological Psychiatry*. <http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.03.003>
- Zheng, Y., Fischer, D. J., Santos, M. F., Tigyi, G., Pasteris, N. G., Gorski, J. L., & Xu, Y. (1996). The faciogenital dysplasia gene product FGD1 functions as a Cdc42Hs-specific guanine-nucleotide exchange factor. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(52), 33169–72. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8969170>
- Zhou, D., Noviello, C., D'Ambrosio, C., Scaloni, A., & D'Adamio, L. (2004). Growth factor receptor-bound protein 2 interaction with the tyrosine-phosphorylated tail of amyloid beta precursor protein is mediated by its Src homology 2 domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(24), 25374–80. <http://doi.org/10.1074/jbc.M400488200>
- Zhou, P., Porcionatto, M., Pilapil, M., Chen, Y., Choi, Y., Tolias, K. F., Segal, R. A. (2007). Polarized signaling endosomes coordinate BDNF-induced chemotaxis of cerebellar precursors. *Neuron*, 55(1), 53–68. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.05.030>
- Zhou, Q., & Liao, J. K. (2010). Pleiotropic effects of statins. - Basic research and clinical perspectives -. *Circulation Journal : Official Journal of the Japanese Circulation Society*, 74(5), 818–26. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3807085&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
- Zhou, X.-P., Wu, K.-Y., Liang, B., Fu, X.-Q., & Luo, Z.-G. (2008). TrkB-mediated activation of geranylgeranyltransferase I promotes dendritic morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(44), 17181–6. <http://doi.org/10.1073/pnas.0800846105>
- Zhou, X., Qian, J., Hua, L., Shi, Q., Liu, Z., Xu, Y., Yu, R. (2013). Geranylgeranyltransferase I promotes human glioma cell growth through Rac1 membrane association and activation. *Journal of Molecular Neuroscience : MN*, 49(1), 130–9. <http://doi.org/10.1007/s12031-012-9905-3>
- Zhou, Y., Su, Y., Li, B., Liu, F., Ryder, J. W., Wu, X., ... Ni, B. (2003). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs can lower amyloidogenic Abeta42 by inhibiting Rho. *Science (New York, N.Y.)*, 302(5648), 1215–7. <http://doi.org/10.1126/science.1090154>
- Zhou, Y., Suram, A., Venugopal, C., Prakasam, A., Lin, S., Su, Y., Sambamurti, K. (2008). Geranylgeranyl pyrophosphate stimulates gamma-secretase to increase the generation of Abeta and APP-CTFgamma. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22(1), 47–54. <http://doi.org/10.1096/fj.07-8175com>
- Zhu, X., Raina, A. K., Boux, H., Simmons, Z. L., Takeda, A., & Smith, M. A. (2000). Activation of oncogenic pathways in degenerating neurons in Alzheimer disease. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 18(4–5), 433–437. [http://doi.org/10.1016/S0736-5748\(00\)00010-1](http://doi.org/10.1016/S0736-5748(00)00010-1)



Zou, L., Yang, R., Zhang, P., & Dai, Y. (2010). The enhancement of amyloid precursor protein and beta-site amyloid cleavage enzyme 1 interaction: amyloid-beta production with aging. *International Journal of Molecular Medicine*, 25(3), 401–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20127045>

## Abkürzungen

7, 8-DHF	7,8-Dihydroxyflavon
ACN	Acetonitril
AD	Alzheimer Demenz
ADAM	A disintegrin and metalloproteinase
AICD	APP intracellular domain
APH1	Anterior pharynx-defective 1
APLP-1	Amyloid-like Proteinen 1
APLP-2	Amyloid-like Proteinen 2
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amyloid Precursor Protein
ARC	Activity-regulated cytoskeleton-associated
Arf	ADP ribosylation factors
Arl	Arf -like proteins
ATP	Adenosintriphosphat
A $\beta$	Amyloid Beta oder Beta- Amyloid
BACE1	$\beta$ -site APP cleaving enzyme 1
BACE2	$\beta$ -site APP cleaving enzyme 2
BCR	Breaking cluster region
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BSA	Bovine Serum Albumin
CERAD	Consortium to Establish a registry for Alzheimers Disease
ChBF	Cholinergic basal forebrain
CHOD – PAP - Methode	Cholesteroxidase Peroxidase Aminophenazon Phenol-Methode
CTF83	C-terminales Fragment C83
CTF99	C-terminales C99 Fragment
D*-GCVLL	Dansyl gly-cys-val-leu-leu
D*-GCVLS	Dansyl gly-cys-val-leu-ser
DbI	Diffuse B-cell-lymphoma
DH	Homologe Domäne oder homology Domäne
DHR1	Dock-homology region-1

DHR2	Dock-homology region-2
DMAPP	3,3-Dimethylallyl-diphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPTI	Duale Prenyltransferase-Inhibitoren
DTT	1,4 - Dithioerythritol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure Natriumsalz
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EphB2	Ephrin type-B receptor 2
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
FAD	Familiäre Form der Alzheimer Demenz
FCS	Fetales Kälberserum
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
FPP	Farnesylpyrophosphat
FPRL1	Formyl peptide receptor like 1
FTase	Farnesyltransferase
FTI	Farnesyltransferase-Inhibitoren
G418	Gentamycin Sulfat
GAP	GTPase activating protein
GAP43	Growth Associated Protein 43
GBM	Glioblastoma multiforme
GDI	Guanine nucleotide exchange inhibitors
GDP	Guanine nucleotide diphosphate
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GF	Growth factor
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
GGTase-I	Geranylgeranyltransferase-I
GGTase-II	Geranylgeranyltransferase-II
GGTI	Geranylgeranyltransferase-Inhibitoren
GPP	Geranlypyrophosphat
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2

## Abkürzungen

GTP	Guanine nucleotide triphosphate
HDL	High density lipoproteins
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA
HMG-CoA Reduktase	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reduktase
HMG-CoA Synthase	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Synthase
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (englisch: high performance liquid chromatography)
HRP	Meerrettichperoxidase (englisch: Horseradish peroxidase)
IDL	Intermediate density lipoproteins
IPP	Isopentenylpyrophosphat
Kleine GTPasen	Guanosintriphosphatasen
LDL	Low density lipoproteins
LDLr	Low Density Lipoprotein Rezeptor
LOV	Lovastatin
LRP1	LDLr-related Protein-1
LTP	Langzeitpotenzierung
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MeOH	Methanol
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MTT	3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-tetrazoliumbromid
NGF	Nerve growth factor
NMDA-Rezeptor	N-Methyl-D-Aspartat-Repetor
nPKC	novel Protein Kinase C
NT-3	Neurotrophin-3
NT-4	Neurotrophin-4
NT-5	Neurtrophin-5
p75NTR	p75 Neurotrophin Rezeptor
PDE $\delta$	Delta Untereinheit der cGMP Phosphodiesterase
PDK	Phosphoinositol-dependent Kinase
PEN2	Presenilin enhancer 2
PenStrep	Penicillin/Streptomycin
PH Domäne	Pleckstrin homologe Domäne oder Pleckstrin homology Domäne
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase

PIPES	Piperazin-N,N`-bis(2-Ethansulfonsäure)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNS	Peripheres Nervensystem
POH	Perillylalkohol
PS-1	Presinilin-1
PS-2	Presinilin-2
PSD	Postsynaptische Dichte
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rab	Ras-like proteins in brain
RAGE	Receptor for advanced glycation end products
Ran	Ran-related oder Ras-like nuclear
Ras	Rat sarcoma
REP	Rab Escort Protein
Rho	Ras homolog
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SAD	Sporadische Form der Alzheimer Demenz
sAPP $\alpha$	sekretierte APP $\alpha$
sAPP $\beta$	sekretiertes APP $\beta$
SARA	Smad anchor for receptor activation
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH3 Domäne	Src homology domain 3
ShcC	Src homology collagen-like C
SLAT	SWAP70-like adaptor of T cells/IBP Proteine
SRB-1	Scavanger Rezeptors B1
SREBP	Sterol regulatory element-binding protein
SWAP70	Switch-associated protein 70
Tg	Transgen
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
Tiam1	T-cell lymphoma invasion and metastasis 1
TierSchG	Tierschutzgesetz
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TREM2	Triggering receptor expressed on myeloid cells 2
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

## Abkürzungen

Trk	Tropomyosin-related kinase
TZM	Temozolomid
VAMP	Vesicle-associated membrane protein
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VLDL	Very low density lipoproteins
Vps10p	Vascular protein sorting 10 protein
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentrales Nervensystem
$\alpha$ 7nAChR	$\alpha$ 7-Nikotin-Acetylcholin-Rezeptor

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der Cholesterinbiosynthese.** Die Abbildung zeigt die wichtigsten Intermediate und Enzyme des Mevalonatweges. Die einfachen Pfeile stellen eine einfache Umsetzung dar und zwei Pfeile hintereinander stehen für eine mehrstufige Umsetzung. 15
- Abbildung 2: Einteilung ausgewählter kleiner GTPasen in ihre Subfamilie und Untergruppe.** 24
- Abbildung 3. Vereinfachte Darstellung der Regulation von GTPasen.** Im Cytosol werden inaktive GDP-gebundene GTPasen der Ras-Superfamilie (Ras) mit dem Isoprenoid GGPP oder FPP prenyliert, katalysiert durch die Prenyltransferasen. Diese Prenylierung ist erforderlich für die Insertion der GTPasen in Membranen, wo sie durch GEFs (guanine nucleotide exchange factors) aktiviert werden. Die GEFs werden ihrerseits nach der Bindung von Wachstumsfaktoren (growth factor = GF) an den adequate Receptor aktiviert. Die Aktivierung der GDP-gebundenen GTPase erfolgt durch Phosphorylierung zum GTP-gebundenen Stadium. Die aktive GTPase kann durch GAPs (GTPase-activating proteins) deaktiviert werden. Im Cytosol halten GDIs (guanidine nucleotide-dissociation inhibitors) die GDP-gebundenen GTPase im inaktiven Stadium. Aktive GTPasen können über diverse Effektoren nachgelagerte Signalkaskaden aktivieren (Samuel & Hynds, 2010). 26
- Abbildung 4. Schematische Darstellung der APP Prozessierung.** 49
- Abbildung 5. Chemische Strukturformel der inaktiven Prodrugs der Statine Lovastatin (R1 = H, R2 = CH3) und Simvastatin (R1 = CH3, R2 = CH3).** 62
- Abbildung 6. Vereinfachte Darstellung des Signalweges, der maßgeblich die Organisation des Cytoskeletts, das Neuritenwachstum und die Synaptogenese reguliert.** Im Cytosol werden inaktive GDP-gebundene Rho-GTPasen bevorzugt mit GGPP prenyliert, katalysiert durch die Geranylgeranyl-Transferase-I (GGTase-I). Rab-GTPasen werden mit GGPP durch die Geranylgeranyl-Transferase-II (GGTase-II) prenyliert. Diese Prenylierung ist erforderlich für die Insertion der GTPasen in Membranen, wo sie durch GEFs (guanine nucleotide exchange factors) aktiviert werden. Die GEFs werden ihrerseits nach der Bindung von Wachstumsfaktoren (growth factor = GF) an den adequate Receptor aktiviert. Die Aktivierung der GDP-gebundenen GTPase erfolgt durch Phosphorylierung zum GTP-gebundenen Stadium. Die aktive GTPase kann durch GAPs (GTPase-activating proteins) deaktiviert werden. Im Cytosol halten GDIs (guanidine nucleotide-dissociation inhibitors) die GDP-gebundenen GTPase im inaktiven Stadium. Aktive Rho-GTPasen, vor allem Rac1, können über diverse Effektoren nachgelagerte Signalkaskaden aktivieren, die letztendlich zur Organisation des Cytoskeletts, zum Neuritenwachstum und zur Synaptogenese führen. 133

**Abbildung 7. Proteingehalte der Rho-GTPase Rac1 im Hirngewebe der C57BL/6**

**Mäuse.** Die WesternBlot Analyse von Membranpräparationen (a), Cytosolpräparationen (b) und von Gesamthomogenat (c) aus Hirngewebe junger (3 Monate alter = 3 mo) und gealterter (23 Monate alter = 23 mo) C57BL/6 Mäuse wurde verwendet um die Prenylierung der Rho-GTPase Rac1 (a, b, c) zu charakterisieren. Die Proteingehalte der Membran-gebundenen geranylgeranylierten Rho-GTPase Rac1 (membrane Rac1) wurden auf den Membran-Marker Flotillin-1 normiert. Die Proteingehalte der Cytosolpräparationen (cytosol Rac1) und der Gesamthomogenate (total Rac1) wurden auf GAPDH normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei den jeweiligen Graphen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ; ns=not significant), n=6.

135

**Abbildung 8. Proteingehalte der Rho-GTPase RhoA im Hirngewebe der C57BL/6**

**Mäuse.** Die WesternBlot Analyse von Membranpräparationen (a), Cytosolpräparationen (b) und von Gesamthomogenat (c) aus Hirngewebe junger (3 Monate alter = 3 mo) und gealterter (23 Monate alter = 23 mo) C57BL/6 Mäuse wurde verwendet um die Prenylierung der Rho-GTPase RhoA (a, b, c) zu charakterisieren. Die Proteingehalte der Membran-gebundenen geranylgeranylierten Rho-GTPase RhoA (membrane RhoA) wurden auf den Membran-Marker Flotillin-1 normiert. Die Proteingehalte der Cytosolpräparationen (cytosol RhoA) und der Gesamthomogenate (total RhoA) wurden auf GAPDH normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei den jeweiligen Graphen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ; ns=not significant), n=6.

136

**Abbildung 9. Proteingehalte der Rho-GTPase Cdc42 im Hirngewebe der C57BL/6**

**Mäuse.** Die WesternBlot Analyse von Membranpräparationen (a), Cytosolpräparationen (b) und von Gesamthomogenat (c) aus Hirngewebe junger (3 Monate alter = 3 mo) und gealterter (23 Monate alter = 23 mo) C57BL/6 Mäuse wurde verwendet um die Prenylierung der Rho-GTPase Cdc42 (a, b, c) zu charakterisieren. Die Proteingehalte der Membran-gebundenen geranylgeranylierten Rho-GTPase Cdc42 (membrane Cdc42) wurden auf den Membran-Marker Flotillin-1 normiert. Die Proteingehalte der Cytosolpräparationen (cytosol Cdc42) und der Gesamthomogenate (total Cdc42) wurden auf GAPDH normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei den jeweiligen Graphen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ; ns=not significant), n=6.

137

**Abbildung 10. Proteingehalte der Rab-GTPase Rab11B im Hirngewebe der C57BL/6**

**Mäuse.** Die WesternBlot Analyse von Membranpräparationen (a), Cytosolpräparationen (b) und von Gesamthomogenat (c) aus Hirngewebe junger (3 Monate alter = 3 mo) und gealterter (23 Monate alter = 23 mo) C57BL/6 Mäuse wurde verwendet um die Prenylierung der Rab-GTPase Rab11B (a, b, c) zu charakterisieren. Die Proteingehalte der Membran-gebundenen geranylgeranylierten Rab-GTPase Rab11B (membrane Rab11B) wurden auf den Membran-Marker Flotillin-1 normiert. Die Proteingehalte der Cytosolpräparationen (cytosol Rab11B) und der Gesamthomogenate (total Rab11B) wurden auf GAPDH normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei den jeweiligen Graphen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test (ns=not significant), n=6.

138



**Abbildung 11. Proteingehalte der Rab-GTPase Rab3A im Hirngewebe der C57BL/6 Mäuse.** Die WesternBlot Analyse von Membranpräparationen (a), Cytosolpräparationen (b) und von Gesamthomogenat (c) aus Hirngewebe junger (3 Monate alter = 3 mo) und gealterter (23 Monate alter = 23 mo) C57BL/6 Mäuse wurde verwendet um die Prenylierung der Rab-GTPase Rab3A (a, b, c) zu charakterisieren. Die Proteingehalte der Membran-gebundenen geranylgeranylierten Rab-GTPase Rab3A (membrane Rab3A) wurden auf den Membran-Marker Flotillin-1 normiert. Die Proteingehalte der Cytosolpräparationen (cytosol Rab3A) und der Gesamthomogenate (total Rab3A) wurden auf GAPDH normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei den jeweiligen Graphen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ; ns=not significant), n=6. **139**

**Abbildung 12. Proteingehalte von RhoGDI- $\alpha$  und RabGDI- $\alpha$  im Hirngewebe der C57BL/6 Mäuse.** Die WesternBlot Analyse von Cytosolpräparationen (a, b) aus Hirngewebe junger (3 Monate alter = 3 mo) und gealterter (23 Monate alter = 23 mo) C57BL/6 Mäuse wurde verwendet um die Funktion von RhoGDI- $\alpha$  und RabGDI- $\alpha$  zu charakterisieren. Die Proteingehalte der Cytosolpräparationen (RhoGDI $\alpha$ /GAPDH und RabGDI $\alpha$ /GAPDH) wurden auf GAPDH normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei den jeweiligen Graphen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test (ns=not significant), n=4. **140**

**Abbildung 13. GGPP, relative GGTase-Aktivität, Proteingehalt und mRNA-Expression der GGTase-I $\beta$  im Hirngewebe der C57BL/6 Mäuse.** Die Analysen des Hirngewebes junger (3 Monate alter = 3) und gealterter (23 Monate alter = 23) C57BL/6 Mäuse wurde verwendet um die Funktion der GGTase-I zu charakterisieren. Die Gehalte des Isoprenoids GGPP (a) wurden mittels HPLC-FD Methode quantifiziert. Die relative GGTase-Aktivität (b) (relative GGTase activity) wurde mittels Fluorimetrie bestimmt. Die Proteingehalte (c) (GGTaseI $\beta$ /GAPDH) wurden mittels WesternBlot Analyse und die mRNA-Expression (d) (GGTaseI $\beta$  mRNA/GAPDH) mittels qRT-PCR der GGTase-I $\beta$  im Gesamthomogenat gemessen auf GAPDH normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei dem Graphen (c) dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ;  $p^{**} < 0.01$ ;  $p^{***} < 0.001$ ), n=8 (GGPP), n=4 (relative GGTase-Aktivität), n=6 (GGTase-I $\beta$  Protein- und mRNA-Expression). **142**

**Abbildung 14. Proteingehalte von Synaptophysin und GAP-43 im Hirngewebe der C57BL/6 Mäuse.** Die WesternBlot der Gesamthomogenate aus Hirngewebe junger (3 Monate alter = 3 mo) und gealterter (23 Monate alter = 23 mo) C57BL/6 Mäuse wurde verwendet um die Proteingehalte der beiden synaptischen Marker Synaptophysin (a) und GAP-43 (b) zu bestimmen. Die Proteingehalte wurden auf GAPDH normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei den jeweiligen Graphen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^{**} < 0.01$ ;  $p^{***} < 0.001$ ), n=6. **144**

**Abbildung 15. Relative GGTase-Aktivität im Hirngewebe der NMRI Mäuse.** Die Analysen des Hirngewebes junger (3 Monate alter = 3) und gealterter (23 Monate alter = 23) NMRI Mäuse wurde durchgeführt um die Funktion der GGTase-I näher zu charakterisieren. Die relative GGTase-Aktivität (a, b) (relative GGTase activity) wurde mittels Fluorimetrie bestimmt. Abbildung (a) zeigt neben dem Leerwert (blank) das Emissionsspektrum der relativen Enzymaktivität der GGTase-I isoliert aus dem Hirngewebe junger (3 Monate alter = 3) und gealterter (23 Monate alter = 23) NMRI Mäuse. Die Messung erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm und der Emission von 400 nm bis 600 nm. Abbildung (b) zeigt die relative GGTase-Aktivität gemessen bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm und der Emission von 505 nm. Die Cholesterolgehalte (cholesterol) aus dem Hirngewebe der beiden Altersgruppen der NMRI Mäuse (c) wurden enzymatisch anhand der CHOD-PAP Methode ermittelt. Die chemische Strukturformel des spezifischen GGTase-I-Inhibitors GGTI-286 ist in Abbildung (d) dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ; ns=not significant), 1way ANOVA ( $p^{***} < 0.0001$ ),  $n=3$ . 145

**Abbildung 16. Effekt des GGTase-Inhibitors GGTI-286 auf die relative GGTase-Aktivität im Hirngewebe der NMRI Mäuse.** Die Analysen des Hirngewebes junger (3 Monate alter = 3) und gealterter (23 Monate alter = 23) NMRI Mäuse wurde durchgeführt um die Funktion der GGTase-I näher zu charakterisieren. Die relative GGTase-Aktivität (a, b) (relative GGTase activity) wurde mittels Fluorimetrie bestimmt. Die Graphen (a, b) zeigen die relative GGTase-Aktivität gemessen bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm und der Emission von 505 nm. Die isolierte GGTase-I aus dem Hirngewebe der jungen (a) und auch der gealterten (b) NMRI Mäuse wurde durch 2  $\mu$ M GGTI-286 inhibiert. Die isolierten Enzyme, die statt dem Inhibitor mit dem Solvent DMSO versetzt wurden, dienten als Kontrollen (control) für die Analysen mittels Fluorimetrie. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ),  $n=3$ . 146

**Abbildung 17. Verkürzter Mevalonat-/Isoprenoid-/Cholesterol-Biosytheseweg.** Der Mevalonatweg ist ein entscheidender Stoffwechselprozess in eukaryotischen Zellen, bei welchem das Mevalonat den Präkursor verschiedener Intermediate wie dem Farnesylpyrophosphat (FPP), dem Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) und dem Cholesterol darstellt. Die Synthese von FPP wird katalysiert durch die Farnesylpyrophosphat-Synthase (FDPS) und die Geranylgeranylpyrophosphat-Synthase (GGPPS) katalysiert die Synthese von GGPP. GGPP ist das Substrat der posttranslationalen Geranylgeranylierung kleiner GTPasen. Die Geranylgeranylierung der Rho-GTPasen wird die durch die GGTase-I katalysiert, die Geranylgeranylierung der Rab-GTPasen erfolgt durch die katalytische Wirkung der GGTase-II. Diese posttranslationale Geranylgeranylierung (-GG) der kleinen GTPasen ist kritisch für ihre Lokalisation an Membranen und somit für die optimale Funktion. GGTI-2133 ist ein spezifischer Inhibitor der GGTase-I, dessen chemische Strukturformel in dieser Abbildung dargestellt ist. 148

**Abbildung 18. Effekte der GGTase-I-Inhibition mittels GGTI-2133 in den humanen Neuroblastomazellen SH-SY5Y.** Die SH-SY5Y Zellen wurden mit jeweils 10 und 25  $\mu\text{mol/L}$  GGTI-2133 für 48 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent DMSO behandelt wurden, dienten als Kontrollen (control) für die Analysen mittels WesternBlot und HPLC-FD Methode. Die WesternBlot Analyse von Membranpräparationen (a), Cytosolpräparationen (b) und vom Gesamthomogenat (c) aus den mit GGTI-2133 behandelten SH-SY5Y Zellen wurde verwendet um die Prenylierung der Rho-GTPase Rac1 (a, b, c) zu charakterisieren. Die Proteingehalte des Membran-gebundenen geranylgeranylierten Rac1 (membrane Rac1) wurden auf den Membran-Marker Flotillin-1 normiert. Die Proteingehalte der Cytosolpräparationen (cytosol Rac1) und der Gesamthomogenate (total Rac1) wurden auf GAPDH normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei den jeweiligen Graphen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ;  $p^{**} < 0.01$ ;  $p^{***} < 0.001$ ; ns=not significant),  $n=3$  (Proteingehalte des Membran-gebundenen Rac1 in SH-SY5Y Zellen, die mit 25  $\mu\text{mol/L}$  GGTI-2133 behandelt wurden),  $n=5$  (Proteingehalte des Membran-gebundenen Rac1 in SH-SY5Y Zellen, die mit 10  $\mu\text{mol/L}$  GGTI-2133 behandelt wurden und der Kontrollen; Proteingehalte des Rac1 im Cytosol; Gesamtproteingehalt von Rac1).

150

**Abbildung 19. Effekte der GGTase-I-Inhibition mittels GGTI-2133 in den humanen Neuroblastomazellen SH-SY5Y.** Die SH-SY5Y Zellen wurden mit jeweils 10 und 25  $\mu\text{mol/L}$  GGTI-2133 für 48 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent DMSO behandelt wurden, dienten als Kontrollen (control) für die Analysen mittels WesternBlot und HPLC-FD Methode. Um Aufschluss über die Funktion der beiden GDIs RhoGDI- $\alpha$  (a) und RabGDI- $\alpha$  (b) zu erhalten, wurden diese in Cytosolpräparationen der behandelten Zellen mittels WesternBlot Analyse untersucht. Die Proteingehalte der Cytosolpräparationen (RhoGDIalpha, RabGDIalpha) wurden auf GAPDH normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei den jeweiligen Graphen dargestellt. Die Gehalte des Isoprenoids GGPP (c) wurden mittels HPLC-FD Methode quantifiziert. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^{**} < 0.01$ ;  $p^{***} < 0.001$ ; ns=not significant),  $n=5$ .

151

**Abbildung 20. Effekte der GGTase-I-Inhibition mittels GGTI-2133 in den humanen Neuroblastomazellen SH-SY5Y.** Die SH-SY5Y Zellen wurden mit jeweils 10 und 25  $\mu\text{mol/L}$  GGTI-2133 für 48 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent DMSO behandelt wurden, dienten als Kontrollen (control) für die Analysen mittels WesternBlot Methode. Die WesternBlot Analyse von Membranpräparationen (a), Cytosolpräparationen (b) und vom Gesamthomogenat (c) aus den mit GGTI-2133 behandelten SH-SY5Y Zellen wurde verwendet um die Prenylierung der Rab-GTPase Rab3A (a, b, c) zu charakterisieren. Die Proteingehalte des Membran-gebundenen geranylgeranylierten Rab3A (membrane Rab3A) wurden auf den Membran-Marker Flotillin-1 normiert. Die Proteingehalte der Cytosolpräparationen (cytosol Rab3A) und der Gesamthomogenate (total Rab3A) wurden auf GAPDH normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei den jeweiligen Graphen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test (ns=not significant),  $n=5$ .

152

**Abbildung 21. Effekte der GGTase-I-Inhibition mittels GGTI-2133 in den humanen Neuroblastomazellen SH-SY5Y.** Die SH-SY5Y Zellen wurden mit jeweils 10 und 25  $\mu\text{mol/L}$  GGTI-2133 für 48 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent DMSO behandelt wurden, dienten als Kontrollen (control) für die Analysen mittels HPLC-FD Methode. Die Gehalte der Isoprenoide GGPP (a) und FPP (b) wurden mittels HPLC-FD Methode quantifiziert. Der Cholesterolgehalt (cholesterol) in den SH-SY5Y Zellen (c) wurde enzymatisch anhand der CHOD-PAP Methode ermittelt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^{**} < 0.01$ ;  $p^{***} < 0.001$ ; ns=not significant),  $n=5$ .

153

**Abbildung 22. Proteingehalte von Synaptophysin und GAP-43 in SH-SY5Y Zellen nach der Behandlung mit GGTI-2133.** Die SH-SY5Y Zellen wurden mit jeweils 10  $\mu\text{mol/L}$  GGTI-2133 für 48 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent DMSO behandelt wurden, dienten als Kontrollen (control) für die Analysen mittels WesternBlot. Die WesternBlot Analyse der Gesamthomogenate aus den mit GGTI-2133 behandelten SH-SY5Y Zellen wurde durchgeführt um die synaptischen Marker Synaptophysin (a) und GAP-43 (b) zu bestimmen. Die Proteingehalte wurden auf GAPDH normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei den jeweiligen Graphen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ;  $p^{**} < 0.01$ ),  $n=5$ .

154

**Abbildung 23. Einfluss von 7, 8-DHF auf GGPP und Cholesterol im Hirngewebe der C57BL/6 Mäuse.** Die Analysen des Hirngewebes junger (3 Monate alter = 3), gealterter (23 Monate alter = 23) und gealterter C57BL/6 Mäuse, die mit 7, 8-DHF gefüttert wurden, diente dazu den Effekt des 7, 8-DHFs auf die Gehirnalterung zu charakterisieren. Die Gehalte des Isoprenoids GGPP (a) wurden mittels HPLC-FD Methode quantifiziert. Die Cholesterolgehalte (cholesterol) aus dem Hirngewebe der C57BL/6 Mäuse (b) wurden enzymatisch anhand der CHOD-PAP Methode ermittelt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^{**} < 0.01$ ;  $p^{***} < 0.001$ ),  $n=8$ .

156

**Abbildung 24. Proteingehalte der Rho-GTPase Rac1 im Hirngewebe der C57BL/6 Mäuse im Zuge der Fütterungsstudie mit 7, 8-DHF.** Die WesternBlot Analyse von Membranpräparationen (a) und vom Gesamthomogenat (b) aus Hirngewebe junger (3 Monate alter = 3), gealterter (23 Monate alter = 23) und gealterter C57BL/6 Mäuse, die mit 7, 8-DHF gefüttert wurden, wurde durchgeführt um die Prenylierung der Rho-GTPase Rac1 (a, b) zu charakterisieren. Die Proteingehalte des Membran-gebundenen geranylgeranylierten Rac1 (Rac1/Flotillin-1) wurden auf Flotillin-1 normiert und die Proteingehalte des Gesamthomogenates (Rac1/GAPDH) wurden auf GAPDH normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei den jeweiligen Graphen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ; ns=not significant),  $n=8$ .

157

**Abbildung 25. Proteingehalte von Rab3A, TrkB, BDNF und Tiam1 im Hirngewebe der C57BL/6 Mäuse im Zuge der Fütterungsstudie mit 7, 8-DHF.** Die WesternBlot Analyse von Membranpräparationen (a) und vom Gesamthomogenat (b, c, d) aus Hirngewebe junger (3 Monate alter = 3), gealterter (23 Monate alter = 23) und gealterter C57BL/6 Mäuse, die mit 7, 8-DHF gefüttert wurden, wurde herangezogen um neben der Prenylierung der Rab-GTPase Rab3A (a) auch den Effekt des 7, 8-DHFs auf zu charakterisieren. Die Proteingehalte des Membran-gebundenen geranylgeranylierten Rab3A (Rab3A/Flotillin-1) wurden auf Flotillin-1 normiert und die Proteingehalte des Gesamthomogenates (b, c, d) wurden auf GAPDH normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei den jeweiligen Graphen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ; ns=not significant),  $n=8$ .hen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ;  $p^{**} < 0.01$ ),  $n=5$ .

159

**Abbildung 26.  $\text{A}\beta_{1-42}$  Gehalte humaner embryonaler Nierenzellen HEK293 mit verschiedenen APP-Transfektionen.** Neben untransfizierten (ut) HEK-293 Zellen wurden die APP überexprimierenden HEK293-APP695wt (APP695-transfiziert; APP Wildtyp = APPwt) und HEK293-APPsw (APPsw-transfiziert; schwedische Mutation = sw) Zellen untersucht. Die  $\text{A}\beta_{1-42}$  Gehalte wurden mittels ELISA Methode quantifiziert und auf den Proteingehalt normiert. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ;  $p^{***} < 0.001$ ),  $n=4$ .

161

**Abbildung 27. Effekte der Beta-Sekretase-Inhibition mittels  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV auf die  $A\beta_{1-42}$  Gehalte humaner embryonaler Nierenzellen mit verschiedenen APP-Transfektionen.** Neben untransfizierten (ut) HEK-293 Zellen, die als Kontroll-Zelllinie verwendet wurden, wurden die APP überexprimierenden HEK293-APP695wt (APP695-transfiziert; APP Wildtyp = APPwt) und HEK293-APPsw (APPsw-transfiziert; schwedische Mutation = sw) Zellen untersucht. Die HEK Zellen wurden mit jeweils 1  $\mu\text{mol/L}$   $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt ( $\beta$  = mit  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV behandelte Zellen). Zellen, die mit dem Solvent DMSO behandelt wurden, dienten als Kontrollen (c = control) für die Analysen. Die  $A\beta_{1-42}$  Gehalte wurden mittels ELISA Methode quantifiziert und auf den Proteingehalt normiert. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ;  $p^{***} < 0.001$ ; ns=not significant), n=4. **162**

**Abbildung 28. Effekte der Gamma-Sekretase-Inhibition mittels DAPT auf die  $A\beta_{1-42}$  Gehalte humaner embryonaler Nierenzellen mit verschiedenen APP-Transfektionen.** Neben untransfizierten (ut) HEK-293 Zellen, die als Kontroll-Zelllinie verwendet wurden, wurden die APP überexprimierenden HEK293-APP695wt (APP695-transfiziert; APP Wildtyp = APPwt) und HEK293-APPsw (APPsw-transfiziert; schwedische Mutation = sw) Zellen untersucht. Die HEK Zellen wurden mit jeweils 1  $\mu\text{mol/L}$  DAPT für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt (DAPT = mit DAPT behandelte Zellen). Zellen, die mit dem Solvent DMSO behandelt wurden, dienten als Kontrollen (c = control) für die Analysen. Die  $A\beta_{1-42}$  Gehalte wurden mittels ELISA Methode quantifiziert und auf den Proteingehalt normiert. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ;  $p^{**} < 0.01$ ;  $p^{***} < 0.001$ ; ns=not significant), n=4. **163**

**Abbildung 29. Effekte der Gamma-Sekretase-Inhibition mittels DAPT in humanen embryonalen Nierenzellen mit verschiedenen APP-Transfektionen.** Neben untransfizierten (ut) HEK-293 Zellen, die als Kontroll-Zelllinie verwendet wurden, wurden die APP überexprimierenden HEK293-APP695wt (APP695-transfiziert; APP Wildtyp = APPwt) und HEK293-APPsw (APPsw-transfiziert; schwedische Mutation = sw) Zellen untersucht. Die HEK293 Zellen wurden mit jeweils 1  $\mu\text{mol/L}$  DAPT (D) für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent DMSO behandelt wurden, dienten als Kontrollen (c = control) für die Analysen mittels WesternBlot Methode. Die WesternBlot Analyse von Membranpräparationen (M) und von Cytosolpräparationen (C) aus den mit DAPT behandelten HEK-ut, HEK-APPwt und HEK-sw Zellen wurde verwendet um die Prenylierung der GTPasen Rac1, H-Ras, RhoA, Cdc42 und Rab3A zu charakterisieren. Die Proteingehalte der Membran-gebundenen GTPasen wurden auf den Membran-Marker Flotillin-1 normiert. Die Proteingehalte der Cytosolpräparationen wurden auf GAPDH normiert. Repräsentative Ausschnitte der WesternBlots sind in der Abbildung dargestellt um die Lokalisation der GTPasen mit und ohne DAPT-Behandlung zu verdeutlichen. **165**

**Abbildung 30. Effekte der Gamma-Sekretase-Inhibition mittels DAPT auf die Rac1-Gehalte in humanen embryonalen Nierenzellen mit verschiedenen APP-Transfektionen.**

Neben untransfizierten (ut) HEK-293 Zellen, die als Kontroll-Zelllinie verwendet wurden, wurden die APP überexprimierenden HEK293-APP695wt (APP695-transfiziert; APP Wildtyp = APPwt) und HEK293-APPsw (APPsw-transfiziert; schwedische Mutation = sw) Zellen untersucht. Die HEK Zellen wurden mit jeweils 1  $\mu\text{mol/L}$  DAPT für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent DMSO behandelt wurden, dienten als Kontrollen (c = control) für die Analysen mittels WesternBlot Methode. Die WesternBlot Analyse von Gesamthomogenat (a), Membranpräparationen (b) und von Cytosolpräparationen (c) aus den mit DAPT behandelten HEK-ut, HEK-APPwt und HEK-sw Zellen wurde verwendet um die Prenylierung der Rho-GTPase Rac1 (a, b, c) zu charakterisieren. Die Proteingehalte des Membran-gebundenen geranylgeranylierten Rac1 wurden auf den Membran-Marker Flotillin-1 normiert. Die Proteingehalte der Cytosolpräparationen und die Gesamthomogenate wurden auf GAPDH normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei den jeweiligen Graphen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ;  $p^{**} < 0.01$ ; ns=not significant), n=4. **167**

**Abbildung 31. Effekte der Gamma-Sekretase-Inhibition mittels DAPT auf die RhoA-Gehalte in humanen embryonalen Nierenzellen mit verschiedenen APP-Transfektionen.**

Neben untransfizierten (ut) HEK-293 Zellen, die als Kontroll-Zelllinie verwendet wurden, wurden die APP überexprimierenden HEK293-APP695wt (APP695-transfiziert; APP Wildtyp = APPwt) und HEK293-APPsw (APPsw-transfiziert; schwedische Mutation = sw) Zellen untersucht. Die HEK Zellen wurden mit jeweils 1  $\mu\text{mol/L}$  DAPT für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent DMSO behandelt wurden, dienten als Kontrollen (c = control) für die Analysen mittels WesternBlot Methode. Die WesternBlot Analyse von Gesamthomogenat (a), Membranpräparationen (b) und von Cytosolpräparationen (c) aus den mit DAPT behandelten HEK-ut, HEK-APPwt und HEK-sw Zellen wurde verwendet um die Prenylierung der Rho-GTPase RhoA (a, b, c) zu charakterisieren. Die Proteingehalte des Membran-gebundenen geranylgeranylierten RhoA wurden auf den Membran-Marker Flotillin-1 normiert. Die Proteingehalte der Cytosolpräparationen und die Gesamthomogenate wurden auf GAPDH normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei den jeweiligen Graphen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ;  $p^{**} < 0.01$ ; ns=not significant), n=4. **169**

**Abbildung 32. Effekte der Gamma-Sekretase-Inhibition mittels DAPT auf die cdc42-Gehalte in humanen embryonalen Nierenzellen mit verschiedenen APP-Transfektionen.**

Neben untransfizierten (ut) HEK-293 Zellen, die als Kontroll-Zelllinie verwendet wurden, wurden die APP überexprimierenden HEK293-APP695wt (APP695-transfiziert; APP Wildtyp = APPwt) und HEK293-APPsw (APPsw-transfiziert; schwedische Mutation = sw) Zellen untersucht. Die HEK Zellen wurden mit jeweils 1  $\mu\text{mol/L}$  DAPT für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent DMSO behandelt wurden, dienten als Kontrollen (c = control) für die Analysen mittels WesternBlot Methode. Die WesternBlot Analyse von Gesamthomogenat (a), Membranpräparationen (b) und von Cytosolpräparationen (c) aus den mit DAPT behandelten HEK-ut, HEK-APPwt und HEK-sw Zellen wurde verwendet um die Prenylierung der Rho-GTPase cdc42 (a, b, c) zu charakterisieren. Die Proteingehalte des Membran-gebundenen geranylgeranylierten cdc42 wurden auf den Membran-Marker Flotillin-1 normiert. Die Proteingehalte der Cytosolpräparationen und die Gesamthomogenate wurden auf GAPDH normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei den jeweiligen Graphen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^{**} < 0.01$ ;  $p^{***} < 0.001$ ; ns=not significant), n=4. **171**

**Abbildung 33. Effekte der Gamma-Sekretase-Inhibition mittels DAPT auf die H-Ras-Gehalte in humanen embryonalen Nierenzellen mit verschiedenen APP-Transfektionen.** Neben untransfizierten (ut) HEK-293 Zellen, die als Kontroll-Zelllinie verwendet wurden, wurden die APP überexprimierenden HEK293-APP695wt (APP695-transfiziert; APP Wildtyp = APPwt) und HEK293-APPsw (APPsw-transfiziert; schwedische Mutation = sw) Zellen untersucht. Die HEK Zellen wurden mit jeweils 1  $\mu\text{mol/L}$  DAPT für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent DMSO behandelt wurden, dienten als Kontrollen (c = control) für die Analysen mittels WesternBlot Methode. Die WesternBlot Analyse von Gesamthomogenat (a), Membranpräparationen (b) und von Cytosolpräparationen (c) aus den mit DAPT behandelten HEK-ut, HEK-APPwt und HEK-sw Zellen wurde verwendet um die Prenylierung der Ras-GTPase H-Ras (a, b, c) zu charakterisieren. Die Proteingehalte des Membran-gebundenen prenylierten H-Ras wurden auf den Membran-Marker Flotillin-1 normiert. Die Proteingehalte der Cytosolpräparationen und die Gesamthomogenate wurden auf GAPDH normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei den jeweiligen Graphen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ;  $p^{***} < 0.001$ ; ns=not significant), n=4. **173**

**Abbildung 34. Effekte der Gamma-Sekretase-Inhibition mittels DAPT auf die Rab3A-Gehalte in humanen embryonalen Nierenzellen mit verschiedenen APP-Transfektionen.** Neben untransfizierten (ut) HEK-293 Zellen, die als Kontroll-Zelllinie verwendet wurden, wurden die APP überexprimierenden HEK293-APP695wt (APP695-transfiziert; APP Wildtyp = APPwt) und HEK293-APPsw (APPsw-transfiziert; schwedische Mutation = sw) Zellen untersucht. Die HEK Zellen wurden mit jeweils 1  $\mu\text{mol/L}$  DAPT für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent DMSO behandelt wurden, dienten als Kontrollen (c = control) für die Analysen mittels WesternBlot Methode. Die WesternBlot Analyse von Gesamthomogenat (a), Membranpräparationen (b) und von Cytosolpräparationen (c) aus den mit DAPT behandelten HEK-ut, HEK-APPwt und HEK-sw Zellen wurde verwendet um die Prenylierung der Rab-GTPase Rab3A (a, b, c) zu charakterisieren. Die Proteingehalte des Membran-gebundenen prenylierten Rab3A wurden auf den Membran-Marker Flotillin-1 normiert. Die Proteingehalte der Cytosolpräparationen und die Gesamthomogenate wurden auf GAPDH normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei den jeweiligen Graphen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test (ns=not significant), n=4. **175**

**Abbildung 35. Effekte der Gamma-Sekretase-Inhibition mittels DAPT auf die Gehalte der Isoprenoide FPP und GGPP, sowie auf die Cholesterolgehalte in humanen embryonalen Nierenzellen mit verschiedenen APP-Transfektionen.** Neben untransfizierten (ut) HEK-293 Zellen, die als Kontroll-Zelllinie verwendet wurden, wurden die APP überexprimierenden HEK293-APP695wt (APP695-transfiziert; APP Wildtyp = APPwt) und HEK293-APPsw (APPsw-transfiziert; schwedische Mutation = sw) Zellen untersucht. Die HEK Zellen wurden mit jeweils 1  $\mu\text{mol/L}$  DAPT für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent DMSO behandelt wurden, dienten als Kontrollen (c = control) für die Analysen mittels HPLC-FD Methode. Die Gehalte der Isoprenoide FPP (a) und GGPP (b) wurden mittels HPLC-FD Methode quantifiziert. Die Cholesterolgehalte (cholesterol) aus den mit DAPT behandelten HEK-Zellen (c) wurden enzymatisch anhand der CHOD-PAP Methode ermittelt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^{**} < 0.01$ ;  $p^{***} < 0.001$ ; ns=not significant), n=8. **177**

**Abbildung 36. Effekte der Beta-Sekretase-Inhibition mittels  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV auf die Rac1-Gehalte in humanen embryonalen Nierenzellen mit verschiedenen APP-Transfektionen.** Neben untransfizierten (ut) HEK-293 Zellen, die als Kontroll-Zelllinie verwendet wurden, wurden die APP überexprimierenden HEK293-APP695wt (APP695-transfiziert; APP Wildtyp = APPwt) und HEK293-APPsw (APPsw-transfiziert; schwedische Mutation = sw) Zellen untersucht. Die HEK Zellen wurden mit jeweils 1  $\mu\text{mol/L}$   $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent DMSO behandelt wurden, dienten als Kontrollen (c = control) für die Analysen mittels WesternBlot Methode. Die WesternBlot Analyse von Gesamthomogenat (a) und Membranpräparationen (b) aus den mit  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV behandelten HEK-ut, HEK-APPwt und HEK-sw Zellen wurde verwendet um die Prenylierung der Rho-GTPase Rac1 (a, b) zu charakterisieren. Die Proteingehalte des Membran-gebundenen prenylierten Rac1 wurden auf den Membran-Marker Flotillin-1 normiert. Die Proteingehalte der Gesamthomogenate wurden auf GAPDH normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei den jeweiligen Graphen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ;  $p^{**} < 0.01$ ; ns=not significant),  $n=4$ . 184

**Abbildung 37. Effekte der Beta-Sekretase-Inhibition mittels  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV auf die H-Ras-Gehalte in humanen embryonalen Nierenzellen mit verschiedenen APP-Transfektionen.** Neben untransfizierten (ut) HEK-293 Zellen, die als Kontroll-Zelllinie verwendet wurden, wurden die APP überexprimierenden HEK293-APP695wt (APP695-transfiziert; APP Wildtyp = APPwt) und HEK293-APPsw (APPsw-transfiziert; schwedische Mutation = sw) Zellen untersucht. Die HEK Zellen wurden mit jeweils 1  $\mu\text{mol/L}$   $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent DMSO behandelt wurden, dienten als Kontrollen (c = control) für die Analysen mittels WesternBlot Methode. Die WesternBlot Analyse von Gesamthomogenat (a) und Membranpräparationen (b) aus den mit  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV behandelten HEK-ut, HEK-APPwt und HEK-sw Zellen wurde verwendet um die Prenylierung der Ras-GTPase H-Ras (a, b) zu charakterisieren. Die Proteingehalte des Membran-gebundenen prenylierten H-Ras wurden auf den Membran-Marker Flotillin-1 normiert. Die Proteingehalte der Gesamthomogenate wurden auf GAPDH normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei den jeweiligen Graphen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ;  $p^{***} < 0.001$ ; ns=not significant),  $n=4$ . 185

**Abbildung 38. Effekte der Beta-Sekretase-Inhibition mittels  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV auf die Rab3A-Gehalte in humanen embryonalen Nierenzellen mit verschiedenen APP-Transfektionen.** Neben untransfizierten (ut) HEK-293 Zellen, die als Kontroll-Zelllinie verwendet wurden, wurden die APP überexprimierenden HEK293-APP695wt (APP695-transfiziert; APP Wildtyp = APPwt) und HEK293-APPsw (APPsw-transfiziert; schwedische Mutation = sw) Zellen untersucht. Die HEK Zellen wurden mit jeweils 1  $\mu\text{mol/L}$   $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent DMSO behandelt wurden, dienten als Kontrollen (c = control) für die Analysen mittels WesternBlot Methode. Die WesternBlot Analyse von Gesamthomogenat (a) und Membranpräparationen (b) aus den mit  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV behandelten HEK-ut, HEK-APPwt und HEK-sw Zellen wurde verwendet um die Prenylierung der Rab-GTPase Rab3A (a, b) zu charakterisieren. Die Proteingehalte des Membran-gebundenen prenylierten Rab3A wurden auf den Membran-Marker Flotillin-1 normiert. Die Proteingehalte der Gesamthomogenate wurden auf GAPDH normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei den jeweiligen Graphen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test (ns=not significant),  $n=4$ . 186



**Abbildung 39. Effekte der Beta-Sekretase-Inhibition mittels  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV auf die Gehalte der Isoprenoide FPP und GGPP, sowie auf die Cholesterol-Gehalte in humanen embryonalen Nierenzellen mit verschiedenen APP-Transfektionen.** Neben untransfizierten (ut) HEK-293 Zellen, die als Kontroll-Zelllinie verwendet wurden, wurden die APP überexprimierenden HEK293-APP695wt (APP695-transfiziert; APP Wildtyp = APPwt) und HEK293-APPsw (APPsw-transfiziert; schwedische Mutation = sw) Zellen untersucht. Die HEK Zellen wurden mit jeweils 1  $\mu\text{mol/L}$   $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent DMSO behandelt wurden, dienten als Kontrollen (c = control) für die Analysen. Die Gehalte der Isoprenoide FPP (a) und GGPP (b) wurden mittels HPLC-FD Methode quantifiziert. Die Cholesterolgehalte (cholesterol) aus den mit  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV behandelten HEK-Zellen (c) wurden enzymatisch anhand der CHOD-PAP Methode ermittelt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^{**}<0.01$ ;  $p^{***}<0.001$ ; ns=not significant), n=8. 188

**Abbildung 40. Effekte von oligomerisiertem A $\beta$  in humanen embryonalen Nierenzellen.** Für die Untersuchungen wurden untransfizierten (ut) HEK-293 Zellen verwendet. Die HEK-293 Zellen wurden mit jeweils 0.01  $\mu\text{mol/L}$  oligomerisiertem A $\beta$  für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent DMSO behandelt wurden, dienten als Kontrollen (c = control) für die Analysen. Die Gehalte der Isoprenoide FPP (a) und GGPP (b) wurden mittels HPLC-FD Methode quantifiziert. Die Cholesterolgehalte (cholesterol) aus den mit oligomerisiertem A $\beta$  behandelten HEK-293 Zellen (c) wurden enzymatisch anhand der CHOD-PAP Methode ermittelt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^{*}<0.05$ ; ns=not significant), n=8. 192

**Abbildung 41. Verkürzter Mevalonat-/Isoprenoid-/Cholesterol-Biosyntheseweg.** Der Mevalonatweg ist ein entscheidender Stoffwechselprozess in eukaryotischen Zellen. Hierbei stellt das Mevalonat den Präkursor verschiedener Intermediate wie dem Farnesylpyrophosphat (FPP), dem Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) und dem Cholesterol dar. Der Geschwindigkeits-bestimmende Schritt dieses Biosyntheseweges ist die synthese von Mevalonat und wird katalysiert durch die HMG-CoA-Reduktase. Statine, wie beispielsweise Lovastatin, sind HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren und in der Lage diesen Geschwindigkeits-bestimmende Schritt zu inhibieren. GGPP ist das Substrat der posttranslationalen Geranylgeranylierung kleiner Rho-GTPasen, die durch die GGTase-I katalysiert wird. Die FTase farnesyliert die Ras-GTPasen mit dem FPP-Rest. Diese posttranslationalen Modifikationen der kleinen GTPasen sind kritisch für ihre Lokalisation an Membranen und somit für die optimale Funktion. 194

**Abbildung 42. Migration und Invasion der U87 Zellen nach der Behandlung mit Lovastatin (LOV).** Die U87 Zellen (a und b) wurden mit jeweils 10  $\mu\text{mol/L}$  LOV für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent Ethanol behandelt wurden, dienten als Kontrollen (control) für den Migrations- und Invasions-Assay. Der Scratch Assay (cells) wurde nach 8 Stunden der Behandlung durchgeführt um die Zellmigration der U87 Zellen (a) zu analysieren. Die Bilder wurden einmal direkt vor und 16 Stunden nach dem Scratch aufgenommen. Der Invasions-Assay (invaded cells) der U87 Zellen (b) wurde mittels eines modifizierten Boyden Chamber Assays durchgeführt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^{**}<0.01$ ;  $p^{***}<0.001$ ), n=4. 197

**Abbildung 43. Migration und Invasion der U343 Zellen nach der Behandlung mit Lovastatin (LOV).** Die U343 Zellen (a und b) wurden mit jeweils 10 µmol/L LOV für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent Ethanol behandelt wurden, dienten als Kontrollen (control) für den Migrations- und Invasions-Assay. Der Scratch Assay (cells) wurde nach 8 Stunden der Behandlung durchgeführt um die Zellmigration der U343 Zellen (a) zu analysieren. Die Bilder wurden einmal direkt vor und 16 Stunden nach dem Scratch aufgenommen. Der Invasions-Assay (invaded cells) der U343 Zellen (b) wurde mittels eines modifizierten Boyden Chamber Assays durchgeführt. Mittelwert ± SEM, ungepaarter t-Test ( $p^{**}<0.01$ ;  $p^{***}<0.001$ ),  $n=4$ . **198**

**Abbildung 44. Migration und Invasion der U87 Zellen nach der Behandlung mit Perillylalkohol (POH).** Die U87 Zellen (a und b) wurden mit jeweils 250 µmol/L POH für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent Ethanol behandelt wurden, dienten als Kontrollen (control) für den Migrations- und Invasions-Assay. Der Scratch Assay (cells) wurde nach 8 Stunden der Behandlung durchgeführt um die Zellmigration der U87 Zellen (a) zu analysieren. Die Bilder wurden einmal direkt vor und 16 Stunden nach dem Scratch aufgenommen. Der Invasions-Assay (invaded cells) der U87 Zellen (b) wurde mittels eines modifizierten Boyden Chamber Assays durchgeführt. Mittelwert ± SEM, ungepaarter t-Test ( $p^{***}<0.001$ ),  $n=4$ . **199**

**Abbildung 45. Migration und Invasion der U343 Zellen nach der Behandlung mit Perillylalkohol (POH).** Die U343 Zellen (a und b) wurden mit jeweils 250 µmol/L POH für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent Ethanol behandelt wurden, dienten als Kontrollen (control) für den Migrations- und Invasions-Assay. Der Scratch Assay (cells) wurde nach 8 Stunden der Behandlung durchgeführt um die Zellmigration der U343 Zellen (a) zu analysieren. Die Bilder wurden einmal direkt vor und 16 Stunden nach dem Scratch aufgenommen. Der Invasions-Assay (invaded cells) der U343 Zellen (b) wurde mittels eines modifizierten Boyden Chamber Assays durchgeführt. Mittelwert ± SEM, ungepaarter t-Test ( $p^{*}<0.05$ ;  $p^{***}<0.001$ ),  $n=4$ . **200**

**Abbildung 46. Proliferation der U87 und U343 Zellen nach der Behandlung mit Lovastatin (LOV).** Die U87 Zellen (a und c) und die U343 Zellen (b und d) wurden mit jeweils 10 µmol/L LOV für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent Ethanol behandelt wurden, dienten als Kontrollen (control) für den MTT- und Kristallviolett-Assay. Der MTT-Assay (MTT-reduction) wurde verwendet um die Zellproliferation nach der Behandlung mit Lovastatin (a, b) in U87 und U343 Zellen zu analysieren. Die MTT-Aktivität wurde photometrisch gemessen. Der Kristallviolett-Assay (absorption) der U87 und U343 Zellen, die mit LOV (c, d) behandelt wurden, charakterisierte ebenfalls die Zellproliferation. Nach den angegebenen Behandlungen wurden die Zellen gefärbt und photometrisch vermessen. Mittelwert ± SEM, ungepaarter t-Test ( $p^{*}<0.05$ ;  $p^{**}<0.01$ ;  $p^{***}<0.001$ ),  $n=15$  (MTT-Assay),  $n=9$  (Kristallviolett-Assay). **201**

**Abbildung 47. Proliferation der U87 und U343 Zellen nach der Behandlung mit Perillylalkohol (POH).** Die U87 Zellen (a und c) und die U343 Zellen (b und d) wurden mit jeweils 250  $\mu\text{mol/L}$  POH für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent Ethanol behandelt wurden, dienten als Kontrollen (control) für den MTT- und Kristallviolett-Assay. Der MTT-Assay (MTT-reduction) wurde verwendet um die Zellproliferation nach der Behandlung mit Perillylalkohol (a, b) in U87 und U343 Zellen zu analysieren. Die MTT-Aktivität wurde photometrisch gemessen. Der Kristallviolett-Assay (absorption) der U87 und U343 Zellen, die mit POH (c, d) behandelt wurden, charakterisierte ebenfalls die Zellproliferation. Nach den angegebenen Behandlungen wurden die Zellen gefärbt und photometrisch vermessen. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ),  $n=15$  (MTT-Assay),  $n=9$  (Kristallviolett-Assay). **202**

**Abbildung 48. Proteingehalte des phosphorylierten ERK (p-ERK) und des gesamten Proteins ERK (t-ERK) in U87 und U343 Zellen nach der Behandlung mit Lovastation (LOV) und Perillylalkohol (POH).** Die U87 Zellen (a) und die U343 Zellen (b) wurden mit jeweils 10  $\mu\text{mol/L}$  LOV für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Die U87 Zellen (c) und die U343 Zellen (d) wurden mit jeweils 250  $\mu\text{mol/L}$  POH für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent Ethanol behandelt wurden, dienten als Kontrollen (control = c) für die WesternBlot Analyse. Der WesternBlot Analyse des phosphorylierten ERK (p-ERK) und des Gesamtproteins ERK (t-ERK) wurden bei den U87 Zellen (a, c) und U343 Zellen (b, d) durchgeführt, um die ERK-Aktivierung zu analysieren. Die Graphen zeigen das Verhältnis zwischen p-ERK und t-ERK der U87 und U343 Zellen nach der Behandlung mit LOV und POH. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind dargestellt. Die Gehalte von p-ERK und t-ERK wurden auf GAPDH normiert. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ),  $n=5$ . **203**

**Abbildung 49. Effekte von Lovastatin (LOV) auf die zelluläre Lokalisation der Proteine H-Ras und Rac1 in U87 Zellen.** Die U87 Zellen (a, b, c und d) wurden mit jeweils 10  $\mu\text{mol/L}$  LOV für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent Ethanol behandelt wurden, dienten als Kontrollen (control = c) für die WesternBlot Analyse. Die WesternBlot Analyse von Präparationen des Cytosols (cytosol) und der Membranfraktion (membrane) wurden durchgeführt um die Prenylierung von H-Ras (a, c) und Rac1 (b, d) zu untersuchen. Die WesternBlots der cytosolischen Fraktionen wurden auf GAPDH normiert, die WesternBlots der Membranfraktionen wurden auf Flotillin-1 normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei den jeweiligen Graphen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ;  $p^{***} < 0.001$ ; ns=not significant),  $n=5$ . **205**

**Abbildung 50. Effekte von Lovastatin (LOV) auf die zelluläre Lokalisation der Proteine H-Ras und Rac1 in U343 Zellen.** Die U343 Zellen (a, b, c und d) wurden mit jeweils 10  $\mu\text{mol/L}$  LOV für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent Ethanol behandelt wurden, dienten als Kontrollen (control = c) für die WesternBlot Analyse. Die WesternBlot Analyse von Präparationen des Cytosols (cytosol) und der Membranfraktion (membrane) wurden durchgeführt um die Prenylierung von H-Ras (a, c) und Rac1 (b, d) zu untersuchen. Die WesternBlots der cytosolischen Fraktionen wurden auf GAPDH normiert, die WesternBlots der Membranfraktionen wurden auf Flotillin-1 normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei den jeweiligen Graphen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ;  $p^{**} < 0.01$ ),  $n=5$ . **206**

**Abbildung 51. Effekte von Perillylalkohol (POH) auf die zelluläre Lokalisation der Proteine H-Ras und Rac1 in U87 Zellen.** Die U87 Zellen wurden mit jeweils 250  $\mu\text{mol/L}$  POH für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent Ethanol behandelt wurden, dienten als Kontrollen (control = c) für die WesternBlot Analyse. Die WesternBlot Analyse von Präparationen des Cytosols (a, b; cytosol) und der Mebranfraktion (c, d; membrane) wurden durchgeführt um die Prenylierung von H-Ras (a, c) und Rac1 (b, d) zu untersuchen. Die WesternBlots der cytosolischen Fraktionen wurden auf GAPDH normiert, die WesternBlots der Mebranfraktionen wurden auf Flotillin-1 normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei den jeweiligen Graphen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ; ns=not significant), n=5. **207**

**Abbildung 52. Effekte von Perillylalkohol (POH) auf die zelluläre Lokalisation der Proteine H-Ras und Rac1 in U343 Zellen.** Die U343 Zellen wurden mit jeweils 250  $\mu\text{mol/L}$  POH für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent Ethanol behandelt wurden, dienten als Kontrollen (control = c) für die WesternBlot Analyse. Die WesternBlot Analyse von Präparationen des Cytosols (a, b; cytosol) und der Mebranfraktion (c, d; membrane) wurden durchgeführt um die Prenylierung von H-Ras (a, c) und Rac1 (b, d) zu untersuchen. Die WesternBlots der cytosolischen Fraktionen wurden auf GAPDH normiert, die WesternBlots der Mebranfraktionen wurden auf Flotillin-1 normiert. Representative Ausschnitte der WesternBlots sind bei den jeweiligen Graphen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ; ns=not significant), n=5. **208**

**Abbildung 53. Effekte von Lovastatin (LOV) auf die Intermediate des Mevalonatweges FPP, GGPP und Cholesterol in U87 und U343 Zellen.** Die U87 Zellen (a, c und e) und die U343 Zellen (b, d und f) wurden mit jeweils 10  $\mu\text{mol/L}$  LOV für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent Ethanol behandelt wurden, dienten als Kontrollen (control) für die HPLC-FD und die CHOD-PAP Analyse. FPP (a, b) und GGPP (c, d) wurden mittels HPLC-FD Analyse quantifiziert. Die Cholesterolgehalte (cholesterol) in U87 Zellen (e) und U343 Zellen (f) wurden enzymatisch anhand der CHOD-PAP Methode ermittelt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ;  $p^{**} < 0.01$ ;  $p^{***} < 0.001$ ), n=6. **209**

**Abbildung 54. Effekte von Perillylalkohol (POH) auf die Intermediate des Mevalonatweges FPP, GGPP und Cholesterol in U87 und U343 Zellen.** Die U87 Zellen (a, c und e) und die U343 Zellen (b, d und f) wurden mit jeweils 250  $\mu\text{mol/L}$  POH für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Zellen, die mit dem Solvent Ethanol behandelt wurden, dienten als Kontrollen (control) für die HPLC-FD und die CHOD-PAP Analyse. FPP (a, b) und GGPP (c, d) wurden mittels HPLC-FD Analyse quantifiziert. Die Cholesterolgehalte (cholesterol) in U87 Zellen (e) und U343 Zellen (f) wurden enzymatisch anhand der CHOD-PAP Methode ermittelt. Mittelwert  $\pm$  SEM, ungepaarter t-Test ( $p^* < 0.05$ ; ns=not significant), n=6. **210**

**Abbildung 55. Zusammenfassendes Schema des Zusammenhangs der Rho-**

**GTPasen und der GGTase-I.** Rho-GTPasen werden durch die Transferase GGTase-I geranylgeranyliert. Ihre Prenylierung ist essentiell für ihre Lokalisation an Membranen, dem Ort ihrer Aktivierung und Funktion. Die Gehalte an GGPP in Hirngewebe gealterter (23 Monate alten) C57BL/6 Mäuse wiesen im Vergleich zu den jungen (3 Monate alten) Mäusen eine Erhöhung auf. Auch die mit dem GGTase-I-Inhibitor GGTI-2133 behandelten SH-SY5Y Zellen enthielten erhöhte Gehalte an GGPP. Jedoch blieben in beiden Studien die Gesamtgehalte (Homogenat) der Proteine Rac1, RhoA und Cdc42 unverändert. Interessanter Weise waren die Gehalte der Membran-gebundenen prenylierten Rho-GTPasen erniedrigt in alten Mäusehirnen und SH-SY5Y Zellen, die mit GGTI-2133 behandelt wurden. Diese Ergebnisse korrelieren direkt mit der Reduktion der reaktiven GGTase-Aktivität, der Protein- und mRNA-Expression der GGTase-I $\beta$ . In einem weiteren Tiermodell, den NMRI Mäusen, war die Enzymaktivität der GGTase-I ebenfalls erniedrigt im Hirngewebe der gealterten (23 Monate alten) Mäuse, im Vergleich zu den jungen (3 Monate alten) Kontrolltieren. Hier konnte die Aktivität der GGTase-I durch den spezifischen GGTase-I-Inhibitor GGTI-286 in beiden Altersgruppen signifikant gesenkt werden. Da Rac1, RhoA und Cdc42 mit der Synaptogenese assoziiert sind, wurden die Gehalte der beiden synaptischen Markerproteine Synaptophysin und GAP43 analysiert. Bei diesen Analysen konnte eine altersbezogene Senkung von Synaptophysin und GAP43 im Hirngewebe der Mäuse festgestellt werden. Die Proteingehalte von Synaptophysin und GAP43 waren ebenfalls in dem in vitro Modell reduziert. Die gestörte Regulation der Rho-GTPasen im gealterten Gehirn ist also assoziiert mit einem spezifischen Defizit der GGTase-I $\beta$ , welches möglicherweise eine der Ursachen für das Defizit des neuronalen Auswuchses darstellt.

218

**Abbildung 56. Vereinfachter Signalweg über die Regulation der Migration und**

**Proliferation in GBM.** Inaktive GDP-gebundene Ras-GTPasen werden bevorzugt mit FPP durch die Farnesyltransferase (FTase) prenyliert. Diese Prenylierung ist notwendig für die Insertion in der Membran, wo die GTPase durch GEFs (guanine nucleotide exchange factors) aktiviert wird. Die GEFs selbst werden aufgrund der Bindung eines Wachstumsfaktors (growth factor = GF) an einen adequate Rezeptor aktiviert. Die Aktivierung der GDP-gebundenen GTPase resultiert aus der Phosphorylierung zur GTP-gebundenen Form. Die aktive GTPase kann durch diverse GAPs (GTPase-activating proteins) deaktiviert werden. Die aktiven Ras-GTPasen, besonders H-Ras, können nachgeschaltete Signalkaskaden unter anderem über Raf, MEK und ERK aktivieren, die letztendlich zu einer gesteigerten Proliferation und Migration führen. Rac-GTPasen, wie beispielsweise Rac1, werden bevorzugt mit GGPP durch die Geranylgeranyltransferase-I (GGTase-I) prenyliert. Der spezifische Rac1 GEF Tiam1 zum Beispiel kann entweder durch die Bindung eines Wachstumsfaktors an den spezifischen Rezeptor (Bindung von BDNF an den TrkB-Rezeptor) oder durch eine aktivierte Ras-GTPase aktiviert werden. Das aktive Membran-gebundene Rac1-GTP ist in der Lage weitere Rho-GTPasen zu aktivieren und hat dadurch Prozesse der Organisation des Cytoskeletts und der Migration zur Folge. Außerdem ist das aktive Rac1-GTP im Stande über die Aktivierung der PAK (p21-activated kinase) den Raf/MEK/ERK Signalweg zu aktivieren und so zu einer erhöhten Proliferation und Migration zu führen.

237

## Tabellenverzeichnis

**Tabelle 1** Mittlere inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) ausgewählter peptidomimetischer GGase-I-Inhibitoren auf die GGase-I, die FTase und verschiedene kleine GTPasen nach Qian et al. und Vasudevan et al. (Qian, Vogt, Vasudevan, Sebti, & Hamilton, 1998; Vasudevan et al., 1999). (nd = nicht definiert). 147

**Tabelle 2:** Zusammenfassung der Ergebnisse des Vergleichs der Gehalte der Proteine Rac1, RhoA, Cdc42, H-Ras und Rab3A in verschiedenen zellulären Präparationen (Gesamthomogenat, Membran- und Cytosolpräparation) und der Isoprenoide FPP und GGPP, sowie auf die Cholesterol-Gehalte in humanen embryonalen Nierenzellen mit verschiedenen APP-Transfektionen. Neben untransfizierten HEK-293 Zellen, wurden die APP überexprimierenden HEK293-APP695wt (APP695-transfiziert; APP Wildtyp = APPwt) und HEK293-APPsw (APPsw-transfiziert; schwedische Mutation = sw) Zellen untersucht. Die Effekte beziehen sich auf den Vergleich mit den untransfizierten HEK-293 Zellen, die als Kontroll-Zellen fungierten. ê steht für eine Reduktion, é steht für eine Erhöhung und = steht für keinen Unterschied im Vergleich zu den untransfizierten HEK-293 Zellen. Die Angaben der Effekte beziehen sich auf den Vergleich mit den untransfizierten HEK-293 Zellen. 180

**Tabelle 3:** Zusammenfassung der Ergebnisse der Effekte der  $\gamma$ -Sekretase-Inhibition mittels DAPT auf die Gehalte der Proteine Rac1, RhoA, Cdc42, H-Ras und Rab3A und der Isoprenoide FPP und GGPP, sowie auf die Cholesterol-Gehalte in humanen embryonalen Nierenzellen mit verschiedenen APP-Transfektionen. Neben untransfizierten (ut) HEK-293 Zellen, wurden die APP überexprimierenden HEK293-APP695wt (APP695-transfiziert; APP Wildtyp = APPwt) und HEK293-APPsw (APPsw-transfiziert; schwedische Mutation = sw) Zellen untersucht. Die HEK Zellen wurden mit jeweils 1  $\mu\text{mol/L}$   $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Die Effekte beziehen sich auf die jeweiligen Kontroll-Zellen, die mit dem Solvent DMSO behandelt wurden. ê steht für eine Reduktion und = steht für keinen Effekt. Die Angaben der Effekte beziehen sich auf den Vergleich mit der jeweils gleichen unbehandelten Zelllinie. 182

**Tabelle 4:** Zusammenfassung der Ergebnisse der Effekte der Beta-Sekretase-Inhibition mittels  $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV auf die Gehalte der Proteine Rac1, H-Ras und Rab3A und der Isoprenoide FPP und GGPP, sowie auf die Cholesterol-Gehalte in humanen embryonalen Nierenzellen mit verschiedenen APP-Transfektionen. Neben untransfizierten (ut) HEK-293 Zellen, wurden die APP überexprimierenden HEK293-APP695wt (APP695-transfiziert; APP Wildtyp = APPwt) und HEK293-APPsw (APPsw-transfiziert; schwedische Mutation = sw) Zellen untersucht. Die HEK Zellen wurden mit jeweils 1  $\mu\text{mol/L}$   $\beta$ -Sekretase-Inhibitor IV für 24 Stunden in Serum-freiem Medium behandelt. Die Effekte beziehen sich auf die jeweiligen Kontroll-Zellen, die mit dem Solvent DMSO behandelt wurden. ê steht für eine Reduktion, é steht für eine Erhöhung und = steht für keinen Effekt. 190

**Tabelle 5:** Publierte in vitro Effekte von Perillylalkohol (POH) im Hinblick auf die verwendeten Konzentrationen. 196

## Publikationen

Die folgenden Publikationen sind im Zuge der vorliegenden Dissertation entstanden.

Afshordel, S., Hagl, S., Werner, D., Röhner, N., Kögel, D., Bazan, N. G., & Eckert, G. P. (2015). Omega-3 polyunsaturated fatty acids improve mitochondrial dysfunction in brain aging - Impact of Bcl-2 and NPD-1 like metabolites. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 92. <http://doi.org/10.1016/j.plefa.2014.05.008>

Afshordel, S., Kern, B., Clasohm, J., König, H., Priester, M., Weissenberger, J., ... Eckert, G. P. (2015). Lovastatin and perillyl alcohol inhibit glioma cell invasion, migration, and proliferation - Impact of Ras-/Rho-prenylation. *Pharmacological Research*, 91. <http://doi.org/10.1016/j.phrs.2014.11.006>

Afshordel, S., Wood, W. G., Igbavboa, U., Muller, W. E., & Eckert, G. P. (2014). Impaired geranylgeranyltransferase-I regulation reduces membrane-associated Rho protein levels in aged mouse brain. *Journal of Neurochemistry*, 129(4). <http://doi.org/10.1111/jnc.12654>

Marschalek, N., Albert, F., Afshordel, S., Meske, V., Eckert, G. P., & Ohm, T. G. (2015). Geranylgeranyl pyrophosphate is crucial for neuronal survival but has no special role in purkinje cell degeneration in niemann pick type c1 disease. *Journal of Neurochemistry*, 133(1). <http://doi.org/10.1111/jnc.12959>