

Einfluß einer *in vitro* und *in vivo* Cholesterol-Modulation in
Hirnmembranen auf die zellulären Effekte von
Amyloid beta-Peptid

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Pharmazie und
Lebensmittelchemie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Apotheker
Christopher Kirsch
aus Bruchköbel

Frankfurt (2003)

(D F 1)

vom Fachbereich Biochemie, Pharmazie und Lebensmittelchemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. W.E. Müller

Gutachter: Prof. Dr. W.E. Müller
Prof. Dr. T. Dingermann

Datum der Disputation:

Für meine Eltern

Abkürzungen

1	Einleitung	1
1.1	Biologische Membranen – dynamische Schaltzentralen der Zelle	1
1.1.1	Struktur, Physikochemie und Funktionalität	1
1.1.2	Charakterisierung der Membranlipide	2
1.1.3	Die besondere Rolle des Cholesterols	5
1.1.4	Membranalterung	10
1.2	Lipid-Metabolismus	11
1.2.1	Periphere extrazelluläre Cholesterol-Homöostase	11
1.2.2	Periphere intrazelluläre Cholesterol-Homöostase	13
1.2.3	Zentrale Lipid-Homöostase	18
1.2.3.1	Besonderheiten	18
1.2.3.2	Zentrale extrazelluläre Cholesterol-Homöostase	19
1.2.3.3	Zentrale intrazelluläre Cholesterol-Homöostase	20
1.3	Statine - etablierte Wirkstoffe in neuem Licht	21
1.3.1	Physikochemie und Wirkung der Statine	21
1.3.2	Indikationen der Statine	24
1.3.3	Statine – mehr als nur Lipidsenker	27
1.4	Alzheimer Demenz	31
1.4.1	Definition, Epidemiologie und Geschichte	31
1.4.2	Risikofaktoren der Alzheimer Demenz	33
1.4.2.1	Das Alter	33
1.4.2.2	Apolipoprotein E	33
1.4.2.3	Mutationen in Risikogenen	34
1.4.2.4	Sonstige Risikofaktoren	35
1.4.3	Neuropathologie der Alzheimer Demenz	36
1.4.3.1	Senile Plaques	36
1.4.3.2	Neurofibrilläre Tangles (NFT)	38
1.4.3.3	Regiospezifische Neurodegeneration	39
1.4.4	Hypothesen zur Krankheitsinitiierung	40
1.4.4.1	Amyloid-Kaskaden Hypothese	40
1.4.4.2	Oxidative-Stress-Hypothese	40
1.4.4.3	Vaskuläre Hypothese	41
1.4.4.4	Tau-Hypothese	41
1.4.4.5	Cholesterol-Hypothese	42
1.4.5	Cholesterol und Membranlipide - Bausteine im neuronalen Puzzle der Alzheimer Demenz	42
1.4.5.1	Membranveränderungen während der Alzheimer Demenz	42
1.4.5.2	Wechselwirkungen von A β mit Membranen	43
1.4.5.3	A β und Cholesterol – eine zelluläre Liaison	46
1.4.6	Nahrungscholesterol, Statine und Alzheimer	48
1.4.7	Therapie der Alzheimer Demenz	50
1.5	Ziele der Arbeit	52

2	Material und Methoden.....	54
2.1	Material	54
2.1.1	Geräte und Materialien	54
2.1.2	Chemikalien	56
2.1.3	Kits und Antikörper	58
2.1.4	Puffer und Lösungen.....	58
2.2	Gewebe-Proben.....	61
2.2.1	Zellkultur-Proben.....	61
2.2.1.1	Gesamtmembran-Präparation aus PC12-Zellen.....	61
2.2.2	Maus-Proben.....	62
2.2.2.1	Maus-Proben für <i>in vitro</i> Studien	62
2.2.2.2	Maus-Proben für <i>in vivo</i> Studien	62
2.2.2.3	Präparation von tierischem Gewebe	64
2.2.2.3.1	<i>Präparation von Ganzhirnmembranen der Maus.....</i>	<i>64</i>
2.2.2.3.2	<i>Präparation von subzellulären Hirnmembranen der Maus.....</i>	<i>65</i>
2.2.2.3.3	<i>Spezielle Gewebepräparationen</i>	<i>67</i>
2.2.3	Ratten-Proben	67
2.2.3.1	Mikropräparationsansatz.....	68
2.2.4	Humane Proben.....	68
2.2.4.1	Charakterisierung des Gewebes.....	68
2.2.4.2	Präparation von subzellulären Membranen	69
2.3	Gewebecharakterisierung.....	70
2.3.1	Proteinbestimmung nach der Lowry-Methode	70
2.3.2	Cholesterol-Bestimmung	70
2.3.2.1	Freies Cholesterol	70
2.3.2.2	Gesamtcholesterol.....	71
2.3.3	Bestimmung der Gesamtlipophile.....	72
2.3.4	Western-Blot-Analyse auf Markerproteine	73
2.4	Subchronische <i>in vivo</i> Behandlungsstudien	74
2.4.1	Ratio der Mausstudien	74
2.4.2	Tierhaltung, Behandlung und Überwachung.....	75
2.4.3	Studiendesigns	75
2.4.3.1	Behandlungsstudie 1	76
2.4.3.2	Behandlungsstudie 2	77
2.4.3.3	Behandlungsstudie 3	77
2.4.3.4	Behandlungsstudie 4.....	78
2.4.4	Externe Cholesterol-Fütterungsstudie an Ratten	78
2.5	<i>In vitro</i> Modulation der Membranlipid-Homöostase	78
2.5.1	Cholesterol-Oxidase-Assay	78
2.5.2	Cholesterol-Modulation mit M β CD und seinen Einschlußverbindungen	79
2.5.2.1	Präparation von M β CD-Cholesterol-Komplexen.....	81
2.5.2.2	Cholesterol-Modulation an Ganzhirnmembranen	81
2.5.2.3	Cholesterol-Modulation an Synaptosomen.....	82
2.5.2.4	Cholesterol-Modulation an SPM	82
2.5.3	Degradation von Sphingomyelin mit Sphingomyelinase	83
2.6	Membranfluiditäts-Messungen	84
2.6.1	Grundlagen der Fluoreszenz-Polarisationspektroskopie.....	84
2.6.2	Anisotropie-Messung.....	86
2.6.2.1	Meßapparatur	86
2.6.2.2	Verwendete Fluoreszenzsonden	87

2.6.2.3	Meßdurchführung	88
2.6.3	Fluoreszenzmessungen mit Pyren.....	89
2.7	Charakterisierung submembranärer Domänen	92
2.7.1	Grundlagen des Fluoreszenz-Quenchings mit TNBS	92
2.7.1.1	TNBS-Labeling von Membranen	93
2.7.1.2	Bestimmung der SPM-Leaflet-Anisotropien mit DPH.....	94
2.7.1.2.1	Bestimmung des Leaflet-Amyloideffekts (DPH).....	96
2.7.1.3	Bestimmung der SPM-Leaflet-Cholesterolverteilung	96
2.7.1.3.1	Aufreinigung von DHE	97
2.7.1.3.2	Präparation von unilamellaren Transfer-Liposomen.....	99
2.7.1.3.3	Membran-Inkorporation von DHE	99
2.7.1.3.4	Meßdurchführung	101
2.8	Beta-Amyloid-Peptide	102
2.8.1	Charakterisierung.....	102
2.8.2	Aggregation	103
2.9	Statistische Analyse	104
3	Ergebnisse	105
3.1	Methodenetablierung	105
3.1.1	Etablierung der Cholesterol-Modulation mit M β CD und seinen Cholesterol-Einschlußverbindungen	105
3.1.2	Etablierung der TNBS-Quenching-Technik	106
3.2	<i>In vitro</i> Lipid-Modulation an Hirnmembranen von NMRI-Mäusen verschiedener Alterskohorten	107
3.2.1	Cholesterol-Modulation an Ganzhirnmembranen	107
3.2.1.1	Einfluß auf den Membrancholesterol-Gehalt	108
3.2.1.2	Einfluß auf verschiedene Membranfluiditäts-Parameter	109
3.2.1.2.1	DPH- und TMA-DPH-Anisotropie	109
3.2.1.2.2	Pyren-Fluoreszenz	110
3.2.1.3	Einfluß auf den Membran-Amyloid-Effekt	111
3.2.1.3.1	DPH- und TMA-DPH-Anisotropie	111
3.2.1.3.2	Pyren-Fluoreszenz	113
3.2.2	Cholesterol-Modulation an synaptosomalen Plasmamembranen (SPM)	114
3.2.2.1	Einfluß auf den Membrancholesterol-Gehalt	114
3.2.2.2	Einfluß auf verschiedene Membranfluiditäts-Parameter	114
3.2.2.2.1	DPH- und TMA-DPH-Anisotropie	114
3.2.2.2.2	Pyren-Fluoreszenz	116
3.2.2.3	Einfluß auf den Membran-Amyloid-Effekt	116
3.2.2.3.1	DPH- und TMA-DPH-Anisotropie	116
3.2.2.3.2	Pyren-Fluoreszenz	118
3.2.3	Cholesterol-Modulation an Synaptosomen.....	119
3.2.3.1	Einfluß auf den Membrancholesterol-Gehalt und die Leaflet-Cholesterolverteilung	119
3.2.3.2	Einfluß auf die Gesamt- und Leaflet-DPH-Anisotropie	120
3.2.3.3	Einfluß auf den Gesamt- und Leaflet-Amyloid-Effekt (DPH)	122
3.2.4	Sphingomyelin-Modulation an Synaptosomen.....	123
3.2.4.1	Einfluß auf den Membrancholesterol-Gehalt und die Leaflet-Cholesterolverteilung	123
3.2.4.2	Einfluß auf die Gesamt- und Leaflet-DPH-Anisotropie	123
3.2.4.3	Einfluß auf den Gesamt- und Leaflet-Amyloid-Effekt (DPH)	124

3.3	<i>In vitro</i> Cholesterol-Modulation an Gesamtmembran-Fractionen von PC12-Zellen	124
3.3.1	Einfluß auf den Membrancholesterol-Gehalt	125
3.3.2	Einfluß auf verschiedene Membranfluiditäts-Parameter	125
3.3.3	Einfluß auf den MTT- und LDH-Assay	126
3.3.4	Einfluß auf den Amyloid-Effekt im MTT-Assay	126
3.4	<i>In vivo</i> Behandlungsstudien mit Statinen an verschiedenen C57BL/6J-Mausstämmen	127
3.4.1	Einfluß von Statinen auf den Cholesterolgehalt von Leber und Serum	127
3.4.1.1	C57BL/6J-Mäuse	127
3.4.1.2	C57BL/6J-apoE-knockout-Mäuse	127
3.4.2	Einfluß von Statinen auf den Cholesterolgehalt und verschiedene Membranfluiditäts-Parameter von Gesamtmembranen des Cerebellums von C57BL/6J-Mäusen	128
3.4.2.1	Membrancholesterol	128
3.4.2.2	DPH-Anisotropie	129
3.4.2.3	Pyren-Fluoreszenz	129
3.4.3	Einfluß von Statinen auf den Cholesterolgehalt und verschiedene Membranfluiditäts-Parameter von Gesamtmembranen des Großhirns verschiedener Mäusestämme	130
3.4.3.1	C57BL/6J-Mäuse	130
3.4.3.1.1	<i>Membrancholesterol</i>	130
3.4.3.1.2	<i>DPH- und TMA-DPH-Anisotropie</i>	131
3.4.3.1.3	<i>Pyren-Fluoreszenz</i>	131
3.4.3.2	C57BL/6J-apoE-knockout-Mäuse	133
3.4.3.2.1	<i>Membrancholesterol</i>	133
3.4.3.2.2	<i>DPH-Anisotropie</i>	133
3.4.3.2.3	<i>Pyren-Fluoreszenz</i>	133
3.4.4	Einfluß von Statinen auf den Membran-Amyloid-Effekt an Ganzhirnmembranen des Großhirns von C57BL/6J-Mäusen	134
3.4.4.1	DPH- und TMA-DPH-Anisotropie	134
3.4.4.2	Pyren-Fluoreszenz	135
3.4.5	Einfluß von Statinen auf die Lipid-Homöostase von SPM junger C57BL/6J-Mäuse	135
3.4.5.1	Membrancholesterol-Gehalt und Leaflet-Cholesterolverteilung	135
3.4.5.2	Membranphospholipid-Gehalt	136
3.4.6	Einfluß von Statinen auf verschiedene Membranfluiditäts-Parameter von SPM junger C57BL/6J-Mäuse	137
3.4.6.1	DPH- und TMA-DPH-Anisotropie	137
3.4.6.2	Pyren-Fluoreszenz	138
3.4.7	Einfluß von Statinen auf den Membran-Amyloideffekt an SPM junger C57BL/6J-Mäuse	139
3.4.7.1	DPH- und TMA-DPH-Anisotropie	139
3.4.7.2	Pyren-Fluoreszenz	140
3.4.8	Einfluß von Statinen auf spezifische mRNA- und Protein-Expressionen	141
3.4.8.1	Einfluß auf die Flotillin-Expression in SPM von jungen C57BL/6J-Mäusen	141
3.5	<i>In vivo</i> Cholesterol-Fütterungsstudie an Ratten	142
3.5.1	Einfluß der Cholesterolfütterung auf den Cholesterolgehalt von Leber und Serum	142

3.5.2	Einfluß der Cholesterol-Fütterung auf die Lipid-Homöostase von Ganzhirnmembranen verschiedener Hirnareale	142
3.5.3	Einfluß der Cholesterol-Fütterung auf die Lipid-Homöostase von SPM des Kortex	144
3.5.3.1	Membrancholesterol-Gehalt und Leaflet-Cholesterolverteilung	144
3.5.3.2	Membranphospholipid-Gehalt	144
3.6	Humane Hirnproben: <i>In vitro</i> Untersuchung krankheitsbedingter Veränderungen der zentralen Membranlipid-Homöostase im Laufe der Alzheimer Krankheit.....	145
3.6.1	Untersuchung der Lipid-Homöostase von Gesamtmembranen des frontalen Kortex von Kontroll- und Alzheimer-Patienten	145
3.6.1.1	Membrancholesterol-Gehalt	145
3.6.1.2	Membranphospholipid-Gehalt	145
3.6.2	Untersuchung der Lipid-Homöostase von SPM des frontalen Kortex von Kontroll- und Alzheimer-Patienten.....	145
3.6.2.1	Membrancholesterol-Gehalt und Leaflet-Cholesterolverteilung	145
3.6.2.2	Membranphospholipid-Gehalt	148
3.6.3	Untersuchung verschiedener Membranfluiditäts-Parameter von SPM des frontalen Kortex von Kontroll- und Alzheimer-Patienten	148
3.6.3.1	Gesamt- und Leaflet-DPH-Anisotropie	148
3.6.3.2	Pyren-Fluoreszenz	150
4	Diskussion	152
4.1	Membran-Präparationen und Meßmethodik	152
4.2	Beeinflussung von Membranstruktur und Physikochemie: M β CD versus Statine	153
4.3	Beeinflussung von Membranstruktur und Physikochemie: Das Alter	160
4.4	Beeinflussung von Membranstruktur und Physikochemie durch das Alter, M β CD und Statine: Pathophysiologische Relevanz im Rahmen der Alzheimer Demenz.....	163
4.5	ApoE - ein Bindeglied zwischen Cholesterol und A β	176
4.6	Wie wirken Statine im Gehirn - ein Rolle für ApoE, NO, und mehrfach ungesättigte Fettsäuren?	184
4.7	Gesamtmodell zur Pathophysiologie der sporadischen Alzheimer Demenz.....	193
4.8	Statine als Alzheimer-Therapeutika?	196
5	Zusammenfassung.....	197
6	Literaturverzeichnis	198

Publikationsliste

Lebenslauf

Danksagung

Wichtige Abkürzungen

In dieser Liste nicht aufgeführte Abkürzungen sind im Text bzw. im Chemikalienverzeichnis beschrieben.

A β	Amyloid beta-Protein
ABCA1	ATP-Binding-Cassette Transporter 1
ACAT	Acyl-Coenzyme A:Cholesterol Acyltransferase
AD	Alzheimer Demenz
AMPK	AMP-abhängige Protein-Kinase
ANOVA	Analysis of Variance
APLP	APP like protein
apoE	Apolipoprotein E-Gen
ApoE	Apolipoprotein E-Protein
APP	Amyloid Precursor Protein
BHS	Blut-Hirn-Schranke
CAA	cerebrale Amyloid-Angiopathie
CD	circular dichroism
CERAD	Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease
CHO	chinese hamster ovary
CHOD-PAP	Cholesteroxidase-Peroxidase-Aminophenazon-Phenol
CREB	cAMP response-element binding protein
CRP	C-reactive protein
CSE	Cholesterol-Synthese-Enzym
CSF	Cerebrospinal-Flüssigkeit
CYP	Cytochrom P
DC	Dünnschichtchromatographie
DHE	Dehydroergosterol
DPH	Diphenylhexatrien
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EOAD	early onset Alzheimer's Disease
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FABP	Fatty acid binding protein
FAD	familiar Alzheimer'Disease
g	Gravitation
GM1	Gangliosid-Molekül 1
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HDL	High-Density Lipoprotein
HEK	human embryonal kidney
HMG-CoA	Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A
HPLC	High-throughput liquid chromatography
HWZ	Halbwertszeit
IMT	intima-media-thickness
K.G.	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDH	Lactatdehydrogenase
LDL(R)	Low-Density Lipoprotein (Rezeptor)
LOAD	late onset Alzheimer's Disease

Abkürzungen

LRP	LDL-related protein
M β CD	Methyl- β -Cyclodextrin
MMSE	Mini Mental Status Test Evaluation
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MUF	Mehrfach ungesättigte Fettsäure
NFT	Neurofibrilläre Tangles
NINCDS/ADRDA	Nationale Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
NPC	Niemann-Pick Typ C (Protein)
OSBP	oxysterol binding protein
PCR	polymerase chain reaction
PET	Positronen-Emissions-Spektroskopie
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
PC	Phosphatidylcholin
PC 12	Phäochromocytom 12
PE	Phosphatidylethanolamin
PHF	paired helical filament
PI	Phosphatidylinositol
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PM	Plasmamembran
PS	Phosphatidylserin
PS1	Presenilin 1
PS2	Presenilin 2
POPC	1-Palmitoyl-2-oleyl-phosphatidylcholin
ROS	reactive oxygen species
SCAP	SREBP cleavage activating protein
SCP-2	sterol carrier protein-2
SD	Standard Deviation
SEM	Standard Error of Mean
SMC	smooth muscle cell
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
SPM	Synaptosomale Plasmamembran
SR-BI	Scavenger-Rezeptor Klasse B Typ I
SREBP	sterol regulatory element binding protein
SUV	small unilamellar vesicle
TGN	Trans-Golgi-Network
TMA-DPH	Trimethylammoniumdiphenylhexatrien
TNBS	Trinitrobenzensulfonsäure
UAW	unerwünschte Arzneimittelwirkung
U/min	Umdrehungen pro Minute
VLDL(R)	Very-low-Density Lipoprotein (Rezeptor)
VD	Vaskuläre Demenz
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Biologische Membranen – dynamische Schaltzentralen der Zelle

1.1.1 Struktur, Physikochemie und Funktionalität

Biologische Membranen sind dynamische Assoziate aus Lipiden, Proteinen und Kohlenhydraten (Graham, Higgins, 1998) (Abb. E1). Das Mengenverhältnis der einzelnen Konstituenten zueinander kann dabei je nach Spezies, Lokalisation und physiologischer Funktion der Membran deutlich variieren. Natürliche Membranen weisen typischerweise eine Dicke von 4-10 nm auf und sind blattartig arrangiert. Die Lipid-Doppelschicht von Membranen ist eine thermodynamisch begünstigte, kooperative Struktur, die durch sich gegenseitig verstärkende, nichtkovalente Wechselwirkungen zusammengehalten wird und zum spontanen Zusammenschluß mit sich selbst neigt (Stryer, 1995). Auf diese Weise können sich definierte zelluläre Kompartimente ausbilden. Nach dem Fluid-Mosaik-Modell von Singer und Nicolson (1972) verhalten sich Membranen wie zweidimensionale Lösungen, in denen gerichtete globuläre Proteine und Membranlipide eine mehr oder weniger starke Lateralbewegung ausführen und somit als „ineinander gelöst“ betrachtet werden können. Amphiphile Membranlipide in der Membran-Doppelschicht übernehmen dabei primär die Rolle einer Permeabilitätsbarriere, die vor allem für polare Substanzen undurchlässig ist. Hydrophobe Lipid-Molekülteile orientieren sich in das Membraninnere, wohingegen polare Molekül-Kopfgruppen das Membranmilieu nach außen hin abschirmen (Graham, Higgins, 1998). Dabei stehen Lipidmoleküle zum Teil in spezifischer Wechselwirkung mit bestimmten Membranproteinen und sind somit an deren Funktionalität beteiligt (Yeagle, 1991; Lenaz, Esposti, 1994; Wood et al., 1996; Gimpl et al., 1997). Proteine wie z.B. Enzyme, Ionenkanäle oder Rezeptoren übernehmen und kanalisieren zelluläre Stoffwechsel- und Signaltransduktionsprozesse und sind an der Adjustierung des intra- und extrazellulären Ionenmilieus und damit an elektrischen Erregungsvorgängen (Polarisierungen) an der Membran beteiligt (Graham, Higgins, 1998). Sie können entweder in eine Einzelschicht der Membran eingebettet sein (periphere Proteine) oder die Membran komplett durchspannen (Transmembran-Proteine) (Abb. E1). Glykoproteine tragen zudem auf extrazellulärer Seite einen kovalenten Kohlenhydratrest (Graham, Higgins, 1998). Die „sekundäre“ Ausstattung von Membranen mit Funktionsproteinen und anderen Signalmolekülen ist streng an die physiologische Aufgabe des jeweiligen Membransystems gebunden. Dabei werden Lipid- und

Proteinbausteine asymmetrisch in die Membranmatrix inkorporiert (Edidin, 1992; Schroeder et al., 1996, 2001). Die strukturelle und funktionelle Asymmetrie der cytofacialen und exofacialen Membranoberfläche stellt somit ein wichtiges Charakteristikum biologischer Membranen dar (siehe 1.1.2).

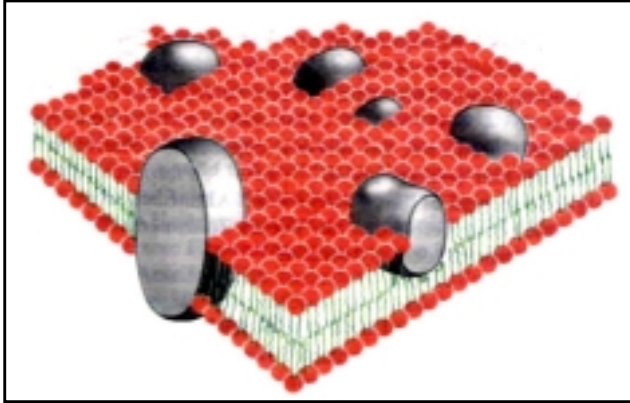


Abb. E1. Vereinfachte Struktur biologischer Membranen. In die Lipid-Doppelschicht sind funktionelle Proteine eingelagert, die sich in der Lipidmatrix lateral bewegen können und zum Teil exofacial mit Kohlenhydrat-Resten derivatisiert sind (Glycocalix). Nach Stryer, 1995.

1.1.2 Charakterisierung der Membranlipide

Membranlipide lassen sich in die drei Hauptklassen *Phospholipide*, *Glykolipide* und *Isoprenoide* einteilen (Graham, Higgins, 1998).

Phospholipide stellen mengenmäßig den größten Anteil der Membranlipide dar und kommen in allen biologischen Membranen vor. Sie leiten sich entweder vom Glycerin (sogenannte *Phosphoglyceride*) oder vom Sphingosin (sogenannte *Sphingolipide*) ab.

Phosphoglyceride sind strukturell neben dem Glycerinrückgrat aus zwei Fettsäureketten (C-1 und C-2 Hydroxylgruppe) und einem phosphorylierten Alkohol (C-3 Hydroxylgruppe) aufgebaut (Abb. E2). Als Alkoholkomponente fungieren in der Regel Serin, Cholin, Ethanolamin, Inositol oder Glycerin. Mit Ausnahme von cholinhaltigen Phospholipiden sind infolge der Phosphatgruppe alle Phospholipide negativ geladen. Die länger-kettigen Fettsäuren in Phospholipiden von Eukaryoten enthalten eine gerade Anzahl von C-Atomen (C14 - C24). Im tierischen Organismus sind die Ketten stets unverzweigt. Ungesättigte Ketten, die bis zu sechs Doppelbindungen aufweisen können, besitzen fast ausnahmslos *cis*-Konfiguration. Prominente Beispiele aus dem heterogenen Gemisch an Phospholipid-Fettsäuren sind z.B. die Palmitinsäure (16:0), die α -Linolensäure (18:3, ω -3), oder auch die Arachidonsäure (20:4, ω -6). Die Fettsäurereste sind bis zu einem gewissen Grad für ein Phospholipid in einem bestimmten Membrantyp charakteristisch (Graham, Higgins, 1998).

Freie Fettsäuren gehören nicht zu den eigentlichen Membranbestandteilen. Sie können allerdings durch den enzymatischen Abbau von Phospholipiden in der Membran freigesetzt werden, wodurch gleichzeitig sogenannte Lysophosphatidyl-Verbindungen anfallen, die in die Membran inkorporiert bleiben können (Graham, Higgins, 1998). Durch Aktivierung der Phospholipase A₂ im Rahmen der Prostaglandin-Synthese wird z.B. Arachidonsäure aus Membran-Phospholipiden freigesetzt und dient der Zelle im folgenden als Baustein für cyclische Endoperoxide (Stryer, 1995). Mehrfach ungesättigte ω-3- und ω-6-Fettsäuren (MUFs) sind für den Menschen essentiell. Sie sind zellulär als second-messenger-Substanzen an einer Vielzahl von Signaltransduktions-Prozessen beteiligt (Das U.N. 2002a). Sie modulieren z.B. die Aktivität von membranassoziierten Proteinen wie Protein-Kinase-C (Goldberg, Zidovetzki, 1997), regulieren in einigen Stoffwechselsystemen die Gen-Expression (Ntambi, Bene, 2001), steuern Zell-Differenzierungs- und Apoptose-Vorgänge (Rudolph et al., 2001), und besitzen zum Teil anti-atherosklerotische Aktivität (Das U.N., 2002a). Gesättigte Fettsäuren wie Palmitin- oder Myristinsäure fungieren hingegen häufig als kovalenter Anker von Membranproteinen und verhalten sich damit ähnlich wie bestimmte Isoprenoide (Graham, Higgins, 1998).

Der einzige Vertreter der **Sphingolipide** in der Säuger-Membran ist das Sphingomyelin, welches das vorherrschende Lipid im Myelin darstellt (Graham, Higgins, 1998). Hier ist eine Acylgruppe (meist ein C24-Rest) über Amidbindung mit dem Alkohol Sphingosin verknüpft (sogenanntes Ceramid), dessen endständige Hydroxylgruppe mit Phosphorylcholin verbunden ist (Abb. E3).

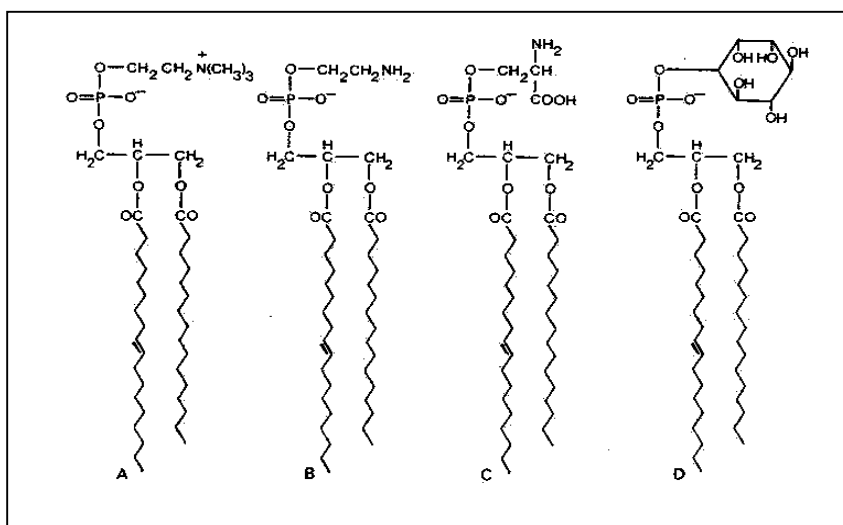


Abb. E2. Struktur ausgewählter Phosphoglyceride. A: Phosphatidylcholin (PC); B: Phosphatidylethanolamin (PE); C: Phosphatidylserin (PS); D: Phosphatidylinositol (PI). PC ist zwitterionisch, alle anderen Lipide sind negativ geladen. Aus Graham, Higgins, 1998.

Phospho- und Sphingolipide sind in biologischen Membranen asymmetrisch verteilt und bedingen somit gleichfalls eine unterschiedliche Verteilung von Ladung auf die jeweiligen Membranblätter (Schroeder et al., 2001; Wood et al., 2002). Tabelle E1 weist den Prozentgehalt für ausgewählte Membranlipide in jedem Leaflet der menschlichen Erythrozyten-Membran aus.

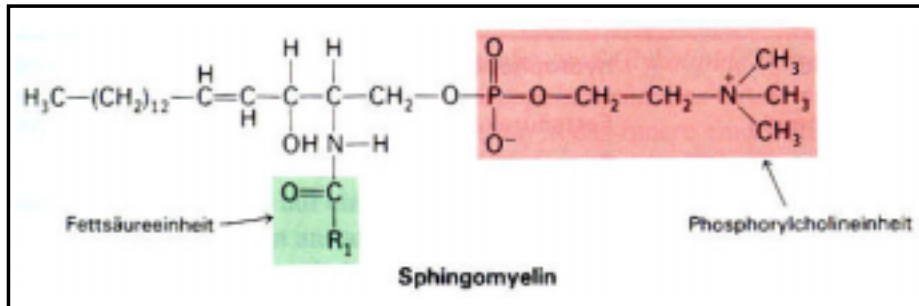


Abb. E3. Struktur von Sphingomyelin. Das Sphingolipid besteht aus einem Sphingosin-Rückgrat, das mit einer Fettsäure-Einheit und einem Phosphorylcholin-Rest derivatisiert ist.

Glykolipide sind zuckerhaltige Lipide. In Säuger-Zellen leiten sich Glykolipide vergleichbar dem Sphingomyelin vom Ceramid ab (Graham, Higgins, 1998). Hier ist die primäre Hydroxylgruppe des Alkohols entweder mit einem einzigen Zuckerrest wie Glucose oder Galactose (sogenannte *Cerebroside*), oder mit zum Teil verzweigten Ketten von mehreren Zuckern (sogenannte *Ganglioside*) verknüpft. Zu dieser Oligosaccharidkette gehören häufig N-acetylierte Zucker wie Sialinsäure. Zu geringem Prozentsatz finden sich in Säuger-Membranen auch Glykosylderivate von Phosphatiden. Erwähnt seien hier die Glykosylderivate des Phosphatidylinositols (PI), bei denen eine oder mehrere OH-Gruppen des Inositols mit Zuckerresten verknüpft sind. Derartiges Glycosylphosphatidylinositol (GPI) dient exofacial als Protein-Anker (Baron, Caughey, 2003). Glykolipide sind bei Eukaryoten typischerweise im extrazellulären Blatt der Plasmamembran (PM) angereichert (Tabelle E1). Gleichfalls sind sie charakteristische Bausteine des Myelins (Graham, Higgins, 1998).

Isoprenoide lassen sich strukturell unterteilen in cyclisierte Derivate (Sterine) und lineare Isoprenoide. Das wichtigste Sterin-Derivat in der Säugermembran ist das Cholesterol (Yeagle, 1991). Es besitzt ähnlich den Phospholipiden einen amphiphatischen Charakter und ist wesentlich an der Regulation der Membranviskosität bzw. Membranfluidität beteiligt. (siehe 1.1.3, Abb. E4). In Membranen liegt Cholesterol fast ausschließlich als freies Sterin und nicht als Ester vor, da Ester-Verbindungen keine Amphiphilie mehr aufweisen (Graham, Higgins, 1998). Auch Cholesterol ist asymmetrisch über die Membran-Doppelschicht verteilt (Igbavboa et al., 1996; Wood et al., 1999, 2002; Schroeder et al., 2001; Kirsch et al., 2003). Nahezu drei Viertel des Cholesterols in der PM von Säugern sind im cytofacialen

Membranblatt lokalisiert, während nur rund ein Viertel auf die exofaciale Seite entfällt (Igbavboa et al., 1996; Wood et al., 2002; Kirsch et al., 2003) (siehe 1.2.2).

Lineare Isoprenoide wie Dolichol, Farnesol oder Geranylgeranol sind häufig über Phosphatreste kovalent an Membranproteine gebunden und erfüllen dabei im wesentlichen zwei Funktionen. Zum einen bewirken sie eine Verankerung der Proteine in der Membranmatrix, zum anderen erlangen bestimmte Proteine wie z.B. Untereinheiten von G-Proteinen erst durch derartige Isoprenylierungen und Lipidmodifikationen ihre vollständige Funktionalität bei Zellkommunikations- und Regulationsprozessen und werden einem zielgerichteten Protein-Sorting unterworfen (Glomset et al., 1990; Maltese, 1990; Glomset, Farnsworth, 1994) (siehe 1.3.3).

Tabelle E1. Phospholipid-Asymmetrie in humanen Erythrozyten-Membranen (%-Gehalt) (nach Graham, Higgins, 1998).

Lipidtyp	cytosolische Seite	extrazelluläre Seite
Sphingomyelin	17	83
Phosphatidylcholin	26	74
Phosphatidylethanolamin	77	23
Phosphatidylserin	95	< 5
Glykolipide	< 5	95

1.1.3 Die besondere Rolle des Cholesterols

Membranfluidität

Cholesterol stellt bei Eukaryoten den Hauptregulator der Membranfluidität dar und beeinflusst in hohem Maße das Phasenverhalten von Membranlipiden (Yeagle, 1985; Ohvo-Rekilä et al., 2002). Prinzipiell können Membran-inkorporierte Lipide in zwei Phasenzuständen auftreten. Unterhalb der sogenannten Schmelz- oder Phasenübergangstemperatur T_M befinden sie sich in einem kristallinen, „starren“ Zustand (sogenannte Gel-Phase), in dem die Fettsäureketten gestreckt und eng geordnet gepackt vorliegen (Brown, London, 2000; Brown, 2002). Sämtliche C-C-Bindungen in der Fettsäurekette befinden sich in der *trans*-Konformation. Lateral- und Rotationalmobilität der Lipide sind sehr gering. Oberhalb ihrer T_M liegen die Lipide in einem flüssigen bzw. flüssig-kristallinen Zustand vor („liquid-disordered“, l_d -Phase) (Brown, 2002). Hier sind die Fettsäureketten ungeordnet aneinander gelagert und relativ frei

beweglich, C-C-Bindungen befinden sich partiell in der *gauche*-Konformation. Rotationsbewegungen und laterale Diffusion sind begünstigt. Der T_M -Wert eines Lipids wird wesentlich durch die Kettenlänge und den Sättigungsgrad seiner Fettsäureketten determiniert. Der T_M -Wert ist dann niedrig, wenn relativ viele Doppelbindungen im Acylrest vorliegen und dieser relativ kurz ist. Umgekehrt nimmt er mit zunehmendem Sättigungsgrad sowie der Kettenlänge der Lipid-Fettsäuren zu (Brown, 2002). Mit Ausnahme von Sphingomyelin und Glycosphingolipiden, die erst bei relativ hohen Temperaturen einen Phasenübergang vollziehen, haben biologische Phospholipide und Glycerolipide generell recht niedrige T_M -Werte von $\leq 25^\circ\text{C}$. Der Phasenzustand einer Membran in bestimmten Bereichen wird somit entscheidend vom Mengenverhältnis einzelner Membranlipide in diesen Bereichen sowie von der Umgebungstemperatur bestimmt, so daß im Gesamtsystem durchaus mehrere Phasen koexistieren können (Brown, London, 1998).

Cholesterol lagert sich mit seiner Längsachse senkrecht zur Membranebene zwischen die Fettsäureketten der Phospholipide ein (Ohvo-Rekilä et al., 2002) (Abb. E4). Durch diese Interkalation hemmt es oberhalb von T_M zum einen die Kristallisation der Fettsäuren und beeinflusst damit den Phasenübergang von Lipiddoppelschichten, zum anderen behindert es sterisch größere Bewegungen der Fettsäureketten und rigidisiert das Membraniumfeld (Brown, 2002). Gleichfalls nimmt die Membran-Permeabilität ab. Mit zunehmender Cholesterol-Konzentration werden die Fettsäuren ähnlich eng und geordnet gepackt wie in der Gel-Phase, besitzen aber weiterhin eine Lateral- und Rotationalbeweglichkeit vergleichbar der l_d -Phase. Diese Intermediärphase wird als l_o -Phase („liquid-ordered“) bezeichnet und beschreibt die Zustandsform spezifischer cholesterolreicher Membrandomänen, sogenannter Lipid-Rafts.

Phasensegregation und Domänen-Bildung

Lipid-Rafts sind spezialisierte laterale Membran-Mikrodomänen mit einer einzigartigen Protein- und Lipidkomposition (Schroeder et al., 2001; Kenworthy, 2002; Simons, Ehehalt, 2002; Zajchowski, Robbins, 2002). Die terminologische Gliederung von membranären Lipid-Raft-Domänen ist in der Literatur nicht einheitlich. In dieser Arbeit wird die Terminologie von Simons und Toomre (2000) bzw. von Schroeder et al. (2001) verwendet, bei der der Terminus „Lipid-Raft“ auf alle l_o -Phasen (liquid-ordered) Membran-Mikrodomänen angewendet, jedoch eine Unterscheidung zwischen morphologisch flachen, Caveolin-freien Lipid-Rafts, und Caveolin-reichen, eingestülpten Raft-Domänen („Caveolae“) getroffen wird. Da sich derartige Membrandomänen durch Unlöslichkeit in bestimmten Detergentien wie z.B. Triton X-100 auszeichnen (Eckert et al., 2003a), werden sie in der Literatur auch häufig als

„detergent-insoluble glycolipid-rich membranes“ (DIGs) bzw. als „detergent-resistant membranes“ (DRMs) bezeichnet (Simons, Ehehalt, 2002). Caveolin-freie Lipid-Rafts werden im folgenden mit NCR (**n**on-caveolar **r**aft) abgekürzt, Caveolin-haltige Rafts mit CR (**c**aveolar **r**aft).

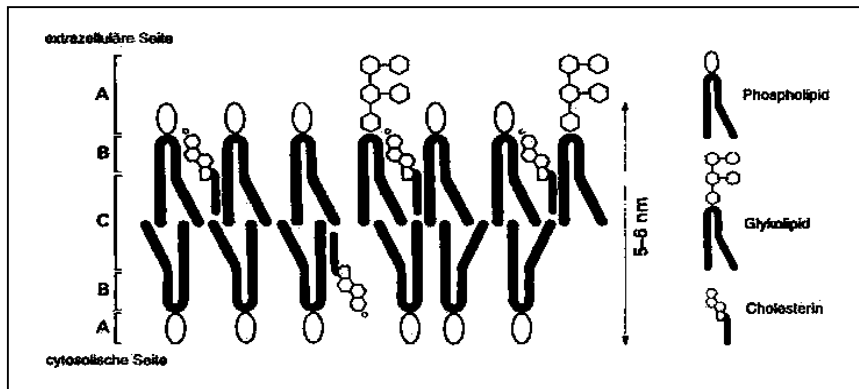


Abb. E4. Cholesterol und die Membranfluidität. Cholesterol moduliert die Fließfähigkeit der Membran primär im oberen hydrophoben Bereich [B] der Membranblätter (nach Graham, Higgins, 1998).

NCR sind strukturell auf der Plasmamembran nahezu jeder Säugerzelle nachzuweisen, wenngleich die biochemischen Isolierungsverfahren für derartige Membranassoziate vielfach die Frage aufwerfen, inwieweit man durch den Aufreinigungsprozess *per se* die Struktur und Zusammensetzung von Lipid-Rafts verändert (Zajchowski, Robbins, 2002). Der Ursprung von Lipid-Rafts findet sich im Golgi-Komplex, von wo aus die Membranassoziate einen gerichteten Transport zur Plasmamembran vollführen und bereits in diesem Stadium entscheidend am intrazellulären Sorting von Lipid- und Proteinmolekülen beteiligt sind (Simons, Ehehalt, 2002). Sie werden schließlich in der Plasmamembran aufkonzentriert und sind von einem retrograden Transport ins Zellinnere ausgeschlossen. NCR sind Bilayer-Strukturen hoch angereichert an Cholesterol, Glycosphingolipiden und Sphingomyelin, GPI-verankerten Membranproteinen, sowie einer Vielzahl anderer, typischer Signalmoleküle (Schroeder et al., 2001, Zajchowski, Robbins, 2002). Hierzu zählen vor allem Tyrosin-Kinasen der Src-Kinase-Familie, G α -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine, Transmembran-Proteine wie der EGF-Rezeptor, oder auch die β -Secretase (BACE, siehe 1.4.3.1) sowie Flotillin-1 und -2 (zur Übersicht siehe Zajchowski, Robbins, 2002). Die Leaflet-Verteilung der einzelnen Konstituenten ist dabei ebenfalls asymmetrisch. Src-Kinasen finden sich z.B. ausschließlich cytofacial, umgeben von Phospholipiden mit hochgradig gesättigten Fettsäureketten, was deren Phasenverhalten gegenüber benachbarten non-Raft-Phospholipiden mit einer größeren Anzahl ungesättigter Fettsäuren deutlich abgrenzt (Simons, Ikonen, 2000). GPI-verankerte Raft-Proteine wie das Prion Protein (PrP) befinden sich im Gegensatz dazu exklusiv im exofacialen Membranblatt in Nachbarschaft von

Sphingolipiden (Simons, Ikonen, 2000). Andere Proteine wiederum wie z.B. Clathrin werden von NCR-Strukturen strikt ausgeschlossen (Schroeder et al., 2001).

Die spezifische Anhäufung und funktionelle Verschaltung einer derartigen Vielfalt von Signalmolekülen in NCR auf engstem Raum macht es wahrscheinlich, daß NCR als zelluläre Signaltransduktions-Plattformen fungieren. Zahlreiche Befunde deuten darauf hin, daß NCR z.B. in G-Protein-, EGF- oder T-Zell-Rezeptor-vermittelte Signalkaskaden im Rahmen von Differenzierungs-, Wachstums- oder Immunreaktions-Vorgängen involviert sind (zur Übersicht siehe Zajchowski, Robbins, 2002). Die funktionelle Aktivität von NCR ist dabei sehr wahrscheinlich an das Zusammenschmelzen mehrerer kleiner Raft-Domänen zu einem großen Raft-Cluster gebunden (Simons, Ehehalt, 2002). Es ist bekannt, daß NCR in ihrer Größe deutlich variieren (etwa 50-370 nm). Kleine NCR, die lateral relativ frei entlang der exofacialen Membranoberfläche beweglich sind, können unter bestimmtem physiologischen Bedingungen und durch spezifische Stimuli zu größeren Funktionsplattformen „verschmelzen“, in denen einzelne Proteine wie z.B. Rezeptoren und ihre second-messenger-Effektoren in enge räumliche Nachbarschaft gebracht und somit „angeschaltet“ werden. Derartige Fusions-Stimuli umfassen z.B. die Anheftung spezifischer cytoskelettaler Elemente an Raft-Proteine, die exofaciale Bindung von Liganden, oder die Rezeptor-Quervernetzung mittels Antikörpern (Simons, Ehehalt, 2002). Nach dieser Vorstellung können Zellen die Aktivität membranärer Signalmoleküle durch Translokation in funktionelle Raft-Domänen gezielt steuern.

CR sind eine weitere wichtige Unterklasse der Lipid-Rafts. Sie sind gekennzeichnet durch einen hohen Gehalt an oligomerisiertem Caveolin, welches in NCR gänzlich fehlt (Fujimoto, 2000; Schroeder et al., 2001; Stan, 2002). Dieses ist exklusiv im cytofacialen Membran-Layer lokalisiert. Caveoline gehören zu einer Familie von 21-25 kDa integralen Membranproteinen. Caveolin-1 und Caveolin-2 finden sich in einer Vielzahl von Geweben, z.B. auch in Neuronen und Astrozyten (Cameron et al., 1997; Galbiati et al., 1998; Ikezu et al., 1998). Caveolin-3 wird vorrangig in Muskelgewebe expremiert (Tang et al., 1996), neue Befunde weisen aber auch auf eine Expression in Astrozyten hin (Nishiyama et al., 1999). Caveolae sind zwar morphologisch infolge ihrer eigentümlichen, taschenartigen Struktur klar von NCR zu unterscheiden, jedoch weisen sie im Vergleich mit diesen zahlreiche strukturelle Gemeinsamkeiten auf. Auch CR sind an der Zelloberfläche angereicherte Assoziate aufkonzentriert mit Cholesterol, Sphingomyelin, Ceramid, spezifischen Membranlipiden wie Glycosphingolipiden, sowie Signaltransduktions-Molekülen wie dem Scavenger-Rezeptor

Klasse B, Typ 1 (SR-BI) (Schroeder et al., 2001). Die Größe von CR beträgt im Mittel etwa 70 nm. Neben Signaltransduktions-Vorgängen werden Caveolae vor allem wichtige Funktionen bei endozytotischen Prozessen sowie dem intrazellulären Cholesterol-Transport zugeschrieben (Simons, Toomre, 2000; Schroeder et al., 2001; Zajchowski, Robbins, 2002) (siehe 1.2.2). Dabei übernimmt Caveolin-1 die Funktion eines direkten Cholesterol-Bindungs-Proteins (Murata et al., 1995). CR und NCR können in einem Membrankompartiment koexistieren. Ihre Strukturen werden dann zerstört, wenn man die Zelle mit Cholesterol-extrahierenden Agentien wie M β CD oder mit Sphingomyelinase behandelt (Marx, 2000; Hao et al., 2001; Schroeder et al., 2001; Dreja et al., 2002). Exofaciales PM-Cholesterol wird dann zum Teil wieder dem intrazellulären Cholesterol-Pool zugeführt (Simons, Ikonen, 2000; Wood et al., 2002) (siehe 1.2.2).

Unabhängig von der Einteilung in Lateral- und Leaflet-Pools wie Lipid-Rafts lassen sich membranäre Cholesterol-Domänen auch bezüglich ihrer kinetischen Eigenschaften charakterisieren, die die Austauschbarkeit des Sterols im Kontakt mit vesikulären Akzeptoren beschreiben (Schroeder et al., 1996). Zwei derartige *Kinetic-Pools* sind bislang in Maus-Synaptosomen beschrieben worden (Wood et al., 1993, 2002). Je nach Austauschgeschwindigkeit liegt Cholesterol in solchen Domänen vermutlich monomer, dimer oder auch oligomer vor. Die kinetischen Eigenschaften von Cholesterol innerhalb der Membran spielen im Rahmen sämtlicher transmembranärer Cholesterol-Transportvorgänge der Zelle eine bedeutende Rolle. Inwieweit Kinetic-Pools mit Lipid-Raft-Domänen identisch sind, ist unklar.

Proteinfunktionalität

Neben der Induktion einer physikochemischen Phasensegregation übernimmt membranäres Cholesterol auch bei der Steuerung der Funktionalität von Signalpeptiden eine primäre Vermittlerrolle. Eine Vielzahl integraler Membran-Proteine wie z.B. Ionen-Kanäle oder Enzyme sind in ihrer Aktivität vom Viskositätszustand des umgebenden Membraniumfelds abhängig (Yeagle, 1985, 1991; Wolozin, 2001). Andere Proteine wie der Oxytocin-Rezeptor oder Enzyme der Cholesterol-Synthese-Kaskade verändern ihren Aktivitätszustand durch direkte Bindung von sogenanntem annularem Cholesterol über eine Cholesterol-Sensing-Domäne (Gimpl et al., 1997; Lange, Steck, 1998; Gimpl et al., 2002). In räumlich umgrenzten Lipid-Raft-Clustern spielen höchstwahrscheinlich beide Interaktions-Wege eine wichtige Rolle.

1.1.4 Membranalterung

Biologische Membranen verändern im Rahmen des physiologischen Alterungsprozesses ihre Struktur und damit ihre Funktionalität. Neuronale Membranen mit vergleichsweise geringem Lipid-Turnover sind solchen Veränderungen über die Lebensspanne in besonderem Maße ausgesetzt. Alterseffekte auf die Membranintegrität scheinen dabei in unterschiedlichen Hirnregionen verschieden stark ausgeprägt zu sein (Ohyama et al., 1995). Im menschlichen Organismus sind neuronale Membranen an essentiellen kognitiven Funktionen wie der Gedächtnisbildung, dem Lernvorgang, der Schlafsteuerung, oder der Thermoregulation beteiligt. Durch sogenannte synaptische Transmission werden kodierte Informationseinheiten (Aktionspotentiale) im Neuronengeflecht des Gehirns gerichtet transportiert. Aktivität und Funktionszustand der an diesem Prozeß beteiligten membranären Signaltransduktions-Systeme werden, wie oben beschrieben, wesentlich von den altersabhängigen Fluiditätseigenschaften des umgebenden Membraniumfelds bestimmt (Scheuer et al., 1995; Bosman et al., 1996). Im Laufe des Alterungsprozesses kommt es in neuronalen Membranen zu einer deutlichen Anreicherung von Cholesterol im Verhältnis zu den Phospholipiden, so dass die Membranfluidität deutlich abnimmt (Nagy et al., 1983; Wood et al., 1984; Shinitzky, 1987; Ohyama et al., 1995; Igbavboa et al., 1996; Eckert et al., 2001; Ando et al., 2001). Zusätzliches Cholesterol wird dabei primär im exofacialen Membranblatt eingebaut. So weist die exofaciale Schicht synaptosomaler Plasmamembranen von alten Mäusen nahezu doppelt so viel Cholesterol auf wie die von jungen Mäusen, wohingegen der cytofaciale Cholesterolgehalt nicht wesentlich verändert wird (Igbavboa et al., 1996). Inwieweit von diesem Prozess exofaciale Raft-Strukturen betroffen sind, ist ungeklärt. Der membranäre synaptische Cholesterol- und Phospholipid-Turnover nimmt im Alter ab, was auf eine Veränderung struktureller Kinetic-Pools schließen läßt (Ando et al., 2002; Wood et al., 2002).

Weitere altersassoziierte Veränderungen in der Zusammensetzung von Membranen betreffen das Verhältnis einzelner Phospholipide und Sphingolipide zueinander. In gealterten Membranen ist häufig das Verhältnis von Sphingomyelin zu Phosphatidylcholin erhöht, was wiederum das Phasenverhalten der Membran verändert (Shinitzky, 1987; Zhang et al., 1996). Auch die Phospholipid/Protein-Ratio verändert sich altersbedingt für bestimmte Phospholipide (Wood et al., 1984).

Der Gehalt an Membran-inkorporierten mehrfach ungesättigten ω -3 und ω -6 Fettsäuren (MUFs), die eine Art „physikochemischer Gegenspieler“ des Cholesterols darstellen, indem sie die Membranviskosität herabsetzen, nimmt im Laufe des Alterungsprozesses ab (Yehuda

et al., 2002). Zum einen sind MUFs durch ihre geknickte räumliche Struktur direkt an einer Zunahme der Flexibilität der Phospholipid-Acyreste beteiligt, zum anderen wurde insbesondere für ω -3-Fettsäuren nachgewiesen, daß sie die Menge an Cholesterol in neuronalen Membranen verringern können (Horrocks, Harder, 1983). Auch anderen MUFs wie der Docosahexaensäure und weiteren langkettigen Derivaten wird eine Funktion in der Kontrolle des Membrancholesterol-Spiegels sowie des funktionellen Zustands neuronaler Membranen zugeschrieben (Salem, Niebylski, 1995; Yehuda et al., 2002).

Die beschriebene Abnahme des Verhältnisses von poly-ungesättigten zu gesättigten Fettsäuren im alternden Gehirn geht womöglich auf vermehrte Lipidperoxidations-Prozesse und sekundäre Quervernetzungen von ungesättigten Lipidkomponenten zurück (Viani et al., 1991), was *per se* die Membranviskosität und die Phasenübergangstemperatur der betroffenen Lipide erhöht. Diskutiert wird weiterhin eine im Alter veränderte Passage von MUFs bzw. deren Precursor über die Blut-Hirn-Schranke (BHS) bzw. ein reduzierter Einbau von MUFs in die gealterte neuronale Membran (Terracina et al., 1992; Yehuda et al., 2002).

1.2 Lipid-Metabolismus

1.2.1 Periphere extrazelluläre Cholesterol-Homöostase

Lipidsubstanzen wie Cholesterol, Cholesterolester, Triglyceride oder Phospholipide sind wasserunlöslich und werden im Plasma nicht in freier Form, sondern gebunden an Trägerproteine, sogenannte Apolipoproteine, transportiert (Johnson et al., 1997). Apolipoproteine lassen sich in verschiedene Typen unterteilen (A, B, C, D, E, F, G, H, J), von denen unterschiedliche Subtypen bekannt sind. Die Gesamtassoziate aus Lipiden und Proteinen bezeichnet man als Lipoproteine, die sich je nach Lipid-, Fettsäure- und Apoprotein-Zusammensetzung in ihrer Dichte und ihren elektrophoretischen Eigenschaften unterscheiden (Johnson et al., 1997). Gemäß diesen Eigenschaften unterteilt man die Lipoproteine in Chylomikronen, Very-Low-Density-Lipoproteine (VLDL), Intermediate-Density-Lipoproteine (IDL), Low-Density-Lipoproteine (LDL) und High-Density-Lipoproteine (HDL). Periphere Störungen im Lipidstoffwechsel äußern sich vor allem als Hyperlipoproteinämien, d.h. in der pathologischen Vermehrung einer oder mehrerer Lipoproteinfraktionen. Sie lassen sich nach *Fredrickson* typisieren und entsprechend dem assoziierten Atherosklerose-Risiko klassifizieren (Fredrickson, 1971).

Sämtliche Lipoproteine sind in ein eng verwobenes extrazelluläres Transportgeflecht einbezogen. Der größte Anteil des körpereigenen Cholesterols (> 50%) wird durch Eigensynthese in der Leber und in extrahepatischen Geweben bereitgestellt (Johnson et al., 1997). Von hier wird überschüssiges intrazelluläres Cholesterol unter Beteiligung des membranständigen Adenosin-Triphosphat-Binding-Cassette-Transporters (ABCA1) und Bindung von ApoAI auf *Plasma-HDL-Partikel* transferiert, die somit den Körperzellen Cholesterol entziehen (siehe 1.2.2). Entsprechend ihrer Größe und Dichte unterscheidet man verschiedene HDL-Subtypen (z.B. HDL₂- und HDL₃-Partikel) (Johnson et al., 1997). Im Plasma wird das HDL-Cholesterol durch die Lecithin-Cholesterol-Acyltransferase (LCAT) verestert. Ein Teil dieser Cholesterolester wird dann durch das sogenannte Cholesterolester-Transfer-Protein (CETP) im Austausch mit Triglyceriden auf ApoB-haltige IDL oder LDL übertragen, die von der Leber aufgenommen werden können (Dietschy, 1997). Restliche HDL-assoziierte Cholesterolester werden von der Leber unter Beteiligung des SR-BI und Bindung von ApoAI direkt aufgenommen (siehe 1.2.2). In der Leber wird der endogene Cholesterol-Pool mit dem exogenen Nahrungscholesterol „vermischt“. Die bei der Fettresorption in der Darmwand gebildeten Chylomikronen geben Fettsäuren an Muskel- und Fettzellen ab und liefern schließlich als Remnant-Chylomikronen das durch Acyl-Coenzym A:Cholesterol-Acyltransferase (ACAT) veresterte Cholesterol über Bindung von ApoB an sogenannte Remnant-Rezeptoren an die Hepatozyten (Danik et al., 1999; Dietschy, 1997). Die Cholesterolester werden im folgenden in der Leberzelle hydrolysiert. Freies Cholesterol kann dann durch ACAT wiederverestert und gespeichert, oder zusammen mit Apolipoproteinen (ApoB100, ApoC, ApoE), Triglyceriden und Phospholipiden in Form von VLDL erneut ins Plasma sekretiert werden (Danik et al., 1999). Sekretierte VLDL liefern unter Einwirkung von Lipoproteinlipase freie Fettsäuren für die umliegenden Gewebe und gehen somit in HDL oder IDL über. IDL können über den LDL-Rezeptor vermittelt durch ApoE und ApoB100 wiederum in die Leberzelle aufgenommen werden. Gleichfalls können sie sich nach Triglyceridabspaltung in LDL-Partikel umwandeln (Danik et al., 1999; Dietschy, 1997). *LDL sind das primäre Transport- und Verteilungsvehikel für Cholesterol im menschlichen Plasma.* LDL-Partikel verwenden den LDL-Rezeptor-Pathway zur Aufnahme in Leberzellen oder extrahepatische Gewebe und liberieren zellulär Cholesterol und Cholesterolester (siehe 1.2.2). Alternativ können LDL-Partikel über andere Proteine der LDL-Rezeptor-Familie wie das sogenannte *LDL-Rezeptor-related Protein* (LRP) in Körperzellen aufgenommen werden (Danik et al., 1999).

1.2.2 Periphere intrazelluläre Cholesterol-Homöostase

Die fein regulierte intrazelluläre Cholesterol-Homöostase dient zur Aufrechterhaltung eines weitgehend konstanten zellulären Cholesterolspiegels unter Bedingungen wechselnden Cholesterolangebots und -bedarfs (Johnson et al., 1997; Liscum, Munn, 1999). Die Cholesterolmenge einer jeden Zelle wird im wesentlichen durch Influx, Efflux und Neusynthese von Cholesterol bestimmt (Abb. E5). Die Gesamtmenge an Cholesterol einer Zelle bildet dabei ein dynamisches System und ist nicht statisch verteilt. So zyklisiert in Ratten-Hepatoma-Zellen der PM-Cholesterol-Pool zwischen ER und PM mit einer HWZ von etwa 40 Minuten (Lange et al., 1993). Auf zellulärer Ebene ist das molare Verhältnis von Cholesterol zu Phospholipid in der PM am größten (etwa 8:10), in der insgesamt etwa 65-80% des zellulären Cholesterol-Gehalts unter Steady-state-Bedingungen lokalisiert sind (Ikonen, 1997; Slotte, 1997; Liscum, Munn, 1999). In cytoplasmatischen Membrankompartimenten nimmt das Cholesterol:Phospholipid-Verhältnis mit zunehmender Orientierung zum Zellinneren deutlich ab (Liscum, Munn, 1999). So ist z.B. die innere Mitochondrienmembran nahezu cholesterolfrei, im ER beträgt das Verhältnis etwa 3:10 (Liscum, Munn, 1999). Diese ungleichmäßige intrazelluläre Cholesterolverteilung korreliert weitestgehend mit dem Sphingomyelingehalt der jeweiligen Membrankompartimente (Ikonen, 1997; Slotte, 1997; Liscum, Munn, 1999). Faktoren, die die uneinheitliche Distribution von Cholesterol und anderen Lipiden wie Sphingomyelin in der Zelle determinieren, sind zum größten Teil unbekannt (Wood et al., 1999). Igbavboa et al. (1997) konnten zeigen, daß die exofaciale Cholesterolmenge in SPM von apoE- und LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen signifikant gegenüber Kontrollen erhöht ist, was eine Beteiligung beider Proteine an diesem Regulationsprozess wahrscheinlich macht. In ähnlicher Weise läßt sich *in vitro* die Leaflet-Cholesterolverteilung der PM verschiedener Zellen durch Variation bestimmter MUF-Spezies (Schroeder et al., 1990) als auch des Sphingomyelin-Gehalts (Slotte, 1997) verändern. In der Literatur finden sich weitere Kandidaten wie FABPs, SCP-2 oder auch NPC1, denen eine Rolle bei der Regulation der zellulären Cholesteroldistribution zugeschrieben wird (zur Übersicht siehe Wood et al., 1999, 2001). SCP-2 und FABPs gehören zur Gruppe der löslichen Lipid-Transfer-Proteine (LTPs) (Schmitz, Orso, 2001).

Entsprechend ihrem Cholesterolgehalt repräsentiert die PM die primäre aktive Cholesterol-Speicher-Domäne der Zelle. Die Golgi-Membranen fungieren als Cholesterol-Transport-Domänen, wohingegen das ER als Ort der Cholesterol-Biosynthese und -Veresterung als

wichtigste zelluläre Cholesterol-Sensor-Domäne der Zelle fungiert (Sviridov, 1999). Im ER befindet sich die Schaltzentrale zur Regulation der zellulären Cholesterolmenge. Sinkt der Cholesterolspiegel z.B. infolge eines übermäßigen endogenen Bedarfs deutlich ab, so werden Transkriptionsfaktoren (sogenannte SREBPs) aktiviert, die die zelluläre Cholesterol-Biosynthese und Aufnahme kontrollieren, (Brown, Goldstein, 1997; Simons, Ikonen, 2000). SREBPs sind im Normalzustand an Aktivierungsproteine, sogenannte SCAP, gebunden, und als SREBP-SCAP-Komplex über ein ER-Retentionsprotein inaktiv an das ER assoziiert (Simons, Ikonen, 2000). SCAPs besitzen eine Cholesterol-Sensor-Domäne, so dass sie bei fallenden Cholesterolspiegeln ihre Konformation verändern, was die Bindung zum ER-Retentionsprotein aufhebt (Brown, Goldstein, 1997). Der aktivierte Komplex wandert zum Golgi-System, wo zwei proteolytische Spaltungen aktives SREBP freisetzen. Dieses wird zum Nukleus transportiert, wo es die Transkription bestimmter Gene, die z.B. für die HMG-CoA-Reduktase, den LDL- oder den LRP-Rezeptor kodieren, über Bindung an das „*sterol regulatory element*“ der jeweiligen Promotorregion, heraufreguliert (Brown, Goldstein, 1997). Daneben inhibieren SREBPs die Gen-Transkription von am Cholesterol-Efflux beteiligten Proteinen wie Caveolin-1 (Bist et al., 1997).

Im umgekehrten Fall führen hohe zelluläre Cholesterolspiegel zu einer SREBP-SCAP-Retention am ER und damit zu einer Hemmung der Transkriptionskaskade (Brown, Goldstein, 1997). Dadurch wird die durch Substrat-Verfügbarkeit determinierte Aktivität der ACAT gesteigert, was zu einer verstärkten Speicherung von Cholesterolestern in zellulären Lipidtröpfchen führt (Johnson et al., 1997). Vermittelt durch eine Sterol-Sensing-Domäne hemmen hohe Cholesterolspiegel zudem die HMG-CoA-Reduktase-Aktivität (siehe 1.3.1). In ihrer Gesamtheit ermöglichen diese Feedback-regulierten Kontrollsysteme der Zelle eine hohe Anpassungsfähigkeit an aktuelle Bedürfnisse.

Die intrazelluläre Verschaltung unterschiedlicher Cholesterol-Pools erfordert effektive und leistungsfähige Transportsysteme zu den einzelnen Zellkompartimenten. Diese Transportsysteme umfassen sowohl membranäre Carrier als auch Transportproteine (zur Übersicht siehe Liscum, Munn, 1999; Wood et al., 1999). Im ER synthetisiertes Cholesterol gelangt in der Zelle vermutlich unter ATP-Verbrauch über einen cytosolischen Caveolin-Chaperon-Komplex (Transport-HWZ ~ 10 Minuten) zur PM (Golgi-Bypass-Route) (Uittenbogaard et al., 1998), und wird dort zunächst in Caveolae-Domänen eingelagert (Abb. E5) (Fielding, Fielding, 1995; Smart et al., 1996). In der Literatur wird auch SCP-2 als möglicher Carrier für ER-Cholesterol diskutiert (Simons, Ikonen, 2000). Wenngleich *in vitro*

Untersuchungen darauf hinweisen, dass SCP-2 den Transfer von Cholesterol und Phospholipiden zwischen Membrankompartimenten fördert, so scheint seine tatsächliche Rolle im Rahmen des zellulären Sterol-Metabolismus eher indirekt zu sein (Gallegos et al., 2001). Alternativ kann Cholesterol entlang des sekretorischen Stoffwechselweges über den Golgi-Komplex und einen sekundär gerichteten Transport mittels intrazellulärer Raft-Flöße zur PM gelangen (Fielding, Fielding, 1997; Sviridov, 1999) (Abb. E5).

Auch in umgekehrter Richtung gelangt Cholesterol von der PM zum Zellinneren und durchläuft somit einen hochfrequenten Kreislauf. Dieser energieunabhängige Transport läßt sich durch Agentien unterbrechen, die cytoskelettale Strukturen und saure Zellkompartimente zerstören, so daß ein vesikulärer Transport wahrscheinlich ist (Liscum, Munn, 1999).

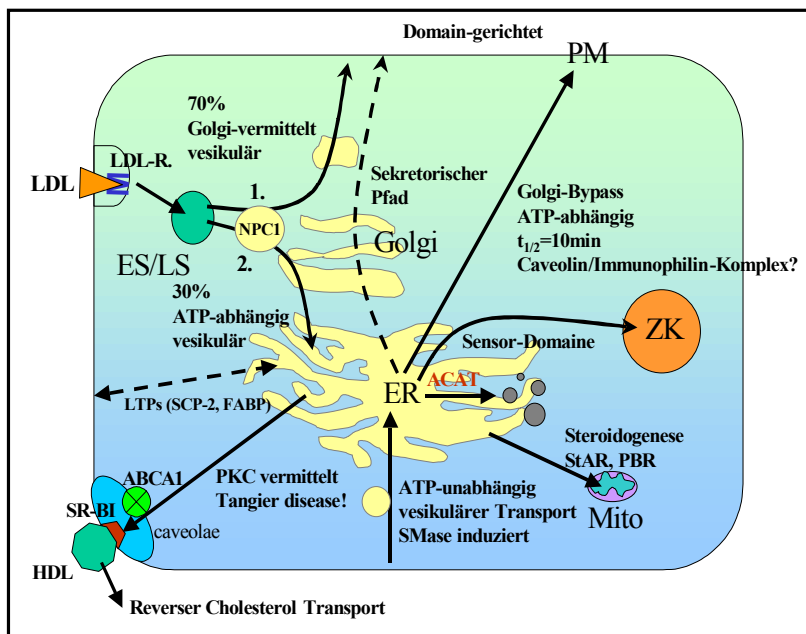


Abb. E5. Intrazelluläre Cholesterol-Homöostase. Der zelluläre Cholesterol-Spiegel resultiert aus den feedback-regulierten Prozessen Influx, Efflux und Neusynthese. Das zelluläre Cholesterol ist dabei Teil eines dynamischen Fließgleichgewichts. ES = Endosom, LS = Lysosom, Mito = Mitochondrium, ZK = Zellkern; sonstige Abkürzungen siehe Text bzw. Abkürzungsverzeichnis.

In vitro Untersuchungen an Zellkulturen weisen darauf hin, daß die sub-kompartimentelle Cholesterolverteilung der PM entscheidend an der Zugänglichkeit des Cholesterols zu diesem bislang unbekanntem, womöglich an die Funktionalität von p-Glykoprotein (ABCA1) gekoppelten Transportsystem beteiligt ist (Debry et al., 1997; Liscum, Munn, 1999), welches PM-Cholesterol den intrazellulären Feedback-Regelsystemen zuführt (Simons, Ikonen, 2000). Die Degradation von Sphingomyelin mittels Sphingomyelinase induziert an Fibroblasten unter Bedingungen konstanter zellulärer Cholesterolspiegel eine Cholesterol-Umverteilung von der PM zum ER, verbunden mit einer erhöhten Cholesterolester-Produktion und einer Hemmung der SREBP-Spaltung (Slotte, Bierman, 1988).

PM-Cholesterol bildet nicht nur mit intrazellulären Domänen ein Fließgleichgewicht, sondern auch mit extrazellulären Akzeptoren und Donoren. Vermutlich kann Cholesterol - vermittelt über bestimmte Kinetic-Pools - die PM von Zellen durch Desorptionsprozesse und anschließenden Lipoproteintransfer, durch Membranfluß (sogenanntes *membrane shedding*), sowie durch HDL-induzierten, rezeptorvermittelten Efflux verlassen (Johnson et al., 1991; Liscum, Munn, 1999). Als Hauptquelle für extrahierbares Cholesterol dient vermutlich nicht Raft-assoziiertes Cholesterol (Simons, Ikonen, 2000; Wood et al., 2002). Beim Lipoprotein-induzierten Cholesterol-Efflux bindet Apolipoprotein AI an den in Caveolae-Domänen lokalisierten SR-BI, wodurch sekundär ein Protein-Kinase C-vermittelter Cholesteroltransport zur PM aktiviert wird (Liscum, Munn, 1999) (Abb. E5). Hier übernimmt ABCA1 als Flippase die Leaflet-Translokation von Cholesterol und Phospholipiden, die somit das exofaciale Membranblatt erreichen und schließlich auf die rezeptorgebundenen HDL-Partikel übergehen (*Reverse Cholesterol Transport*) (Liscum, Munn, 1999; Schmitz, Orso, 2001). Auf gleichem Weg verlassen auch Oxysterole die Zelle und gelangen zur Leber. Defekte in diesem ABCA1-vermittelten Pathway sind höchstwahrscheinlich ursächlich am Krankheitsbild der Tangier Disease beteiligt, bei der es zu massiven intrazellulären Cholesterolester-Ablagerungen in Makrophagen verschiedener Gewebe kommt (Oram, 2002).

In Analogie zum Cholesterol-Efflux läuft auch der zelluläre Cholesterol-Influx entweder über Desorptionsprozesse oder über rezeptorvermittelten Lipoproteintransfer ab. Der quantitativ wichtigste Prozess hierbei ist die LDL-Rezeptor-vermittelte Aufnahme von LDL-Partikeln über ApoB100 in sogenannten Clathrin-coated pits, d.h. definierten Membraneinstülpungen, die mit Clathrin ausgekleidet sind (Coated Pit-Pathway) (Abb. E5). (Liscum, Munn, 1999; Sviridov, 1999; Schmitz, Orso, 2001). Die Partikel werden über Endozytose internalisiert und zunächst in frühen Endosom-Kompartimenten sortiert. Der LDL-Rezeptor zyklisiert zurück zur PM. Die Vesikel verschmelzen mit Lysosomen, in denen der Proteinanteil der LDL-Partikel zu freien Aminosäuren verdaut und gleichfalls die Cholesterolester hydrolysiert werden (Schmitz, Orso, 2001). Von diesen späten endo- und lysosomalen Kompartimenten wird das Cholesterol entweder weiter zu Caveolae-Strukturen der PM oder zum ER sortiert, wo freies Cholesterol das Enzym ACAT stimuliert und dadurch zur Speicherung wiederverestert wird (Liscum, Munn, 1999). Etwa zwei Drittel des lysosomalen Cholesterols gelangen dabei vermutlich über einen Golgi-abhängigen Transportweg zur PM (Liscum, Munn, 1999). Der Cholesteroltransfer von Lysosomen zum ER läuft dagegen energieabhängig und vermutlich vesikulär ab, eventuell unter Beteiligung bestimmter Carrier-Proteine (Golgi-

Bypass) (Liscum, Munn, 1999). Beschrieben ist allerdings auch ein retrograder Transport zum ER über den Golgi-Komplex (Simons, Ikonen, 2000).

An sämtlichen Transportwegen ausgehend von lysosomalen Kompartimenten scheint das sogenannte Niemann-Pick Typ C Protein 1 (NPC1) beteiligt zu sein (Abb. E5). NPC1 ist ein integrales Membranprotein aus 1278 Aminosäuren. Es weist eine Sterol-Sensing-Domäne vergleichbar derjenigen von SCAP oder HMG-CoA-Reduktase auf und vermag somit vermutlich Cholesterolester direkt zu binden (Ioannou, 2000; Schmitz, Orso, 2001). Intrazellulär zyklisiert NPC1 vesikelgebunden zwischen späten endozytotischen Strukturen. Hohe Konzentrationen an lysosomalem Cholesterolester vermögen womöglich an der NPC1-Sensor-Domäne Konformationsänderungen zu induzieren, die sekundär eine NPC1-Translokation und einen gerichteten Vesikeltransport zur Zielmembran initiieren (Liscum, Munn, 1999). In Analogie hierzu akkumulieren Patienten, die an der Niemann Pick Typ C Krankheit und damit an einem genetischen Defekt des NPC1- bzw. NPC2-Proteins leiden, große Mengen an lysosomalem Cholesterolester, das somit der zellulären Feedback-Regulation entzogen wird (Yamazaki et al., 2001). Weiterhin zeigen die geistig retardierten NPC-Patienten neuronale Ablagerungen bestimmter Glycosphingolipide und Ganglioside, was eine Funktion von NPC1 und NPC2 im zellulären Transportgeschehen auch anderer Lipide als Cholesterolester wahrscheinlich macht (Schmitz, Orso, 2001).

Einige Körperzellen wie Hepatozyten oder steroidogene Gewebszellen weisen bezüglich des intrazellulären und membranären Fluxes von Cholesterolester bestimmte Besonderheiten auf. Neben der VLDL-Assoziation und Sekretion (siehe 1.2.1) nehmen Hepatozyten Cholesterolester nach HDL-Bindung an caveoläre SR-BI-Proteine auf und dirigieren das freie Cholesterolester nach Hydrolyse vornehmlich in die Galle, oder auch in die Gallensäuresynthese (Liscum, Munn, 1999). Grundsätzlich unterliegt die SR-BI-vermittelte Aufnahme von Lipoproteinen keiner zellulären Feedback-Kontrolle, so dass es bei einem Überangebot an Sterolen in Körperzellen wie Hepatozyten oder Makrophagen, die das SR-BI-Transportsystem nutzen, zu massiven Cholesterolester-Akkumulationen kommen kann (Schmitz, Orso, 2001).

In steroidogenem Gewebe bewerkstelligen zwei intrazelluläre Proteine im Zusammenspiel den Cholesterolestertransfer in die innere Mitochondrienmembran. Hierbei handelt es sich um das *Steroidogenic acute regulatory protein* (StAR) und den *Peripheren Benzodiazepin-Rezeptor* (PBR) (Abb. E5) (Liscum, Munn, 1999).

1.2.3 Zentrale Lipid-Homöostase

1.2.3.1 Besonderheiten

Obleich das ZNS nur 2% der totalen Körpermasse ausmacht, enthält es doch nahezu ein Viertel des gesamten körpereigenen freien Cholesterols (Dietschy, Turley, 2001). Dieses *zentrale Cholesterol* ist im wesentlichen auf zwei Pools verteilt. Zum einen auf den PM-Cholesterol-Pool von Glia-Zellen und Neuronen, zum anderen auf den Membran-Pool des Myelins (Dietschy, Turley, 2001). Der tägliche Turnover des zentralen Cholesterols beträgt im Menschen nur 0.02% (0.09 mg/kg K.G./Tag bei einem ZNS-Cholesterol-Pool von etwa 460 mg/kg K.G.) und ist damit um etwa den Faktor 100 langsamer als der Cholesterol-Flux im gesamten menschlichen Körper. Dieser beträgt 10 mg/kg K.G./Tag bei einem Gesamt-Pool von 2200 mg/kg K.G. (Björkhem et al., 1998). Derartige Umsatzraten können von Spezies zu Spezies deutlich variieren. So beträgt der Cholesterol-Turnover im Gehirn der Maus ca. 0.4 - 0.45% des ZNS-Cholesterol pro Tag (1.4 mg/kg K.G./Tag bei einem ZNS-Cholesterol-Pool von 330 mg/kg K.G.) (Xie et al., 2000).

Die zentrale Stoffwechsel-Homöostase ist durch die sogenannte Blut-Hirn-Schranke (BHS) vom peripheren Metabolismus getrennt. Diese Barriere trennt gleichfalls den zentralen Cholesterol-Pool vom Plasma-Pool ab. Bisher gibt es keinen Hinweis darauf, dass Lipoprotein-Cholesterol vom Plasma über die BHS in das ZNS penetriert (Turley et al., 1998; Dietschy, Turley, 2001). Nahezu der gesamte Bedarf an Cholesterol im ZNS wird durch *in situ* Synthese im Gehirn selbst gedeckt, wobei die initial sehr hohe Syntheserate im Laufe des Entwicklungsprozesses deutlich abnimmt (Dietschy, 1997; Morell, Jurevics, 1997; Turley et al., 1998). Die höchsten Syntheseleistungen finden sich bei unterschiedlichen Spezies folglich in Neugeborenen, die niedrigsten im gealterten Organismus, so dass die Cholesterolgehalte verschiedener Hirnregionen postnatal nachhaltig ansteigen und schließlich in einen Steady-state übergehen (Dietschy, 1997; Morell, Jurevics, 1997). Paradox in diesem Zusammenhang erscheint die Tatsache, dass cholesterolreiche Nahrung in Nagern metabolische Veränderungen im Gehirn auszulösen vermag, die auf bislang unbekannte Signaltransduktionswege zwischen peripherem und zentralem Lipid-Pool schließen lassen (Sparks et al., 1994; Refolo et al., 2000, 2001).

Unter Steady-State-Bedingungen verläßt überschüssiges ZNS-Cholesterol das zentrale Kompartiment primär durch geregelte Exkretion des Cholesterol-Metaboliten 24-S-Hydroxycholesterol (Lütjohann et al., 1996, 2001; Björkhem et al., 1997). Die neuronale

Sterol-Hydroxylase CYP46 (ein Mitglied der CYP450-Subfamilie) katalysiert diese Sterol-Derivatisierung (Lund et al., 1999) (siehe auch 1.4.2.4). Neue Befunde zeigen, dass der Flux von 24-S-Hydroxycholesterol in neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer Demenz oder der Niemann-Pick Typ C Krankheit erhöht ist (Lütjohann et al., 2000; Dietschy, Turley, 2001). Der Plasma-24-S-Hydroxycholesterol-Spiegel scheint dabei mit der Schwere der Demenz von Alzheimer-Patienten korreliert zu sein (Lütjohann et al., 2000). Da im Steady-State die Output-Rate von 24-S-Hydroxycholesterol die Syntheserate von ZNS-Cholesterol nicht vollständig kompensiert, müssen zudem noch andere Exkretionssysteme für den Sterol-Flux aus dem ZNS verantwortlich sein (Dietschy, Turley, 2001).

Auch innerhalb des ZNS wird Cholesterol unter Beteiligung verschiedener Lipoproteine und deren Rezeptoren im Rahmen von Wachstums-, Umbau- oder neuronalen Restorationsprozessen „intern recycelt“ (siehe 1.2.3.2). Zentrale CSF- oder Gewebs-Lipoproteine unterscheiden sich dabei in ihrer Größe, Struktur und Komposition zum Teil deutlich von Plasma-Lipoproteinen, was auf posttranslationale Protein-Modifikationen bzw. auf Lipoprotein-Umbau schließen lässt (Danik et al., 1999). Unklar ist, inwieweit bestimmte CSF-Lipoproteine an der Lipid-Clearance des ZNS beteiligt sind (Danik et al., 1999).

1.2.3.2 Zentrale extrazelluläre Cholesterol-Homöostase

Der extrazelluläre Cholesterol-Flux im ZNS ist bis heute in vielen Bereichen noch weitgehend unerforscht. *In vitro* Untersuchungen an peripheren und zentralen Nervenzellen belegen, daß vorrangig ApoE-, aber auch ApoAI-Proteine im Rahmen von neuronalen Reparatur- und Umbauprozessen Cholesterol von degenerierendem Gewebe aufnehmen und unter Vermittlung von Rezeptoren der LDL-Familie (LDL-Rezeptor, LRP, apoER2, VLDLR, Megalin) an intakte Zellen wie Glia-Zellen oder Neuronen weitergeben (Wood et al., 1999; Dietschy, Turley, 2001). apoE-knockout-Mäuse weisen einen deutlichen Verlust an Nerven-Terminalen im Vergleich zu Kontrolltieren auf (Masliah et al., 1995), was auf eine wichtige Funktion dieses Proteins im Rahmen der neuronalen Lipid-Homöostase hindeutet (Wood et al., 1999). *In vivo* Daten an Ratten geben Hinweise darauf, dass nach zentralen Läsionen ApoE-assoziiertes Cholesterol neuronal und astrozytär aufgenommen werden kann, und dann im Zusammenspiel mit dem endogenen zellulären Cholesterol-Pool Feedback-regulatorisch die Aktivität von Enzymen wie der HMG-CoA-Reduktase mitbeeinflusst (Poirier et al., 1993). In geringerem Ausmaß sind wahrscheinlich auch ApoD und ApoJ an neuronalen Lipid-Transportprozessen beteiligt und können im Zusammenspiel mit apoER2 oder VLDLR

kompensatorische Funktionen beim Ausfall anderer Apolipoprotein-Systeme übernehmen (Redundanz) (Dietschy, Turley, 2001). So zeigen z.B. apoAI-, apoE- oder LDL-Rezeptor-knockout-Tiere *in vivo* keine nennenswerte Beeinflussung der zentralen Cholesterolemie, der ZNS-Entwicklung, oder der nervalen Regeneration, die man analog den peripheren Stoffwechsel-Begebenheiten erwarten würde (Goodrum et al., 1995; Trommsdorff et al., 1999; Wood et al., 1999; Eckert et al., 2001a). Zentrale Entwicklungsdefekte treten hingegen in apoER2/VLDLR-Doppel-knockout-Tieren auf (Trommsdorff et al., 1999).

Inwieweit Lipoprotein-vermittelter Cholesteroltransport auch für die normale, nicht Läsions-assoziierte neuronale Cholesterolemie bedeutsam ist, bleibt unklar. Auch gibt es für eine Beteiligung von HDL-ähnlichen zellulären Efflux-Systemen im ZNS nur indirekte Anhaltspunkte (Wood et al., 1999). Bis auf ApoAI werden anscheinend alle Apolipoproteine im Gehirn selbst (vornehmlich astrozytär) synthetisiert und exkretiert (Danik et al., 1999). ApoAI erscheint hingegen vorrangig nach Filtration über die BHS im CSF des zentralen Kompartiments (Danik et al., 1999).

1.2.3.3 Zentrale intrazelluläre Cholesterolemie

Das intrazelluläre neuronale Cholesterolemie-Recycling *in vivo* direkt nachzuweisen gestaltet sich sehr schwierig. Neuronen weisen nur einen sehr geringen Gehalt intrazellulärer Cholesterolester auf, was auf eine sehr stringent und effektiv regulierte neuronale Cholesterolemie hindeutet (Schmitz, Orso, 2001). Vergleichbar anderen Körperzellen müssen auch Zellen des ZNS wie z.B. Neuronen eine kontinuierliche Versorgung mit unverestertem Cholesterolemie aufrechterhalten, um ihre Bedürfnisse abzudecken. Diese Versorgung läuft analog zur Peripherie zum einen über *de novo* Synthese, zum anderen über Sterol-Influx von extrazellulären Kompartimenten (Schmitz, Orso, 2001). So konnten Xie et al. (2000) an NPC1-Mutanten der Maus eine intrazelluläre Cholesterolemie-Akkumulation im Hirngewebe der Tiere nachweisen und damit einen ersten *in vivo*-Beweis dafür liefern, dass auch das zentrale Cholesterolemie-Recycling substantiell über den NPC1-assoziierten Coated-Pit-Pathway verläuft. Weitere putative Cholesterolemie-Transportproteine, die im Gehirn exprimiert werden und womöglich am zentralen intrazellulären Cholesterolemie-Flux in Glia und Neuronen partizipieren, sind SCP-2, Caveolin, FABPs als auch OSBPs (Wood et al., 1999; Schmitz, Orso, 2001). Mitglieder der Familie der FABP wie H(Heart)-FABP oder B(Brain)-FABP binden Cholesterolemie nicht direkt, zeigten aber in *in vitro* Untersuchungen, daß sie sehr wahrscheinlich den intermembranären Cholesterolemie-transport beeinflussen (Schmitz, Orso, 2001). Auch

Mitglieder der OSBP-Familie werden in neuronalen Zellen expremiert und sind *in vivo* an der zellulären Sterol-Homöostase im Gehirn beteiligt (Laitinen et al., 1999).

Protein-Transporter im ZNS sind womöglich an der Translokation von neuronalem Cholesterol vom Zellkörper (dem Ort der Cholesterol-Biosynthese) hin zum Axon sowie an der Regulation der membranären Cholesterolverteilung beteiligt (siehe 1.2.2), wenngleich es hierfür noch keine direkten experimentellen Nachweise gibt. Auch die Rolle von intrazellulären Raft-Flößen, Caveolin/Protein-Komplexen und anderen vesikulären Transportvehikeln im ZNS ist unklar. Neuronen weisen als hochgradig polarisierte Zellen somato-dendritische und apikale Membran-Makrodomänen auf, die sich in ihrer funktionellen Ausstattung mit Signalmolekülen deutlich voneinander unterscheiden. Möglicherweise sind vesikuläre Raft-Strukturen und gerichteter Membrantransport an der Ausbildung dieser Zellpolarität maßgeblich beteiligt (Ledesma et al., 1998).

1.3 Statine - etablierte Wirkstoffe in neuem Licht

1.3.1 Physikochemie und Wirkung der Statine

Statine (CSE-Hemmer) sind reversible kompetitive Inhibitoren der HMG-CoA-Reduktase, einem Feedback-regulierten Schlüsselenzym der endogenen zellulären Cholesterol-Biosynthese (Lennernäs, Fager, 1997). Dieses Enzym katalysiert stereospezifisch den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Umsetzung von cytosolischem HMG-CoA zu Mevalonsäure (Volpe et al., 1985). Die wichtigsten Intermediate der Cholesterol-Synthesekaskade sind in Abb. E6 kurz aufgelistet. Die HMG-CoA-Reduktase besitzt eine ER-assoziierte, spaltbare Membran-Domäne, die wiederum eine Sterol-Sensor-Domäne beinhaltet (Sever et al., 2003). Diese vermittelt die rückgekoppelte Initiierung der Enzymhemmung und -degradation bei hohen Zell-Cholesterolspiegeln. Der Aktivitätszustand der HMG-CoA-Reduktase wird über Phosphorylierung durch die sogenannte AMP-abhängige Protein Kinase (AMPK) reguliert (Hardie, Carling, 1997). Eine Enzym-Inhibition durch Phosphorylierung ist somit an niedrige zelluläre ATP-Level gekoppelt (Hardie, Carling, 1997). Im aktiven Zustand bildet das Enzym einen Tetramer-Komplex bestehend aus zwei Dimer-Einheiten aus (Istvan, 2002).

Statine wirken am Enzym als sogenannte Übergangszustand-Analoga und besetzen einen Teil der HMG-CoA-Bindungstasche im aktiven Zentrum (Istvan, 2002). Alle Statine weisen

strukturell einen β -Hydroxy- δ -Lactonring auf, der über eine Ethylbrücke mit einem lipophilen und planaren Hydro-Naphthalin-Derivat verbunden ist (Hamelin, Turgeon, 1998). Die ringoffene, hydrolysierte Form der Lactonstruktur, die aktive 3,5-Hydroxysäure, weist große strukturelle und stereochemische Ähnlichkeit (R,R-Stereochemie) mit dem natürlichen Enzymsubstrat, dem 3S-HMG-CoA bzw. dem intermediär gebildeten Thiohalbacetal auf (siehe Abb. E6). Somit erklärt sich gleichfalls die extrem hohe Affinität der Statine gegenüber der HMG-CoA-Reduktase (Istvan, 2002).

Mittlerweile steht ein breites Spektrum von partial- oder vollsynthetischen Statin-Derivaten zur Verfügung. Lovastatin wurde bereits 1979 aus der Fermentationslösung des Pilzes *Monascus ruber* isoliert (Hamelin, Turgeon, 1998). Als partialsynthetisches Derivat ging hieraus das Simvastatin hervor. Pravastatin als weiterer Vertreter dieser Klasse kann mikrobiologisch mittels *Streptomyces carbophilus* aus Lovastatin gewonnen werden. Die Wirkstoffe Atorvastatin, Fluvastatin und Cerivastatin sind alle vollsynthetisch erzeugt. Bis auf Fluvastatin werden alle Hemmstoffe der HMG-CoA-Reduktase in Form des aktiven Enantiomers verabreicht, was die metabolische Belastung des Körpers deutlich senkt. Die eingesetzten mittleren Tagesdosen bewegen sich im Bereich von 10-40 mg/Tag (Lennernäs, Fager, 1997; Lousberg et al., 2001). Lediglich Cerivastatin machte hier infolge seiner extrem hohen Bindungsaffinität zum Zielenzym eine Ausnahme. Hier lagen die eingesetzten Tagesdosen bei 0.1-0.3 mg (Bischoff, Heller, 1998). Diese hohe Wirkpotenz schien allerdings mit einem erhöhten Risiko für schwerwiegende UAWs einherzugehen (Williams, Feely, 2002; Staffa et al., 2002). Im Rahmen der sogenannten Lipobay®-Affäre kam es bei der Therapie mit Cerivastatin gehäuft zu tödlichen Komplikationen infolge schwerwiegender Myopathien bzw. Rhabdomyolyse (Staffa et al., 2002). In Konsequenz dieser Vorfälle wurden sämtliche Cerivastatin-Präparate vom Markt genommen. Andere Statine weisen bezüglich des Rhabdomyolyse-Risikos eine wesentlich bessere Sicherheitsprofil aus, was sich vermutlich anhand der jeweiligen pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Wirkstoff-Interaktionen erklären läßt (Williams, Feely, 2002). Die Metabolisierung der Statine erfolgt mit Ausnahme von Pravastatin am Cytochrom-System, allerdings mit unterschiedlicher Isoform-Subspezifität (Williams, Feely, 2002).

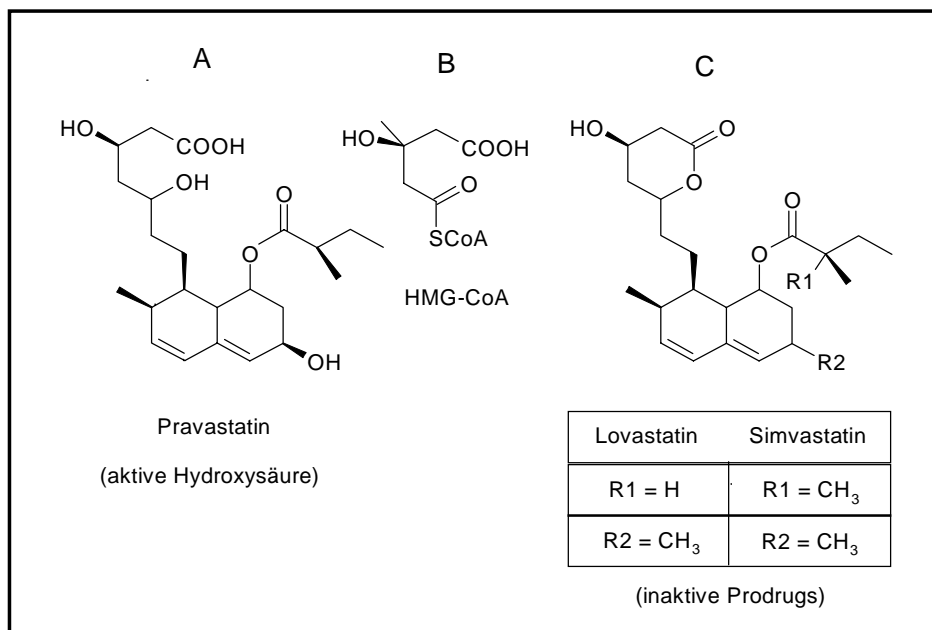


Abb. E6. Grundstruktur ausgewählter Statine (A,C) im Vergleich zum Substrat-Analogen HMG-CoA (B). Lovastatin und Simvastatin sind lipophile Prodrugs (C), Pravastatin ist eine hydrophile Hydroxysäure (A). Man beachte die stereochemische Analogie von Substrat und Inhibitor.

Die zur Zeit auf dem Markt befindlichen Statine unterscheiden sich grundsätzlich kaum in ihrem Interaktions- und Nebenwirkungsspektrum, ihrer Pharmakokinetik, und ihrer Wirkpotenz. Hervorzuheben ist allerdings die Tatsache, dass einige Wirkstoffe als Prodrugs mit intakter Lactonstruktur vorliegen (Lovastatin, Simvastatin), wohingegen andere bereits in der Grundstruktur die aktive Form der 3,5-Dihydroxysäure aufweisen (Pravastatin, Fluvastatin, Atorvastatin, Cerivastatin) (Hamelin, Turgeon, 1998) (Abb. E6).

Die Grundstruktur der CSE-Hemmer bestimmt gleichfalls die physikochemischen Substanzeigenschaften. Statine mit geöffnetem Lactonring sind wesentlich hydrophiler als ihre Prodrug-Analoga und vermögen infolgedessen wesentlich schlechter in lipophile Körperkompartimente zu penetrieren (Hamelin, Turgeon, 1998). So ist Pravastatin so gut wie nicht ZNS-gängig, wohingegen Lovastatin und Simvastatin die BHS zu einem gewissen Grad penetrieren und im CSF von Versuchsubstanzen nachweisbar sind (Botti et al., 1991; Saheki et al., 1994). Mild ausgeprägte zentrale Statin-Einflüsse auf einzelne Schlafstadien sowie das tägliche Leistungsverhalten sind dementsprechend nur für lipophile Statin-Derivate nachweisbar (Vgontzas et al., 1991; Roth et al., 1992). Die *in vivo* Aktivität eines Energie-abhängigen Säure-Carriers an der BHS, der ringoffene Derivate wie Pravastatin in das zentrale Kompartiment transportiert (Tsuji et al., 1993), scheint angesichts der dokumentierten *in vivo* CSF-Spiegel von Pravastatin fraglich (Botti et al., 1991). Nicht auszuschließen ist die Möglichkeit, daß die ringoffenen, sauren Derivate direkt bzw. nach Metabolisierung über Efflux-Pumpen wie p-Glykoprotein sehr schnell wieder aus dem ZNS entfernt werden (Dimitroulakos, Yeager, 1996; Wang et al., 2001).

Bezüglich der Gewebeverteilung der einzelnen Statine fällt die hohe Leberselektivität der Wirkstoffe auf. Ein intakter Lactonring wird im Körper in der Leber rasch zur entsprechenden Hydroxycarbonsäure hydrolysiert (First-pass-Effekt), so daß fast ausschließlich die aktive Wirkform in den systemischen Kreislauf gelangt (Lennernäs, Fager, 1997). Prodrugs erlangen somit ihre hohe Selektivität durch die direkte Aktivierung in der Leber. Sie induzieren niedrige Wirkstoffspiegel im Plasma sowie in anderen Organen wie Ovarien oder Nebennierenrinde (Koga et al., 1992; Sirtori, 1993). Durch die aktive Carrier-vermittelte Leberzell-Aufnahme von freien Hydroxysäure-Derivaten wie Pravastatin (Komai et al., 1992; Nakai et al., 2001) weisen auch die ringoffenen Substanzen eine hohe Leberselektivität auf (Koga et al., 1992). Diese bedingt die hohe Wirkeffektivität der Statine, denn vor allem in der Leber werden täglich sehr große Mengen an Cholesterolem bzw. cholesterolem- und lipidreichen Lipoproteinen wie LDL verstoffwechselt (siehe 1.2).

Wird die zelluläre Cholesterolem-Synthese exogen durch Statine gehemmt, so kann die Leber in der Konsequenz weniger Lipoprotein-assoziiertes Cholesterolem produzieren und freisetzen. Vermittelt über sekundäre, genregulatorische Mechanismen entlang des SREBP/SCAP-Pathways, exprimieren die Leberzellen zur Aufrechterhaltung der Lipidhomöostase vermehrt LDL-Rezeptoren an ihrer Oberfläche und entziehen somit dem Plasma LDL-inkorporiertes Cholesterolem, was den Plasma-LDL-Spiegel nachhaltig senkt (Lennernäs, Fager, 1997) (siehe 1.2). Steigende zelluläre Cholesterolem-Spiegel sensibilisieren in späteren Stadien die Sterolem-Sensing-Domäne von SCAP, wodurch der SREBP/SCAP-Pathway und damit die weitere zelluläre Cholesterolem-Aufnahme regulatorisch inhibiert werden (Brown, Goldstein, 1997). Weiterhin hemmen Statine in Leberzellen die Synthese von Apolipoprotein B100 und damit die Sekretion von ApoB-haltigen Lipoproteinen (Battula et al., 2000).

Nicht bei allen Spezies sind LDL-Carrier die vorherrschende Cholesterolem-Transportform im Plasma (Krause, Newton, 1995; Krause, Princen, 1998). Aufgrund dieser Tatsache und infolge einer möglichen gegen-regulatorischen Überexpression der HMG-CoA-Reduktase bei externer Enzym-Blockade bleibt der peripher cholesterolem-senkende Effekt der Statine bei manchen Säugerspezies wie Mäusen aus (Krause, Princen, 1998).

1.3.2 Indikationen der Statine

Mit der nachhaltigen Senkung des LDL-Cholesterolem-Spiegels beim Menschen durchbrechen Statine einen zentralen Pathomechanismus bei der Entstehung von Koronarsklerosen im Rahmen der koronaren Herzkrankheit (KHK). Herz-Kreislauf-Erkrankungen rangieren in den

westlichen Industrienationen an Position eins der häufigsten Todesursachen. Tödliche Komplikationen kommen hierbei in erster Linie durch KHK oder apoplektischen Insult zustande. Ursächlich geht das Krankheitsgeschehen in beiden Fällen meist auf arteriosklerotische Gefäßveränderungen (Stenosen) zurück. Als Arteriosklerose beschreibt man eine multifaktorielle Systemerkrankung, bei der es in fortgeschrittenen Stadien zur entzündlichen Verdickung und Verhärtung der Gefäßwand von Körperarterien kommt (Scott, 2002). Als gesicherte Hauptrisikofaktoren für das Auftreten einer Arteriosklerose gelten heute neben Hyperlipidämien bzw. Hypercholesterinämien vor allem arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus, Nikotin, sowie die IMT (Intima-Media-Dicke) (Frohlich, Lear, 2002). Diese unterschiedlichen Stimuli bewirken im Verlauf der Erkrankung metabolische und zelluläre Reaktionen der Gefäßwand sowie Veränderungen des Endothelfilms der Intima (endotheliale Dysfunktion), gekennzeichnet durch eine Inaktivierung von radikalischem NO und die Ausschüttung vasogener Substanzen (Napoli, 2002; Scott, 2002). Immunkompetente Zellen unterhalten eine chronische Entzündungsreaktion, gleichfalls kommt es zu einer verstärkten Proliferation von Bindegewebs- und Muskelzellen (Scott, 2002). LDL-Partikel werden nach transendotheliale Transport an die extrazelluläre Matrix der Intima gebunden, dort oxygeniert, und von Makrophagen phagozytiert. Die Makrophagen sterben als sogenannte Schaumzellen ab und verkleben im Plaque-Gebiet das Gefäß (Scott, 2002). Durch eine Ruptur instabiler Plaques und Anheftung von Blutplättchen kann sich schließlich ein manifester Thrombus ausbilden, der nach Ablösung in weitere Körperregionen geschwemmt werden kann (Embolie).

Ihre Wirksamkeit in der Primär- und Sekundärprävention der KHK als auch der Primärprävention des Schlaganfalls haben Statine in zahlreichen groß angelegten klinischen Studien nachhaltig unter Beweis gestellt (in Übersicht bei Lousberg et al., 2001). Tabelle E2 zeigt eine Auswahl an randomisierten und kontrollierten Doppelblindstudien mit hartem Endpunkt. Zusammengefaßt bedingen Statine dosisabhängig eine signifikante Senkung des Serum-LDL-Cholesterols um 20-60% sowie eine leichte Senkung der Triglyceride (10-30%). In therapeutischen Dosen konnten Pravastatin, Lovastatin und Simvastatin zudem eine Anhebung des HDL-Cholesterols um 5-8% initiieren, was ihr Wirkprofil noch zusätzlich verbessert (Tabelle E2). Nach der aktuellen Datenlage einer „Evidence-based medicine“ ist Simvastatin als Standard in der Sekundärprävention der KHK anzusehen.

Tabelle E2: Übersicht über relevante prospektive, randomisierte, Placebo-kontrollierte Langzeit-Statin-Studien zur Primär- und Sekundärprävention der KHK (nach Lousberg et al., 2001).

Studie	WOSCOPS	AFCAPS / TEXCAPS	4S	CARE	LIPID
Fallzahl	6.595 Männer	6.605 (5.608 Männer)	4.444 (3.617 Männer)	4.159 (3583 Männer)	9.014 (7.498 Männer)
Alters- durchschnitt (Jahre)	55	58	58	59	62
Patienten- Anamnese	Hyper- cholesterin- ämie	Hyper- cholesterin- ämie	KHK (A. pectoris/ MI), Hyper- cholesterin- ämie	MI / A. pectoris	MI / A. pectoris, Cholesterol leicht erhöht
Präventionstyp	Primär	Primär	Sekundär	Sekundär	Sekundär
Substanz	Pravastatin	Lovastatin	Simvastatin	Pravastatin	Pravastatin
Dosis (mg/Tag)	40	20-40	20-40	40	40
Cholesterol- Werte (Mittelwert)	≥ 252 (272)	180-264 (221)	213-321 (259)	< 240 (209)	155-271 (218)
LDL-Mittelwert	192	150	188	139	150
Primärer Endpunkt	MI und Tod durch KHK	erstes koronares Ereignis	Gesamt- Mortalität	MI und Tod durch KHK	Gesamt- Mortalität
Effekt auf die Plasma-Lipide	TC -20% LDL -26% HDL +5%	TC -18% LDL -25% HDL +6%	TC -25% LDL -35% HDL +8%	TC -20% LDL -28% HDL +5%	TC-Senkung LDL -25%
Risikoreduktion (koronare Ereignisse)	31% (bezogen auf prim. Endpunkt)	37% (bezogen auf prim. Endpunkt)	signifikant bezogen auf prim. Endpunkt	24% (bezogen auf prim. Endpunkt)	Signifikant bezogen auf prim. Endpunkt
Relative Reduktion des Schlaganfall- Risikos	11%, n.s.	n.d.	23%, n.s.	32%, *p=0.03	19%, *p<0.022

MI = Myokardinfarkt, A. pectoris = Angina pectoris, TC = totales Cholesterol, n.d. = nicht definiert, n.s. = nicht signifikant.

1.3.3 Statine – mehr als nur Lipidsenker

Betrachtet man die Biosynthese des Cholesterols ausgehend von Acetyl-CoA im Detail, so fällt auf, dass die HMG-CoA-Reduktase zu einem sehr frühen Zeitpunkt in der Synthesekaskade aktiv wird (Abb. E7). Das bei der Enzymreaktion gebildete Mevalonat wird über Isopentenyl- und Geranylpyrophosphat zu Farnesylpyrophosphat umgewandelt. Durch die Squalen-Synthase entsteht danach das Squalen, aus dem schließlich nach Cyclisierung und Oxidation über weitere Zwischenprodukte das Cholesterol hervorgeht, welches selbst wieder Substrat für die Steroidhormon- und Gallensäuresynthese ist (Volpe et al., 1985). Auch die Squalen-Synthase ist ein über Feedback-Mechanismen reguliertes Schlüsselenzym dieser Kaskade (Tansey, Shechter, 2000). Da dieses Enzym viel später („down-stream“) als die HMG-CoA-Reduktase aktiv wird, versprechen Hemmstoffe dieses Enzyms eine wesentlich höhere Wirkstoff-Selektivität. Squalen-Synthase-Hemmstoffe wie Saragossasäure oder die Squalestatine sind gegenwärtig Gegenstand intensiver pharmazeutischer Forschung.

Daß Hemmstoffe der HMG-CoA-Reduktase diese erhöhte Selektivität gerade nicht aufweisen, mag bei genauerer Betrachtung ein glücklicher Umstand sein. Die Analysen der CARE-Studie („Cholesterol and Recurrent Events“) (Sacks, Ridker, 1999) als auch der LIPID-Studie („Long-term Intervention with Pravastatin in Ischemic Disease“) (Simes et al., 2002) (Tabelle E2) ergaben in beiden Fällen eine signifikante Reduktion von kardiovaskulären Ereignissen durch das entsprechende Statin *unabhängig* vom Ausgangs-LDL-Wert. Eine retrospektive Abnahme der Schlaganfallinzidenz war auch für Statin-Patienten mit unauffälligen Cholesterolspiegeln im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisbar. Ähnlich positive Ergebnisse lieferten Primär-Präventionsstudien mit Statinen wie die WOSCOPS-Studie („West of Scotland Coronary Prevention Study“) (Shepherd, 1998). Auch neuere prospektive und randomisierte Studien bestätigen die oben genannten Befunde. Sowohl die Heart Protection Study mit Simvastatin (Farmer, 2003), die LIPS-Studie („Lescol Intervention Prevention Study“) mit Fluvastatin (Serruys et al., 2001), als auch die MIRACL-Studie („Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering“) mit Atorvastatin (Ahsan et al., 2001)) dokumentieren die Effizienz des jeweiligen Statins in der Endpunkt-Reduktion *unabhängig* vom Plasma-LDL-Cholesterolspiegel.

Für andere Lipidsenker konnten vergleichbare Effekte nicht gezeigt werden, so daß neben der primären Cholesterolsenkung zunehmend sogenannte *lipidunabhängige, pleiotrope* Effekte für das Wirkprinzip der Statine verantwortlich gemacht werden (Corsini et al., 1996; Bellosa et al., 2000; Takemoto, Liao, 2001; Werner et al., 2002). Diese Annahme wird durch einige angiographische Studien gestützt. Eine Abnahme der Inzidenz koronarer Ereignisse unter Statin-Therapie um 70% in der FATS-Studie („Familial Atherosclerosis Treatment Study“) ließ sich z.B. nicht mit der nur geringfügigen Abnahme in der Größe atherosklerotischer Läsionen assoziieren (Brown et al., 1995).

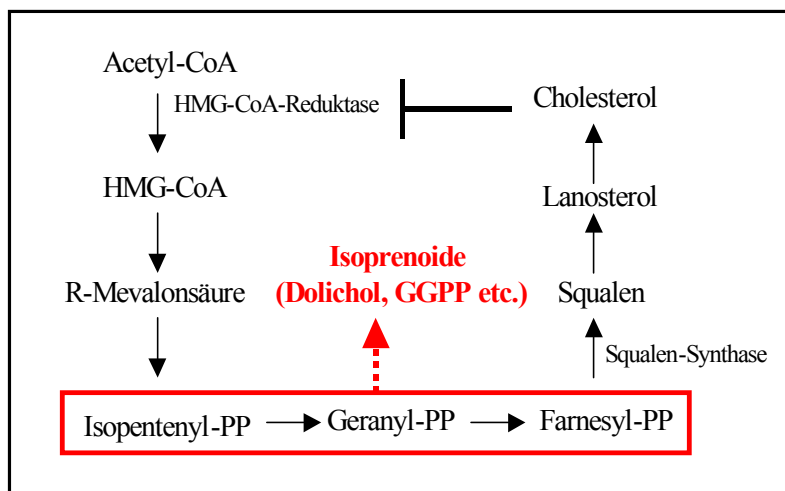


Abb. E7. Cholesterolsynthese. Die HMG-CoA-Reduktase liegt up-stream des Isoprenoid-Schenkels, die Squalen-Synthase liegt downstream. Die HMG-CoA-Reduktase wird durch Cholesterol negativ reguliert. Auch die Squalen-Synthase unterliegt einer Feedback-Kontrolle. Abkürzungen: siehe Text.

Die Lipid-unabhängigen Effekte der CSE-Hemmer resultieren aus der vermeintlichen „Unselektivität“ ihrer Wirkung. Durch eine spezifische Hemmung der HMG-CoA-Reduktase werden auch nachgeschaltete Synthesewege im Isoprenoid-Stoffwechsel blockiert, die vornehmlich über die Intermediate Farnesylpyrophosphat (FPP) und Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) ablaufen (Goldstein, Brown, 1990; Grunler et al., 1994) (Abb. E7). Protein-Isoprenoid-Assoziat spielen bei Zellproliferations- und Wachstumsvorgängen sowie bei zellulären Signaltransduktions-Mechanismen eine wichtige Rolle (Hall, 1994, 1998). Zahlreiche zelluläre Signalproteine erlangen ihre physiologische Funktionalität erst durch eine diskrete „Isoprenylierung“ an spezifischen Aminosäureresten (Maltese, 1990; Glomset, Farnsworth, 1994). Diese posttranslationalen kovalenten Lipid-Modifikationen bedingen die richtige Positionierung von bestimmten membranassoziierten Proteinen sowie ihren intrazellulären Transport zu den Zielkompartimenten (Glomset, Farnsworth, 1994; Hall, 1998). Zur Gruppe der isoprenylierten Proteine zählen z.B. die γ -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine, Häm-a, sowie Mitglieder der Ras und Rho GTPase-Familie (Takemoto, Liao, 2001; Werner et al., 2002). Ras und Rho sind sogenannte „small GTP-binding proteins“, die zwischen der inaktiven, GDP-gebundenen Form, und der aktiven,

GTP-gebundenen Form, zyklisieren (Kaibuchi et al., 1999). Die Translokation von Ras vom Cytoplasma zur Plasmamembran bedarf in Endothelzellen der kovalenten FPP-Derivatisierung, die Rho-Translokation ist hingegen abhängig von einer diskreten GGPP-Modifikation (Glomset, Farnsworth, 1994). Die Mitglieder der Rho-Familie übernehmen in maturer Form spezifische Aufgaben im Zellstoffwechsel. Zum Beispiel beeinflussen sie die cytoskelettale Ausgestaltung der Zelle und damit den zellulären Transport, die Regulation des Zell-Zyklus, die Motilität, Proliferation und funktionelle Oberflächenbeschaffenheit der Zellen, sowie die Gentranskription (Hall, 1998; Manser, 2002). Heutzutage geht man davon aus, daß eine Vielzahl der pleiotropen Statin-Effekte über die Inhibition von derartigen small GTPase-vermittelten Transduktionskaskaden verbunden mit einer Erhöhung der Expression atheroprotektiver Gene zustande kommen (Bellosta et al., 2000; Takemoto, Liao, 2001; Werner et al., 2002).

Statine sind in der Lage, die Expression der endothelialen NO-Synthase (eNOS) zu stimulieren (Laufs et al., 1998, 2000). Dieser Effekt kommt über eine Erhöhung der eNOS-mRNA-Stabilität zustande, die durch Rho-GTPase negativ reguliert wird (Laufs, Liao, 1998). Eine Blockade der Isoprenylierung von Rho bedingt den Verlust der membranassoziierten Aktivität und GTP-Bindfähigkeit des Proteins, was in erhöhten eNOS- und NO-Spiegeln resultiert (Laufs et al., 2000). NO vermittelt im intakten Endothel insbesondere die vaskuläre Relaxation und inhibiert die Proliferation des glattmuskulären Gewebes sowie die Plättchenaggregation (Law et al., 2001). Erhöhte eNOS- und NO-Spiegel unter Statingabe mögen auch primär dafür verantwortlich sein, daß Statine das Risiko eines ischämischen Insults cholesterolonabhängig reduzieren. Durch Stimulation der eNOS-induzierten Vasodilatation und Inhibierung der Leukozyten- und Plättchenadhäsion läßt sich womöglich die cerebrale Blutzirkulation verbessern (Endres et al., 1998). Gleichfalls beeinflussen Statine die Expression einer Anzahl weiterer gefäßaktiver Peptide. So wird z.B. die Expression von Endothelin-1 als starkem Vasokonstriktor herabreguliert und damit einer endothelialen Dysfunktion zusätzlich entgegengewirkt (Hernandes-Perera et al., 1998).

Statine bewirken eine cholesterolonabhängige Reduktion von oxidativem Stress im Gefäßendothel durch Blockade der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (Bellosta et al., 2000; Rikitake et al., 2001; Werner et al., 2002). ROS vermögen endotheliales NO zu inaktivieren. Wenngleich eine Lipidsenkung *per se* eine Reduktion von oxidablem Substrat bedeutet, so konnte gezeigt werden, dass die Angiotensin-II-induzierte Radikalbildung in vaskulärem Muskelgewebe durch Blockade der sogenannten Rac1-vermittelten NADH-Oxidase-Aktivität durch Statine herabgesetzt wird (Wassmann et al., 2001). Die antioxidative

Kapazität von Fluvastatin und Simvastatin resultiert womöglich auch aus der Tatsache, daß diese beiden Wirkstoffe die Cholesterol-Akkumulation als auch die von acetyliertem LDL (AcLDL) induzierte Cholesterol-Esterfikation in Makrophagen direkt inhibieren (Pravastatin zeigt diesen Effekt nicht), was den Lipid-Pool als Substrat-Quelle freier Radikale weiter verringert (Bernini et al., 1993).

Die Proliferation von glattmuskulären Zellen („smooth muscle cells“, SMC) im Rahmen angiopathischer Geschehnisse wird durch Statine effektiv unterdrückt (Bellosta et al., 2000). Mit Ausnahme von Pravastatin inhibieren Statine unter anderem die Rho-vermittelte PDGF (platelet-derived growth factor)-induzierte DNA-Synthese in SMC und arretieren den Zellzyklus zwischen G1- und S-Phase (Laufs et al., 1999). Weiterhin induzieren sie den apoptotischen Zelltod der glattmuskulären Zellen, was in Kombination zu einer entscheidenden Abnahme der IMT beiträgt (Guijarro et al., 1998).

Eine Hyperreaktivität von Blutplättchen im Rahmen einer Hypercholesterinämie wird durch Statintherapie zusätzlich normalisiert (Huhle et al., 1999). Zum einen wird der Cholesterolgehalt der Thrombozytenmembran gesenkt, was über eine erhöhte Membranfluidität zu einem verringerten thrombogenen Potential der Zellen führt, zum anderen bewirken Statine - womöglich Isoprenoid-vermittelt - eine Hemmung der Synthese von Gewebefaktoren bzw. Thromboxan A₂, wodurch die Sensitivität der Thrombozyten für aggregationsfördernde Substanzen vermindert wird (Bellosta et al., 2000). Auch eine Erhöhung der Plaque-Stabilität in sklerotischen Gefäßabschnitten ist nicht ausschließlich auf eine primäre Lipidsenkung durch Statine zurückzuführen (Crisby et al., 2001), wenngleich eine solche, bedingt durch Veränderungen im Lipid-Kern der Plaques, sicherlich maßgeblich daran beteiligt sein dürfte. Als eine Kombination von lipidvermittelten und lipidunabhängigen Wirkungen erklärt man sich auch die anti-inflammatorische Kapazität der CSE-Hemmer. Pravastatin vermochte in der CARE-Studie die Plasmaspiegel von hs-CRP („high-sensitive C-reactive protein“) als klinischem Entzündungsmarker nachhaltig zu senken (Ridker et al., 1999; Sacks, Ridker, 1999). Womöglich inhibieren Statine direkt Oberflächen-Adhäsionsmoleküle, die eine subendotheliale Penetration von Zytokin-ausschüttenden Immun- und Entzündungszellen vermitteln (Niwa et al., 1996). Weiterhin wurde eine Statin-induzierte Down-Regulation der Expression induzierter Zytokine wie TNF- α oder IL-1 in Makrophagen, Mikroglia und Astrozyten gezeigt (Takemoto, Liao, 2001).

Auf Grundlage der heute geforderten „Evidence-based-medicine“ sind weitere prospektive Studien notwendig, die den eindeutigen Nutzen einer Statintherapie bei Indikationen wie der

Primärprophylaxe des Schlaganfalls bei Patienten ohne KHK oder erhöhte Cholesterolvere belegen. Nach heutigem Kenntnisstand ist davon auszugehen, dass neben Risikopatienten auch Personen, die eine normale Lipidhomöostase, aber bereits auffällige IMT- oder erhöhte CRP-Werte aufweisen, von einer Statintherapie profitieren könnten. Unklar ist, inwieweit die in ihrer Qualität für einzelne Statine unterschiedlich stark ausgeprägten pleiotropen Effekte ursächlich für die dokumentierten neuroprotektiven Eigenschaften der CSE-Hemmer im Rahmen der Alzheimer Demenz verantwortlich sind (Cucchiara, Kasner, 2001; Delanty et al., 2001; Crisby et al., 2002) (siehe 1.4).

1.4 Alzheimer Demenz

1.4.1 Definition, Epidemiologie und Geschichte

Unter Demenz versteht man definitionsgemäß ein leicht, mittelschwer oder schwer ausgeprägtes Syndrom, das Störungen des Gedächtnisses, des Denkvermögens, wie auch der emotionalen Kontrolle umfasst (Müller, 2002). Die Demenz ist eine ZNS-Erkrankung des letzten Lebensdrittels und damit vorrangig eine alterstypische Erscheinung. In Deutschland leben zur Zeit etwa 1.6 Millionen Demenz-Patienten, deren Betreuung pro Jahr annähernd 40 Milliarden Euro kostet. Zwei Drittel dieser Patienten, also rund 1 Million Menschen, leiden an der Alzheimer'schen Erkrankung, die damit die häufigste Form der primären zerebralen Demenzen darstellt. Weltweit leiden ca. 3% der Bevölkerung über 60 Jahre an der Alzheimer Demenz. Im Laufe dieser schleichenden und irreversiblen neurodegenerativen Hirnleistungsstörung verkennen die betroffenen Patienten nach und nach ihre Umwelt, verlieren ihre körperliche und geistige Leistungskraft, sowie die Fähigkeit, einfachste Alltagstätigkeiten zu verrichten. Anfangs treten häufig unspezifische Symptome wie Müdigkeit oder Antriebslosigkeit auf. Diese werden in fortgeschrittenen Stadien abgelöst durch massive Orientierungs-, Gedächtnis- und Sprachstörungen, die den Patienten zusehends isolieren. Im Endstadium kommt es schließlich zum völligen physischen und psychischen Verfall. Von der ersten Diagnosestellung bis zum Tod der pflegebedürftigen Patienten vergehen in der Regel nur 6-10 Jahre.

Das Krankheitsbild der Alzheimer Demenz ist nach dem Frankfurter Hirnforscher *Alois Alzheimer* benannt, der im Jahr 1906 in einem wissenschaftlichen Vortrag über „eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde“ bei der zu diesem Zeitpunkt bereits verstorbenen 51-

jährigen Patientin *Auguste D.* berichtete. Diese Patientin konnte sich in zahlreichen Gesprächen lediglich an ihren Vornamen erinnern, war geistig völlig zerstreut, abweisend, und körperlich aggressiv. Die von Alois Alzheimer dokumentierten Befunde über die hirnanatomischen Veränderungen von Auguste D. besitzen auch heute noch Gültigkeit in der *post-mortem* Diagnose dieser Demenzform. Alzheimer beobachtete eine massiv ausgeprägte Atrophie der Hirnrinde mit Erweiterung der Hirnfurchen und Hirnkammern. Zudem beschrieb er als histopathologische Charakteristika zum einen fibrilläre Bündel innerhalb der Nervenzellen sowie eigenartige Stoffwechselablagerungen in Form von Plaques in der gesamten Hirnrinde. Die Neurofibrillenbündel bestehen, wie wir heute wissen, aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein (siehe 1.4.3.2), die Plaques im Wesentlichen aus unlöslichem Amyloid beta-Protein (siehe 1.4.3.1). Beide neuropathologischen Veränderungen treten nicht krankheitsspezifisch auf, sondern sind in anderer Intensität und regiospezifischer Verteilung auch bei anderen dementiellen Erkrankungen wie der Vaskulären Demenz (VD) (Roman et al., 1993) sowie in geringem Ausmaß auch im gesunden, gealterten Gehirn nachzuweisen. Die Vaskuläre Demenz ist quantitativ die zweit häufigste Demenzerkrankung. Sie tritt häufig als Mischform mit der Alzheimer'schen Erkrankung auf, was eine differentialdiagnostische Beurteilung oftmals schwierig macht. Eine derartige Diagnosestellung umfaßt heutzutage in erster Linie neuropsychologische Test wie den *Mini Mental Status Test* (MMST) (Kessler et al., 1990) oder Bewertungen anhand der *Alzheimer's Disease Assessment Scale* (ADAScog-Skala) (Mohs et al., 1983), sowie bildgebende Verfahren wie PET oder SPECT (Andreasen et al., 1995; Cardebat et al., 1998).

Ausgehend von epidemiologischen Daten und zukünftigen demographischen Veränderungen wird die Alzheimer Demenz in den nächsten Jahrzehnten enorme sozio-ökonomische Belastungen nach sich ziehen. Die Demenz ist dabei nicht allein ein Kostenfaktor. Sie nimmt gleichfalls maßgeblich Einfluß auf familiäre Strukturen und die Lebensqualität von Angehörigen. Die altersspezifische Prävalenzrate folgt ab dem 65. Lebensjahr einem annähernd exponentiellen Verlauf und verdoppelt sich etwa alle 5 Jahre (Abb. E8) (Jorm et al., 1987). Frauen sind dabei vor allem in den älteren Untersuchungsgruppen deutlich überrepräsentiert. Auch die Inzidenz (Neuerkrankungsrate) nimmt mit steigendem Lebensalter deutlich zu, wenngleich sie im Verlauf keinen vergleichbar strengen mathematischen Zusammenhang aufweist wie die Prävalenz der Alzheimer Demenz (Jorm, Jolley, 1998; Gao et al., 1998). Die jährliche Inzidenz der Altenbevölkerung wird im Mittel auf 1.5 – 2% geschätzt (Bickel, 1999).

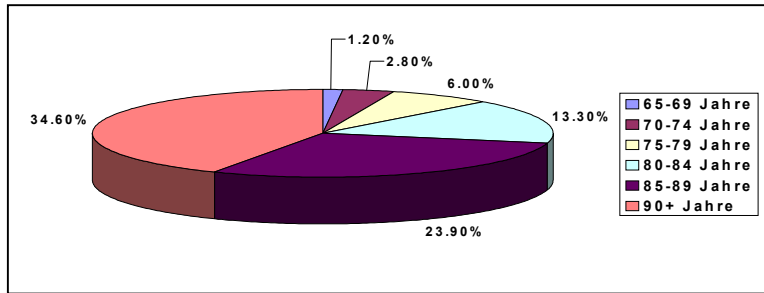


Abb. E8. Prävalenz von moderater bis schwerer Demenz in verschiedenen Altersgruppen. Die Prävalenz ist ein Häufigkeitsmaß und gibt an, wie oft die Krankheit in der untersuchten Gruppe auftritt (nach Bickel, 1999).

Die Alzheimer Demenz tritt in etwa 95% der Fälle sporadisch im höheren Lebensalter auf (senile Demenz, sogenannte late-onset-Form, LOAD). Nur cirka fünf Prozent der dokumentierten Fälle sind präsenile Demenzen (early-onset-Form, EOAD, FAD) und weisen einen genetischen bzw. familiären Hintergrund auf (siehe 1.4.2). Die Prävalenz für diese Form der Demenz wird für die Altersgruppe von 30-59 Jahre auf ca. 0.1% geschätzt (Hofman et al., 1991).

1.4.2 Risikofaktoren der Alzheimer Demenz

1.4.2.1 Das Alter

Der bedeutendste soziodemographische Risikofaktor der sporadischen Alzheimer Demenz ist das Alter (Gao et al., 1998; Jorm, Jolley, 1998), wengleich die zugrunde liegenden biologischen Mechanismen noch ungeklärt sind und mit mehreren Hypothesen beschrieben werden. Die Hirnalterung umfaßt sehr komplexe und multifaktorielle Prozesse, deren jeweiliger Einfluß auf die Krankheitspathogenese im einzelnen nicht genau abzuschätzen ist. Bedeutsame altersspezifische Veränderungen sind vor allem die Abnahme der antioxidativen Kapazität (Vohra et al., 2001; Sandhu, Kaur, 2002) sowie die Änderung von Dichte, Verteilung und Aktivität synaptischer Funktionsproteine wie Neurotransmitter, Enzyme oder Rezeptoren (Grange-Midroit et al., 2002; Clayton et al., 2002). Nach der „Oxidativen-Stress-Hypothese des Alterns“ (Harman, 1968) sind diese beiden Phänomene kausal miteinander verknüpft (siehe 1.4.4.2).

1.4.2.2 Apolipoprotein E

Als gesicherter Risikofaktor für die sporadische als auch für die familiäre Form der Alzheimer Demenz wurde in zahlreichen Assoziationstudien ein definierter apoE-Polymorphismus auf Chromosom 19 identifiziert (Corder et al., 1993; Rubinsztein, Easton, 1999). Humanes ApoE

ist ein 34 kDa Protein mit zwei diskreten Bindungsdomänen. Die drei Allel-Varianten $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, und $\epsilon 4$ unterscheiden sich nur in zwei Aminosäure-Punktmutationen, die jedoch bedeutsame konformative Veränderungen nach sich ziehen (Cedazo-Minguez, Cowburn, 2001). Träger des apoE4-Allels, das unter den drei Allel-Varianten mit einer Häufigkeit von etwa 14-16% vorkommt, weisen ein deutlich erhöhtes Erkrankungsrisiko auf (Czech et al., 1994). Dabei modifiziert der apoE-Genotyp in erster Linie das *relative* Erkrankungsrisiko und damit das Ersterkrankungsalter (Meyer et al., 1998). Die genetische Assoziation zeigt zudem einen Gendosis-Effekt, so dass sich das Vorhandensein von zwei Kopien des $\epsilon 4$ -Allels additiv auswirkt (Saunders et al., 1993). Weiterhin scheint das relative Risiko für AD bei Trägern des $\epsilon 4$ -Allels altersabhängig zu sein (Frisoni et al., 1998).

1.4.2.3 Mutationen in Risikogenen

Über genetische Kopplungsuntersuchungen wurden bislang drei Gene identifiziert, die mit der familiären Form der Alzheimer Demenz assoziiert sind. Es handelt sich hierbei um das Gen für das Amyloid-Precursor-Protein (APP) auf Chromosom 21, um das Presenilin 1-Gen auf Chromosom 14, sowie um das Presenilin 2-Gen auf Chromosom 1 (Tandon et al., 2000). Für das APP-Gen sind bislang 7, für das PS1-Gen bereits über 80, und für das PS2-Gen 2 Mutationen beschrieben, die mit einer stark forcierten Amyloid-Bildung bzw. einem erhöhten Verhältnis von $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ und einem sehr frühen Krankheitsbeginn einhergehen (Selkoe, 2001; Sambamurti et al., 2002). APP-Mutationen kommen insgesamt nur für rund 5% der FAD-Fälle auf. Die Aminosäuremutationen sind dabei in direkter Nachbarschaft zur $A\beta$ -Domäne oder innerhalb der $A\beta$ -Sequenz selbst lokalisiert (Chan et al., 2002). Interessanterweise entwickeln Maus-APP/PS1-Doppelmutanten sehr frühzeitig fibrilläre Amyloid-Ablagerungen im Gehirn, die sich neuropathologisch und histochemisch mit den Plaques im Gehirn von Alzheimer-Patienten vergleichen lassen (Sturchler-Pierrat et al., 1997; Kurt et al., 2001).

Das APP-Protein ist ein Typ-I-Transmembran-Glykoprotein, das an Membran-gebundenen Polysomen synthetisiert und im ER glycosyliert wird (Checler, 1995). Primäre zelluläre Lokalisationen sind die Membranen des Golgi-Komplexes als auch die PM. Nach Re-Internalisierung erscheint APP im lysosomalen Kompartiment (Selkoe et al., 1996). Die physiologische Funktion von APP und den Sequenz-homologen APP-like proteins (APLPs) ist bis heute nicht geklärt. Diskutiert werden Funktionen im Rahmen von Zell-Adhäsionsvorgängen (Clarris et al., 1997), beim Kinesin-vermittelten axonalen Transport

(Kamal et al., 2001) oder auch bei synaptischen Signaltransduktionen, in denen APP womöglich selbst als zellulärer Rezeptor fungiert (Dodart et al., 2000). Intrazelluläre Spaltomänen des Peptids (APP-intracellular cleavage domain, AICD) übernehmen womöglich Funktionen als aktive Transkriptionsfaktoren (Kimberly et al., 2001).

Die Presenilin-Proteine PS1 und PS2 sind ebenfalls integrale Membranproteine mit 6-8 Transmembrandomänen und einer großen hydrophilen cytosolischen Schleife (Li, Greenwald, 1998; Nakai et al., 1999). Sie gehören zur Gruppe der Aspartylproteasen. Beide Proteine sind zu 67% homolog und werden post-translational phosphoryliert (Cook et al., 1996). Subzellulär sind sie vor allem im ER und dem frühen Golgi lokalisiert, wobei der überwiegende Teil der endogenen Proteine endo-proteolytisch im großen Loop gespalten wird und insofern nicht als „full-length“ Peptid vorliegt (Walter et al., 2001a). Die Spaltprodukte sind stabil und lagern sich vermutlich zu Oligomeren zusammen (Capell et al., 1998). Die physiologische Funktion der Preseniline wird vor allem in ihrer Beteiligung an zellulären Protease-Komplexen gesehen, die innerhalb bestimmter Transmembran-Domänen unterschiedliche Substrate wie APP, Notch oder Presenilin selbst schneiden (Walter et al., 2001a; Steiner et al., 2002) (siehe 1.4.3.1).

1.4.2.4 Sonstige Risikofaktoren

Neue Befunde von Papassotiropoulos et al. (2003) sowie von Kölsch et al. (2002) machen eine genetische Assoziation zwischen einem definierten Polymorphismus im CYP46-Gen, das für die 24S-Cholester-Hydroxylase kodiert, und der LOAD wahrscheinlich. Da sowohl die Proteintranskripte von CYP46 als auch von apoE4 maßgeblich an der Regulation der zentralen Cholester-Homöostase beteiligt sind und auch der CYP-Polymorphismus anscheinend ein Funktions-*Defizit* der Cholester-Hydroxylase determiniert (Wolozin et al., 2003), triggern womöglich beide Polymorphismen ein und denselben pathogenen Mechanismus. Eine genetische Assoziation zwischen AD und dem Genlokus für IDE (Insulin-degrading enzyme) wird derzeit untersucht. IDE degradiert in extraneuronal sekretiertes Amyloid beta-Peptid (Vekrellis et al., 2000).

Kausale Zusammenhänge zwischen Ernährungsgewohnheiten und der Entstehung und Progression von Demenzen wie der Alzheimer Demenz sind nicht eindeutig belegt, wenngleich einige Studien protektive Effekte von mehrfach ungesättigten Fettsäuren in der Nahrung dokumentieren (Kalmijn et al., 1997; Friedland, 2002). Gleichfalls ist die AD-Prävalenz in Ländern mit hohem Fischkonsum wie z.B. Japan geringer als in der

westeuropäischen Bevölkerung (Yamada et al., 2002). Diese Befunde sind insbesondere vor dem Hintergrund der zunehmend deutlicher werdenden Assoziationen zwischen vaskulären Risikofaktoren und der Alzheimer Demenz von Interesse (siehe 1.4.4.3). Einige prospektive Human-Studien an ausgewählten Gruppenkollektiven weisen erhöhte Serum-LDL-Cholesterolspiegel im mittleren Lebensalter als unabhängigen Risikofaktor für die Alzheimer Demenz als auch für KHK-Ereignisse aus (Kivipelto et al., 2002; Notkola et al., 1998). Auch hierzu ist die Datenlage allerdings nicht einheitlich (Jarvik et al., 1995; Austen et al., 2002). Die peripheren Cholesterolspiegel scheinen sich zudem zu Krankheitsbeginn bei AD wieder zu normalisieren (Notkola et al., 1998).

1.4.3 Neuropathologie der Alzheimer Demenz

Bei der Alzheimer Demenz treten als neuropathologische Charakteristika A β -Plaques und Tau-Ablagerungen auf. Letztere lassen sich in Neurofibrilläre Tangles (NFTs) und Neuropilfäden (Neuropil Threads, NTs) unterteilen. Dabei sind unterschiedliche Hirnregionen in verschiedenem Ausmaß betroffen.

1.4.3.1 Senile Plaques

Senile Plaques sind extrazelluläre Agglomerate aus Protein und anderen Co-Faktoren (siehe unten), die von dystrophisch veränderten Nervenfasern und aktivierten Mikroglia umgeben sind (Arelin et al., 2002). Hauptbestandteil bildet in der core-Region das sogenannte Amyloid beta-Protein, ein 4kDa Peptid aus 39-42 Aminosäuren, das in den Plaques in aggregierter Form vorliegt und etwa 2/3 der Proteinmasse ausmacht (Atwood et al., 2002). Andere Proteine wie z.B. Antichymotrypsin, ApoE oder lysosomale Enzyme, Raft-Lipide wie z.B. Cholesterol, sowie bestimmte Entzündungsmediatoren sind mit dem Amyloid-Peptid assoziiert (Atwood et al., 2002; Sani et al., 2003; Burns et al., 2003). Die Amyloid-Peptide gehen durch proteolytische Spaltung aus dem Vorläuferprotein APP hervor, in dessen Sequenz die Amyloid-Domäne konserviert vorliegt (Abb. E9). Grundsätzlich kann das APP-Protein über zwei alternative Prozessierungswege geschnitten werden (zur Literaturübersicht der APP-Prozessierung siehe Bayer et al., 2001; Sambamurti et al., 2002; Selkoe, 2001).

Im Zuge der *nicht-amyloiden Kaskade* schneidet die α -Sekretase APP innerhalb der A β -Domäne und liberiert somit die niedermolekularen Fragmente sAPP α , das sezerniert wird, sowie das C-terminale, membranassoziierte Fragment CTF α (Abb. E9). Dieses kann in einem

zweiten enzymatischen Schritt durch die sogenannte γ -Sekretase weiter zu einer 3kDa Sequenz (p3) abgebaut werden, die die Aminosäuren 17-40/42 von maturem A β beinhaltet (Abb. E9).

Im Verlauf der *amyloidogenen Prozessierungskaskade* wird membranäres APP durch das Enzym β -Sekretase am N-Terminus (Asp1) der A β -Domäne geschnitten. Dieser Schnitt liefert C-terminal verkürztes sAPP β sowie ein 12 kDa-A β -Vorläufer Peptid, das in der Literatur als CTF β bezeichnet wird. Ein γ -Sekretase-Schnitt an CTF β liberiert dann Amyloid beta-Peptid und ein weiteres Restfragment (p7) (Abb. E9).

α -Sekretase-Aktivität konnte kürzlich für zwei Proteinase der Adamalysin (ADAM) -Familie nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich um die Metalloproteasen ADAM 10 und ADAM 17 (Tabelle E3) (Lammich et al., 1999; Asai et al., 2003). Letztere trägt auch das Synonym TACE für „*tumor-necrosis-factor- α -converting enzyme*“. Der α -sekretorische Schnitt ist zellulär innerhalb bzw. in unmittelbarer Nähe der PM lokalisiert (Sinha, Lieberburg, 1999).

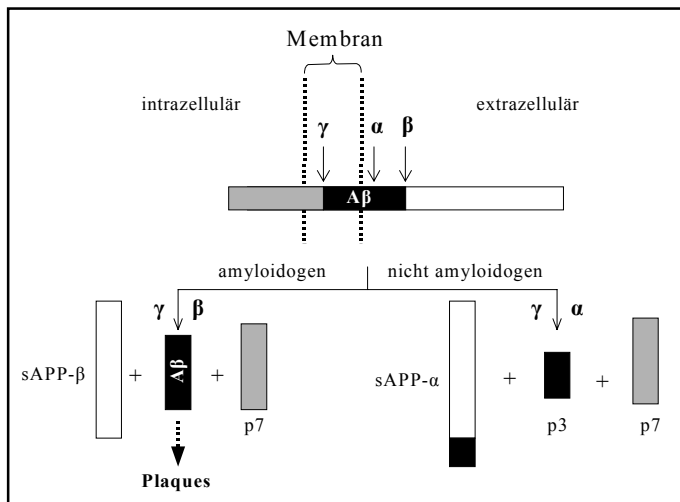


Abb. E9. Prozessierungswege von APP. Der α -sekretorische Weg liefert nicht-amyloidogene Spaltprodukte, wohingegen die kombinierte enzymatische Aktivität von β - und γ -Sekretase zur Sezernierung von Amyloid beta-Peptid 1-40/1-42 führt, das extrazellulär aggregiert und Plaques bildet.

Sekretase	Kandidat	Chromosom
α -Sekretase	ADAM 10, ADAM 17	15 2
β -Sekretase	BACE 1 BACE 2	11 21
γ -Sekretase	PS-1 PS-2	1 14

Tabelle E3. Putative Kandidaten der einzelnen APP-schneidenden Sekretasen. Die Preseniline sind dabei Bestandteil eines Multi-Protein-Komplexes, der auch andere Substrate wie Notch prozessiert.

Die β -Sekretase wurde in mehreren unabhängigen Untersuchungen als Mitglied der Pepsin-Familie der Aspartylproteasen identifiziert und als BACE für „ *β APP cleaving enzyme*“ bezeichnet (Hussain et al., 1999; Vassar et al., 1999). Es existieren zwei homologe Isoformen dieses Enzyms, BACE-1 und BACE-2, bei denen es sich um Typ I-Transmembran-Proteine

mit großer lumenaler Domäne handelt, in der sich das aktive Zentrum befindet (Haniu et al., 2000). Die primäre Rolle in der neuronalen Amyloid-Produktion kommt dabei BACE-1 zu (Cai et al., 2001). Das mature Protein wird vom ER über das TGN zur Zelloberfläche transportiert, von wo aus es in saure endosomale/lysosomale Kompartimente reinternalisiert werden kann (Huse et al., 2000; Walter et al., 2001b). In diesen Kompartimenten trifft die β -Sekretase auch auf ihr Substrat APP, das gleichfalls über Clathrin-Coated-Pits re-internalisiert werden kann. Die amyloidogenen Spaltprodukte werden entlang des sekretorischen Pathways zurück zur Zelloberfläche transportiert, in deren Nähe der γ -Sekretase-Schnitt freies Amyloid beta-Peptid liberiert, das anschließend sezerniert wird (Walter et al., 2001a). Die katalytische Seite der γ -Sekretase beinhalten sehr wahrscheinlich die Preseniline selbst. Intrazelluläre Schnittfragmente der Preseniline lagern sich dabei mit anderen Proteinen wie Nicastrin und PEN-2 zu einem Multifunktions-Komplex zusammen, in dem sich die einzelnen Komponenten in ihrer Funktionalität und Maturation gegenseitig beeinflussen (Yu et al., 2000; Walter et al., 2001a; Steiner et al., 2002).

Aktuelle *in vitro* Befunde belegen unabhängig von dem hier beschriebenen Mechanismus der Amyloid-Maturation eine intrazelluläre Bildung von Amyloid beta-Peptid im ER bzw. frühen Golgi (Tienari et al., 1997, Shie et al., 2003). Hierbei handelt es sich primär um die $A\beta_{1-42}$ -Sequenz, wohingegen an der PM vornehmlich $A\beta_{1-40}$ sezerniert wird (Glabe, 2001). Die pathologische Relevanz dieses Amyloid-Pools ist unklar. Womöglich wird intrazelluläres Amyloid beta-Peptid nicht entlang des sekretorischen Pfades sezerniert und akkumuliert in fibrillärer Form innerhalb der Zelle (Hartmann, 1999; Glabe, 2001). $A\beta_{1-42}$ zeigt dabei unter entsprechenden Bedingungen infolge seiner erhöhten Hydrophobizität ein deutlich stärker ausgeprägtes Aggregations-Verhalten als seine kürzerkettigen Homologen und ist gleichfalls wesentlich degradationsstabiler (Burdick et al., 1992). Der Aggregation geht eine Konformationsänderung des Peptids voraus, das sich vermehrt in β -Faltblattstruktur organisiert (Iversen et al., 1995).

1.4.3.2 Neurofibrilläre Tangles (NFT)

NFT sind im Gegensatz zu Amyloid-Plaques intrazellulär *und* extrazellulär nachweisbar. Sie bestehen aus hyperphosphoryliertem und aggregiertem Tau-Protein, das sich in Form sogenannter „paired helical filaments“ (PHF) zusammenlagert (Goedert, 1993; Barghorn, Mandelkow, 2002). Das Tau-Protein ist ein Mikrotubuli-assoziiertes Phosphoprotein, das in seiner zentralen Funktion die am axonalen Transport beteiligte Mikrotubuli-Struktur

stabilisiert (Fan et al., 2001). Weitere Mikrotubuli-assoziierte Peptide wie Kinesin oder MAP2 sind in der Literatur beschrieben (Fan et al., 2001). Mikrotubuli sind polare cytoskelettale Elemente, die aus Tubulin-Monomeren in röhrenartiger Form aufgebaut sind und durch GTP-Hydrolyse ihren Polymerisationszustand verändern können. Die Wechselwirkung zwischen den Mikrotubuli und Tau wird durch den Phosphorylierungsgrad des Tau-Proteins reguliert. Im hochphosphorylierten Zustand verliert Tau seine Bindungsfähigkeit und das Tubulin-System wird empfindlich destabilisiert (Alonso et al., 1994). Physiologisch wird die Phosphorylierung von Tau im Zusammenspiel von spezifischen Kinasen und Phosphatasen reguliert (Jicha et al., 1999; Gong et al., 2000). Dieser Gleichgewichtsprozess scheint im Rahmen der Alzheimer Demenz gestört zu sein (Gong et al., 2000). NFT finden sich z.B. auch im Gehirn von Patienten, die an der Niemann Pick Typ-C Krankheit leiden (Sawamura et al., 2003).

1.4.3.3 Regiospezifische Neurodegeneration

Das Krankheitsbild der Alzheimer Demenz läßt sich durch das Phänomen der sogenannten *selektiven neuronalen Vulnerabilität* beschreiben, d.h. der Neurodegenerationsprozess tritt bevorzugt in bestimmten Hirnregionen und Neuronentypen auf. Hiervon betroffen sind eine Vielzahl von Neurotransmitter-Systemen, insbesondere aber Gebiete mit cholinergem Innervation. Nach Braak und Braak (1991) läßt sich die Alzheimer'sche Erkrankung in sechs neuropathologische Stadien gliedern. Die transentorhinalen Stadien I und II umfassen beginnende Veränderungen im entorhinalen Kortex und sind noch nicht von kognitiven Störungen begleitet (präklinische Stadien). In diesen frühen Stadien ist häufig bereits der im basalen Vorderhirn gelegene *Nucleus basalis Meynert* betroffen, der das Ursprungsgebiet der kortikalen cholinergen Innervation darstellt. In den limbischen Stadien III und IV werden vor allem die Hippokampus-Formation und Teile des temporalen Kortex in Mitleidenschaft gezogen. Große Pyramidenzellen erweisen sich hierbei als besonders sensibel. Die isokortikalen Stadien V und VI korrespondieren schließlich mit dem klinischen Vollbild der Demenz und umfassen in vollem Umfang auch temporale und isokortikale Regionen, so daß neben Assoziationsarealen auch primär sensorische Felder zugrundegehen.

1.4.4 Hypothesen zur Krankheitsinitiierung

1.4.4.1 Amyloid-Kaskaden Hypothese

Die im heutigen Wissenschaftsumfeld vielfach favorisierte Amyloid-Kaskaden-Hypothese geht auf Selkoe zurück (Selkoe 1994, 2000). Sie beschreibt die übersteigerte zelluläre Produktion und Aggregation von Amyloid beta-Peptid als zugrundeliegenden initialen Pathomechanismus der Alzheimer Demenz, in deren kausaler Folge es aufgrund neurotoxischer Amyloid-Effekte zum forcierten Untergang von Neuronenpopulationen kommt. Wesentlich an der Initiierung derartiger cytotoxischer Effekte als auch der Peptid-Aggregation scheint dabei die Interaktion des Amyloid-Peptids mit der neuronalen PM zu sein (Kanfer et al., 1999; Buchet, Pikula, 2000; Yamagushi et al., 2000; Müller et al., 2001) (siehe 1.4.5).

1.4.4.2 Oxidative-Streß-Hypothese

Die Oxidative-Streß-Hypothese mißt ROS die zentrale Bedeutung bei der Initiierung pathogener Mechanismen im Laufe der Alzheimer Demenz bei (Harman, 1968). Entsprechend dieser Hypothese lassen sich die cytotoxischen Eigenschaften von A β durch Antioxidantien vermindern (Yamada et al., 1999). Einige klinische Studien belegen einen protektiven Effekt der Hochdosis-Supplementierung mit Vitamin E oder NADPH in der Therapie der Alzheimer Demenz (Sano et al., 1997; Birkmayer, 1996).

ROS entstehen primär bei der Zellatmung sowie im Verlauf von Entzündungsreaktionen. Weiterhin können freie Radikale durch A β selbst generiert werden (Butterfield et al., 1999;) und dienen womöglich als Mediatorsubstanzen des Peptids (Anderton et al., 1994). A β -induzierte Lipidperoxidationen werden unter anderem für den Untergang nikotinischer Acetylcholin-Rezeptoren im Gehirn von AD Patienten verantwortlich gemacht (Guan et al., 2003). Umgekehrt gibt es Hinweise, dass die intrazelluläre Bildung von A β ₁₋₄₂ bei erhöhtem oxidativen Stress ansteigt (Ohyagi et al., 2000). Zahlreiche Befunde deuten weiterhin darauf hin, dass der oxidative Metabolismus im Gehirn von Alzheimer Patienten verändert ist (Smith et al., 1995; Leutner et al., 2001). Antioxidative Enzymsysteme zur Entgiftung von Radikalen wie Superoxiddismutase oder auch Katalase sind in vergleichsweise geringer Menge im Gehirn angereichert und werden mit zunehmendem Alter anscheinend auch weniger stark exprimiert (Floyd, Hensley, 2002).

1.4.4.3 Vaskuläre Hypothese

Die vaskuläre Hypothese der Alzheimer Demenz gründet sich auf epidemiologische und biologische Evidenzen, nach denen die Alzheimer Demenz (speziell die LOAD) und das Krankheitsbild der Artherosklerose / KHK die gleichen Risikofaktoren wie Bluthochdruck, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus oder apoE4-Genotyp teilen (Breteler, 2000; Skoog, 2000). Diese Risikofaktoren bedingen in Kombination mit der voranschreitenden Gefäßalterung („advanced aging“) das Unterschreiten eines kritischen Schwellenwertes der zerebralen Gewebepfusion („critically attained threshold of cerebral hypoperfusion“, CATCH), in deren Folge es zu irreversiblen Funktionsausfällen des unterversorgten Gewebes kommt (de la Torre, Stefano, 2000). CATCH initiiert nach diesem Modell einen progressiven Strukturumbau und Degenerationsprozess von Hirnkapillaren sowie eine endotheliale NO-Dyshomöostase (de la Torre, Stefano, 2000). Eine entsprechende mikrovaskuläre Pathologie mit lumenaler Verformung und Gefäßwandverdickung sowie Ausfällen im konstitutiven NO-Metabolismus sind für Alzheimer Patienten beschrieben worden (Fischer et al., 1990; Buee et al., 1994; Jellinger, 2002). Gleichfalls treten bei AD-Patienten vaskuläre Amyloid-Ablagerungen im Gehirn auf (Revesz et al., 2002). Dieses Phänomen wird als cerebrale Amyloid-Angiopathie (CAA) bezeichnet (Revesz et al., 2002). Die Bildung amyloidogener Stoffwechsel-Endprodukte ist nach der CATCH-Hypothese die Folge einer mit der chronischen Hypoperfusion einhergehenden Störung des zellulären Energiestoffwechsels. Energie-abhängige Prozesse wie z.B. die APP-Prozessierung, die Proteinsynthese, oder auch die Aufrechterhaltung des antioxidativen Status sind hiervon primär betroffen (de la Torre, Stefano, 2000).

1.4.4.4 Tau-Hypothese

Die Tau-Hypothese wird unter anderem von Mandelkow und Mandelkow vertreten. Danach inhibiert das Tau-Protein in einem kompetitiven Mechanismus den axonalen Transport von APP-haltigen Membranvesikeln sowie Mitochondrien, wodurch APP im Golgi des Zell-Soma zurückgehalten und dort vermehrt zu A β prozessiert wird (Stamer et al., 2002; Terwel et al., 2002). Neue Daten belegen weiterhin eine wichtige Rolle des Tau-Proteins in der Vermittlung der neurotoxischen Amyloid-Effekte (Rapoport et al., 2002).

1.4.4.5 Cholesterol-Hypothese

Nach der Cholesterol-Hypothese der Alzheimer Demenz ist eine durch Risikofaktoren wie apoE4 begünstigte gestörte neuronale Cholesterol-Homöostase ursächlich für die Erkrankung. Abweichungen im neuronalen Cholesterolstoffwechsel bedingen zentrale Ausfälle in synaptischen Prozessen wie Neurotransmission, Gedächtnisbildung oder neuronaler Plastizität. Eine der Theorien besagt, daß die Zelle mit kompensatorischen Mechanismen wie z.B. Tau-Phosphorylierung oder A β -Produktion auf die oben genannten Störungen reagiert (Koudinov, Koudinova, 2001). Zahlreiche aktuelle Befunde deuten auf eine bidirektionale Interaktion zwischen zerebralem Cholesterol- und Amyloidstoffwechsel hin (siehe 1.4.5).

1.4.5 Cholesterol und Membranlipide - Bausteine im neuronalen Puzzle der Alzheimer Demenz

1.4.5.1 Membranveränderungen während der Alzheimer Demenz

Im Laufe der Alzheimer Demenz treten innerhalb bestimmter Hirnregionen spezifische Veränderungen in den strukturellen Eigenschaften von zellulären Membranen auf, die sich von der normalen Membranalterung unterscheiden und womöglich eine Wechselwirkung mit neurotoxischem Amyloid beta-Peptid begünstigen. So wurde *post-mortem* im Hippokampus von AD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen ein verringerter Gehalt an PI und PE, nicht aber an PC festgestellt (Prasad et al., 1998). In temporalen Bereichen waren diese Unterschiede nivelliert (Prasad et al., 1998). Andere Autoren bestätigen einen PE-Verlust in verschiedenen Hirnarealen (Nitsch et al., 1992; Wells et al., 1995), berichten aber gleichfalls von erhöhten PS- bzw. Sphingomyelin-Spiegeln im Gehirn von AD-Patienten (Wells et al., 1995; Farooqui et al., 1997; Pettegrew et al., 2001). Eine Abnahme des Membran-Gesamtphospholipid-Gehalts als auch des Gangliosid-Gehalts ist für einzelne Stadien der LOAD und FAD anscheinend unterschiedlich stark ausgeprägt und wesentlich deutlicher bei FAD nachweisbar (Svennerholm, Gottfries, 1994). Womöglich ist eine verstärkte Phospholipid-Degradation über Phospholipase C oder andere Enzyme ursächlich am membranären Phospholipid-Defizit bei AD beteiligt (Nitsch et al., 1992; Prasad et al., 1998; Strosznajder et al., 1999).

Bezüglich Veränderungen des Gehalts an Membrancholesterol im Gehirn von Alzheimer-Patienten ist die Datenlage nicht einheitlich. Zum einen finden sich Hinweise auf eine

deutliche Cholesterolreduktion in bestimmten Hirnarealen verbunden mit einer Abnahme der Cholesterol:Phospholipid-Ratio im Gehirn von Alzheimer-Patienten (Svennerholm, Gottfries, 1994; Mason et al., 1992; Roher et al., 2002). Zum anderen wird von leicht erhöhten kortikalen Cholesterolwerten bei AD (Sparks, 1997) bzw. unveränderten hippokampalen Cholesterolgehalten (Eckert et al., 2000) berichtet (siehe auch 4.4).

Die beobachteten Membranlipid-Veränderungen im Rahmen der Alzheimer Demenz gehen einher mit Veränderungen in der Membranstruktur, Fluidität und Schichtdicke (Mason et al., 1993, 1995), sowie im Gehalt an spezifischen Fettsäuren. Pettegrew et al. (1993) beschreiben eine deutliche Zunahme der gesättigten Stearinsäure (C18:0) sowie der ungesättigten Linolsäure (C18:2) in Hirnextrakten von AD-Patienten und insgesamt eine Abnahme des Verhältnisses von ungesättigten zu gesättigten Fettsäuren. Im CSF von AD-Patienten waren die Spiegel an mehrfach ungesättigten Fettsäuren wie z.B. Arachidonsäure oder Dodecahexaensäure signifikant erniedrigt (Montine et al., 1997). PE und PI sind reich an derartigen Fettsäuren, die im Laufe von Lipidperoxidations-Prozessen besonders leicht oxidiert werden können.

Fluiditätsmessungen an Hirnmembranen von Alzheimer-Patienten weisen für Membranen des frontalen Kortex, hippokampale Membranen bzw. mitochondriale Membranen des zerebralen Kortex eine Fluiditätsabnahme im Bereich der Phospholipid-Fettsäureketten aus (Mecocci et al., 1996; Scheuer et al., 1996; Eckert, 2000), wohingegen hydrophile Membranregionen in bestimmten Hirnarealen flüdrer waren als die entsprechenden Bereiche in Kontroll-Membranen (Zubenko, 1986).

1.4.5.2 Wechselwirkungen von A β mit Membranen

A β -Membran-Wechselwirkungen sind abhängig von den physikochemischen Membraneigenschaften und der Membranstruktur, vom Ionenmilieu, wie auch vom Aggregationsgrad und der Sequenz des A β -Peptids selbst (Curtain et al., 2002; Wood et al., 2002). *In vitro* Befunde an Modellmembranen und biologischen Membranen mittels CD-Spektroskopie belegen eine elektrostatische Bindung verschiedener A β -Peptide (A β ₁₋₄₀, A β ₁₋₄₂) vornehmlich an die Kopf-Gruppen negativ geladener Lipidkomponenten wie Phosphatidylinositol (Chauhan et al., 2000), wodurch zum einen eine pathologisch relevante Konformationsänderung des Peptids als auch eine Aggregation der Lipidvesikel induziert werden kann (McLaurin, Chakrabarty, 1997; Hertel et al., 1997; Terzi et al., 1997; McLaurin et al., 1998). Wechselwirkungen mit zwitterionischen Membranvesikeln waren im gleichen

Modellsystem deutlich geringer ausgeprägt (Terzi et al., 1997). In löslicher, unaggregierter Form vermag das A β ₁₋₄₀-Peptid in den hydrophoben Core-Bereich der Membran zu interkalieren. Dies belegen Röntgenbeugungs-Untersuchungen an SPMs der Ratte (Mason et al., 1999). Eine ähnliche Interkalationsfähigkeit weisen auch aggregiertes A β ₂₅₋₃₅- und A β ₁₋₄₂-Peptid auf (Mason et al., 1996, 1999), während aggregiertes A β ₁₋₄₀ in den polaren Phospholipid-Bereichen der Membran lokalisiert zu sein scheint (Mason et al., 1999).

Eine Induktion der A β -Aggregation ist in der Literatur für die Interaktion von A β mit membranären Gangliosiden (Choo-Smith, Surewicz, 1997; Matsuzaki, Horikiri, 1999), Cholesterol (Kakio et al., 2001; McLaurin et al., 2002; Yanagisawa, Matsuzaki, 2002) oder auch Phosphatidylserin (del Mar Martinez Senac et al., 1999) beschrieben. Bei der Regulation von Membran-Amyloid-Wechselwirkungen scheint dabei das Cholesterol eine ganz besondere Rolle zu spielen. Es determiniert die physikochemischen Membraneigenschaften und damit sekundär die membranäre Interaktionsfähigkeit von A β . An Membranen von Zellen sowie von Gesamthirn-Lipidextrakt wurde für steigende Cholesterolgehalte eine verminderte Membran-Bindungsfähigkeit von löslichem A β ₁₋₄₀ und eine erniedrigte neurotoxische Kapazität des Peptids gezeigt (Yip et al., 2001). Dabei korrelierte die Bindungsfähigkeit des Peptids invers mit der Membran-Anisotropie (Yip et al., 2001). Curtain et al. (2001, 2002) beschreiben eine metallabhängige Bildung allosterisch geordneter Amyloid-Oligomere, die die Membran bei *niedrigem* Cholesterolgehalt effektiv zu penetrieren vermögen und dabei α -helikale Strukturen ausbilden. Befunde von Kakio et al. (2001, 2002) stützen diese Beobachtungen, wonach an der Membranoberfläche lokalisiertes A β unter Bedingungen hohen Cholesterolgehalts vermehrt β -Faltblatt-Aggregate ausbilden kann. In der gleichen Arbeit beschreiben die Autoren an Membranvesikeln eine Cholesterol-stimulierte Bildung sogenannter A β -GM1-Cluster, die womöglich als Induktionskeim für die A β -Fibrillogenese dienen (siehe 4.4).

Die membranäre Lokalisation von Cholesterol ist für die Interaktion mit A β wahrscheinlich von zentraler Bedeutung. Aktuelle Ergebnisse aus Studien mit humanem *post-mortem* Gewebe von AD-Patienten sowie aus Zellkultur-Studien deuten auf eine Kolo-kalisation von Membrancholesterol mit APP und A β in spezifischen Raft-Membrandomänen niedriger Dichte hin (Lee et al., 1998; Hayashi et al., 2000; Oshima et al., 2001) (siehe 4.4).

Die Membran-Perturbation von aggregiertem Amyloid beta-Protein wird als molekulare Basis für die Neurotoxizität des Peptids angesehen (Hirakura et al., 1998; Kanfer et al., 1999). Eine Korrelation zwischen Aggregation, β -Faltblatt-Gehalt und Neurotoxizität wurde für verschiedene Amyloid beta-Peptide in neuronalen Zellen gezeigt (Pike et al., 1993; Simmons

et al., 1994). Neurotoxische Effekte des Peptids wurden in zahlreichen *in vitro* Zell-Viabilitätsassays (Lambert et al., 1994; Li et al., 1996; Abe, Saito, 1999a; Saito et al., 2001) als auch *in vivo* (Frautschy et al., 1996; Geula et al., 1998) nachgewiesen. Die A β -induzierten zellulären bzw. membranären Mechanismen, die letzten Endes den Untergang der betroffenen Neurone im Gehirn von Alzheimer Patienten einleiten, sind bis heute nicht restlos aufgeklärt. Eine enorme Zahl an Wechselwirkungen mit intrazellulären Signaltransduktionswegen und Effektorsystemen sind in der Literatur beschrieben. Nach dem *Calcium-Kanal-Modell* bildet Membran-inkorporiertes aggregiertes A β membranäre Zink-sensitive Ionenporen aus, durch die insbesondere ein Calcium-Flux in die Zelle stattfindet (Arispe et al., 1993; Zhou, Richardson, 1996; Lin et al., 1999; Kawahara, Kuroda, 2000; Arispe, Doh, 2002). In der Folge wird die intrazelluläre Calciumionen-Homöostase empfindlich gestört und die Zelle geht apoptotisch zugrunde. Als alternativer Mechanismus für den Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration wird die Aktivierung von Tachykinin-Rezeptoren sowie von unselektiven Ionenkanälen und L-Typ-Calcium-Kanälen diskutiert (Kimura, Schubert, 1993; Furukawa et al., 1994; Ho et al., 2001). Auch Protein-Wechselwirkungen mit Rezeptoren wie dem RAGE (receptor for advanced glycation end products) sind womöglich an A β -induzierten Signalkaskaden beteiligt (Kanfer et al., 1999). Einzelne Enzymaktivitäten werden durch Amyloid beta-Peptid in sehr differentieller Weise beeinflusst. Während z.B. die PLC-Aktivität in differenzierten Hirnzellen oder die PKC- δ -Aktivität in Mikroglia durch A β erhöht wird (Singh et al., 1995; Hartmann et al., 1996; Nakai et al., 2001), so werden Transportpeptide wie die membranäre Na⁺/K⁺-ATPase inhibiert (Bores et al., 1998).

A β zerstört durch Interkalation die Membran- und Lipidstruktur der betroffenen Membrankompartimente (Rodrigues et al., 2001) und verändert somit die Fluiditätseigenschaften der Membran. Beschrieben sind im wesentlichen rigidisierende Amyloid-Effekte auf Ebene der DPH-Anisotropie an Humanhirn- oder Maushirnmembranen (Müller et al., 1995, 1998, 2001; Eckert et al., 2000; Kremer et al., 2000; Eckert et al., 2001; Waschuk et al., 2001; Yip et al., 2001) sowie Anstiege in der Pyren-Bulk- und Annular-Fluoreszenz an Maus- und Rattengewebe (Avdulov et al., 1997a; Chochina et al., 2001). Die Veränderung der Membran-Physikochemie kann als ein allgemeines Erklärungsmodell für die beobachteten zellulären Amyloid-Effekte gelten. Membranfluidität und -struktur regulieren eine Vielzahl von zellulären Prozessen und Protein-Funktionalitäten (Lenaz et al., 1983; Bastiaanse et al., 1997; Gimpl et al., 1997), so daß eine Disturbation derartiger Prozesse in ihrer Konsequenz eine Langzeit-Toxizität von Amyloid beta-Peptid mitbegründen kann.

1.4.5.3 A β und Cholesterol – eine zelluläre Liaison

Zahlreiche aktuelle Forschungsergebnisse erhärten die Vermutung, daß dem zentralen Cholesterol-Stoffwechsel in der Pathophysiologie der Alzheimer Demenz eine wichtige Rolle zukommt. Die zellulären Interaktionen zwischen Cholesterol- und Amyloidstoffwechsel sind dabei bidirektional. So nimmt Cholesterol Einfluß auf die Bildung und die Effekte von A β , welches umgekehrt die zelluläre Cholesterol-Homöostase beeinflusst (Koudinov, Koudinova, 2001, Gong et al., 2002a; Yanagisawa, 2002).

Aggregiertes polymeres A β -Peptid ist ein potentes Lipid-Bindeprotein und bindet verschiedene Lipid-Substanzen in der Reihenfolge Cholesterol > Fettsäuren > Phosphatidylcholin (Avdulov et al., 1997b). Diese Bindungseigenschaften sind im löslichen Zustand wesentlich schwächer ausgeprägt, wohingegen sich die Assoziationsfähigkeit von löslichem A β mit ApoE nicht verändert (Strittmatter et al., 1993). Die Bindefähigkeit von A β gegenüber Cholesterol beeinflusst dabei zum einen die Membraninteraktion des A β -Peptids (siehe 1.4.5.2), zum anderen den intrazellulären Cholesteroltransport und -metabolismus. So inhibiert A β_{1-40} sowohl die Cholesterol-Veresterung im Plasma (Koudinov et al., 1996) als auch in neuronaler Zellkultur (Liu et al., 1998). In humanen hepatischen HEPG2 Zellen setzt A β_{1-40} die Syntheserate von freiem und verestertem Cholesterol wie auch von Phospholipiden deutlich herab (Koudinova et al., 1996; Koudinova et al., 2000). Eine Inhibition der Cholesterolsynthese wurde auch in kultivierten Neuronen beobachtet (Gong et al., 2002a). Weiterhin moduliert Amyloid beta-Peptid den zellulären Lipid-Influx und -Efflux. An Ratten-Astrozyten wurde gezeigt, daß A β den ApoE-vermittelten Influx von Cholesterol stimuliert (Guillaume et al., 1996). Yao und Papadopoulos (2002) berichten demgegenüber von einer A β -induzierten Inhibition der extrazellulären Cholesterol-Bindung an LDL-Lipoproteine und damit einem verminderten Cholesterol-Influx in humane NT2-Neurone. A β_{1-40} induzierte zudem den Cholesterol-Transfer zu extrazellulären Akzeptoren in hippokampalen Neuronen der Ratte (Liu et al., 1998). Aktuelle Studien belegen diesen Amyloid-Effekt. So vermag oligomeres A β_{1-40} den Efflux von Cholesterol, PC und GM1-Gangliosiden von Neuronen und Astrozyten zu forcieren, wohingegen lösliches Peptid diesen Effekt so gut wie nicht zeigt (Michikawa et al., 2001; Gong et al., 2002a). Die Beeinflussung des zellulären Lipid-Efflux durch Amyloid beta-Peptid resultiert womöglich aus der frühen Interaktion des Peptids mit Lipiden im Golgi-Komplex. Dieser ist im Rahmen des sekretorischen Stoffwechselweges früh an der Lipid-Sortierung und damit der Efflux-Regulation beteiligt (Orso et al., 2000). A β_{1-42}

beeinflusst den Cholesterolgehalt des Golgis in Abhängigkeit seines Aggregations-Status in differentieller Weise (Igbavboa et al., 2003).

Umgekehrt werden die zelluläre Maturation von A β wie auch seine zellulären Effekte durch Cholesterol reguliert. In zahlreichen *in vitro* Zellstudien wurde eine cholesterolabhängige Prozessierung von APP gezeigt. APP695-infizierte hippokampale Neurone synthetisierten nach Cholesterol-Depletion mit M β CD und Lovastatin signifikant weniger Amyloid beta-Peptid (Simons et al., 1998), wohingegen eine Cholesterol-Anreicherung den zellulären A β -Gehalt erhöhte und die APP_{sol}-Spiegel herabsetzte (Simons et al., 1998). Diese Befunde wurden an zahlreichen Zellkulturstudien mit APP-transfizierten Zellen bestätigt (Bodovitz, Klein, 1996; Frears et al., 1999; Fassbender et al., 2001; Kojro et al., 2001). Lovastatin inhibierte in APP-transfizierten HEK-Zellen die zelluläre Amyloidogenese, solubilisiertes Cholesterol verstärkte sie (Bodovitz, Klein, 1996; Frears et al., 1999). Die beobachteten Verschiebungen im Prozessierungsmuster von APP scheinen dabei mit einer cholesterolabhängigen Änderung einzelner Sekretase-Aktivitäten einherzugehen (Kojro et al., 2001; Wahrle et al., 2002). Es verdichten sich die Hinweise, dass die membranäre Spaltung von APP in definierten, Detergens-unlöslichen Raft-Domänen stattfindet, auf die in diesem Zusammenhang bereits Simons (1998) in seinen Zellkulturstudien hinwies.

Obleich Cholesterol die Bildung von A β -Peptid fördert, so schwächt es gleichfalls die zellulären Effekte von maturem A β ab. Die in der Literatur beschriebenen Schutzfunktionen des Cholesterols gegenüber den cytotoxischen Effekten von aggregiertem A β umfassen dabei im wesentlichen protektive Einflüsse auf Membran-Ebene sowie in verschiedenen Zell-Viabilitätsassays (Zhou, Richardson, 1996; Kawahara, Kuroda, 2001; Arispe, Doh, 2002). Befunde, daß Cholesterol die Amyloid-induzierte zelluläre Calcium-Dyshomöostase zu restaurieren vermag (Hartmann et al., 1994; Kawahara, Kuroda, 2001) und PC12-Zellen vor den toxischen Amyloid-Effekten schützt (Zhou, Richardson, 1996; Arispe, Doh, 2002), lassen sich mit dem Modell einer cholesterolvermittelten Inhibition der A β -Membran-Perturbation erklären (Eckert et al., 2000; Arispe, Doh, 2002).

Cholesterol ist zellulär nicht nur mit dem Amyloid-Stoffwechsel, sondern auch mit dem Tau-Stoffwechsel assoziiert (Fan et al., 2001; Meske et al., 2003). So zeigen Zellkulturdaten, dass eine Inhibition der Cholesterol- bzw. Isoprenoid-Synthese-Kaskade zur Akkumulation von hyperphosphoryliertem Tau-Protein führt (Fan et al., 2001; Meske et al., 2003). Zudem

scheint der Cholesterol-Metabolismus in Tangle-haltigen Neuronen nachhaltig gestört zu sein (Distl et al., 2001; Sawamura et al., 2003).

1.4.6 Nahrungscholesterol, Statine und Alzheimer

In vivo Studien an Nagern belegen, dass man durch Variation des Nahrungscholesterols die zerebrale Amyloid-Deposition beeinflussen kann (Sparks et al., 1994; Refolo et al., 2000, 2001; Shie et al., 2002). Eine erhöhte Cholesterolzufuhr führte dabei sowohl an Hasen (Sparks et al., 1994) als auch an PSAPP-doppeltransgenen Mäusen (Refolo et al., 2000) im Vergleich zu Kontrolltieren zu einer deutlich verstärkten A β -Akkumulation im Hirngewebe, die unter Bedingungen inhibierter Cholesterolsynthese zudem reversibel war (Refolo et al., 2001; Shie et al., 2002). Nachhaltige Anstiege des Cholesterolgehalts im Hirngewebe blieben im Rahmen der Cholesterolfütterungen jedoch aus (Refolo et al., 2000). Eine andere Studie an APP-transgenen Mäusen berichtet im Widerspruch dazu von erniedrigter A β -Expression im Gehirn von cholesterolgefütterten Tieren (Howland et al., 1998). Auch in diesem Modell blieben die zerebralen Cholesterospiegel weitestgehend unverändert, jedoch kam es unter der Cholesteroldiät zu deutlichen Anstiegen der ApoE-Spiegel im Serum und im frontalen Kortex (Howland et al., 1998).

Aktuelle *in vivo* Studien mit Statinen deuten auf eine pharmakologische Beeinflussung des zentralen Cholesterol- und Amyloidstoffwechsels durch diese Substanzklasse hin und erweitern somit die bereits beschriebenen *in vitro* Befunde zur A β -Bildung in Zellkulturen (siehe 1.4.5.3; Tabelle E4). Simvastatin induzierte im CSF und Hirnhomogenat von Meerschweinchen eine signifikante Reduktion der A β ₁₋₄₀- und A β ₁₋₄₂-Spiegel, ohne den zerebralen Gesamtcholesterol-Gehalt zu beeinflussen (Fassbender et al., 2001). Stattdessen ergaben sich signifikante Reduktionen im Gehalt des Cholesterol-Vorläufers Lathosterol (Fassbender et al., 2001). In Analogie zu diesen Befunden senkte eine achtwöchige Behandlung von PSAPP-transgenen Mäusen mit Atorvastatin den zerebralen A β -Load sowie den Gehalt an Plasmacholesterol signifikant gegenüber Kontrollen ab, ohne die Cholesterospiegel im ZNS zu beeinflussen (Petanceska et al., 2002). Zudem ergab sich eine positive Korrelation zwischen Plasmacholesterol und den A β ₁₋₄₀- bzw. A β ₁₋₄₂-Spiegeln im Gehirn (Petanceska et al., 2002).

Zwei retrospektive, nicht indikationsbasierte Humanstudien an Patientenkollektiven mit Hyperlipidämie bzw. kardiovaskulärem Erkrankungsbild berichten von einer bis zu 70%

reduzierten Alzheimer-Prävalenz unter Statintherapie im Vergleich zu anderer lipidsenkender Medikation (Wolozin et al., 2000; Jick et al., 2000). Diese Effekte wurden zum einen für Lovastatin und Pravastatin (Wolozin et al., 2000), zum anderen für Simvastatin und Pravastatin (Jick et al., 2000) beobachtet. In einer anderen kürzlich veröffentlichten retrospektiven Kohorten-Studie mit einem ausgewählten Patientenkollektiv von Individuen über 65 Jahren wird ebenfalls ein vermindertes Demenzrisiko unter Statintherapie für Patienten unter 80 Jahren dokumentiert (Rockwood et al., 2002). Neben einer verminderten Alzheimer-Prävalenz wurde unter Statingabe in einer retrospektiven Studien-Analyse ein positiver Einfluß der Statine auf die Progression kognitiver Störungen beobachtet (Hajjar et al., 2002). Umgekehrt war der Statin-Gebrauch bei dementen Patienten niedriger als bei gleichaltrigen nicht-dementen Personen (Rodriguez et al., 2002). Inwieweit somit einzelne Studienergebnisse von der sogenannten „indication-bias“, d.h. dem häufigeren Statin-Gebrauch von gesünderen, gebildeteren und gesundheitsbesorgten Menschen, beeinflusst werden, bleibt unklar.

In zwei weiteren Humanstudien wurde kürzlich der Effekt verschiedener Statine auf den zerebralen Cholesterol- und Amyloidstoffwechsel untersucht (Fassbender et al., 2002; Simons et al., 2002). So führte die 6-monatige Behandlung mit verschiedenen Statinen an 50 nicht-dementen Patienten mit Hypercholesterolämie im Vergleich zu 50 unbehandelten Patienten mit Hypercholesterinämie und 50 unbehandelten Patienten mit normalen Cholesterolwerten zu einer signifikanten Abnahme von CSF-Cholesterol und Lathosterol in der Statin-Gruppe gegenüber beiden Kontroll-Kollektiven (Fassbender et al., 2002). Auch die 24-S-Hydroxycholesterol-Spiegel waren unter Statintherapie signifikant gegenüber Kontrollpatienten mit normalen Plasmacholesterol-Spiegeln erniedrigt, jedoch konnte kein Statin-Effekt auf die CSF-Sekretion von $A\beta_{1-42}$ festgestellt werden (Fassbender et al., 2002). Eine andere randomisierte Doppelblind-Studie wurde an 44 dementen Patienten (MMSE 12-26) mit normalen Cholesterolwerten über 26 Wochen durchgeführt. Im Vergleich zu Placebo senkte Simvastatin (80 mg/Tag) die CSF-Spiegel an $A\beta_{1-40}$ nur in der Patienten-Gruppe mit milder Demenzsymptomatik (MMSE 21-26), wobei diese Abnahme mit der Reduktion von 24-S-Hydroxycholesterol im CSF korrelierte. Auf die Gesamtkohorte bezogen war dieser Effekt nivelliert (Simons et al., 2002).

1.4.7 Therapie der Alzheimer Demenz

Eine kausale Therapie der Alzheimer Demenz ist bis heute nicht möglich. Zur symptomatischen Therapie stehen verschiedene ältere und neuere Substanzen zur Verfügung, die einen positiven Einfluß auf die Krankheitsprogression ausüben, allerdings keine Heilung bewirken. Sie werden zusammenfassend als *Antidementiva* bezeichnet. Heutzutage müssen derartige Substanzen ihre Wirksamkeit in placebokontrollierten, randomisierten Doppelblindstudien mit definiertem Patientenkollektiv und definiertem Auswertungsregime beweisen. Dabei ist die Datenlage für die klassisch angewandten Nootropika Piracetam, Nicergolin keineswegs so gut wie für standardisierten *Gingko-biloba*-Extrakt oder die neueren Acetylcholinesterase-Hemmer. Hierzu zählen in erster Linie die Wirkstoffe Donepezil, Rivastigmin und Galantamin, die durch eine Hemmung der postsynaptischen Acetylcholinesterase (AChE-I) den Abbau des im Gehirn von Alzheimer-Patienten defizitären Neurotransmitters Acetylcholin hemmen und damit neuronale Übertragungsprozesse teilweise restaurieren (Michaelis, 2003). Dieser Wirkmechanismus impliziert, daß derartige Wirkstoffe nur bei leichter bis mittelschwerer Demenz eingesetzt werden können. Therapeutische Verwendung finden gleichfalls Calcium-Antagonisten (Nimodipin) sowie der NMDA-Rezeptor-Antagonist Memantin, der mittlerweile auch zur Behandlung schwerer Demenzformen vom Alzheimer Typ zugelassen ist. Umstritten ist dahingegen die prophylaktische Therapie mit Radikalfängern bzw. Antioxidantien wie Vitamin E.

Zukünftige Anstrengungen richten sich im wesentlichen auf eine direkte therapeutische Inhibition der amyloidogenen Stoffwechsellkaskade. Geforscht wird an Sekretase- und Proteinaggregations-Inhibitoren sowie an Immunisierungen mit exogenen A β -Vakzinen. Weiterhin sind Formulierungen für Wachstumsfaktoren wie NGF, M₂-Antagonisten oder ZNS-gängige NO-Liberatoren in der Entwicklung (Michaelis, 2003). Womöglich besitzen aber auch altbewährte Substanzen wie Statine einen therapeutischen Nutzen bei AD. Die vorliegende Arbeit setzt sich unter anderem mit dieser Fragestellung auseinander.

Tabelle E4. Cholesterol und Statine in der Pathophysiologie der Alzheimer Demenz: *In vitro*- und *in vivo*-Befunde.

<i>In vitro</i>	CHOL – (M β CD)	CHOL + (Cholesterol-Solubilisate)	Lovastatin	Simvastatin	Pravastatin	Atorvastatin
Cholesterol	↓ Simons et al., 1998; Fassbender et al., 2001; Kojro et al., 2001	↑ Bodovitz et al., 1996; Simons et al., 1998; Frears et al., 1999	↓ Simons et al., 1998; Frears et al., 1999; Buxbaum et al., 2001; Fassbender et al., 2001; Kojro et al., 2001	↓ Fassbender et al., 2001	?	?
Aβ-Load	↓	↑	↓	↓		
NFT-Load		↓ Fan et al., 2001	↑ Fan et al., 2001 (Compactin)			
<i>In vivo</i>	CHOL – (Synthetikum)	CHOL + (Cholesterol)	Lovastatin	Simvastatin	Pravastatin	Atorvastatin
ZNS-Cholesterol	= Refolo et al., 2001	↑ = Refolo et al., 2000	↓ Kirsch et al., 2001; Fassbender et al., 2002; Kirsch et al., 2003	↓ E Fassbender et al., 2002; Kirsch et al., 2003	↓ Fassbender et al., 2002; Kirsch et al., 2003	= Petanceska et al., 2002
Aβ-Load	↓	↑	?	↓ Fassbender et al., 2001; Simons et al., 2002	?	↓
AD-Prävalenz (retrospektiv)			↓ Jick et al., 2000; Wolozin et al., 2000; Hajjar et al., 2002; Rockwood et al., 2002	↓ Jick et al., 2000; Hajjar et al., 2002; Rockwood et al., 2002	↓ Wolozin et al., 2000; Hajjar et al., 2002; Rockwood et al., 2002	?

↓: Abnahme; ↑: Zunahme; =: kein Effekt; E: Effekt auf den Metabolismus.

1.5 Ziele der Arbeit

Die ursächlichen Faktoren für die forcierte neuronale Bildung und Aggregation von Amyloid-beta-Protein im Rahmen der Alzheimer Demenz sind bis heute nicht bekannt. Der exzessiven Bildung von A β durch enzymatische Prozessierung von APP kommt nach der *Amyloid-Kaskaden-Hypothese* eine zentrale Bedeutung in der Krankheitspathogenese der Demenz zu. Aktuelle Befunde belegen ein vielfältiges Interaktionsspektrum zwischen zellulärem Cholesterol- und Amyloidstoffwechsel, das anscheinend sehr stark an die intrazelluläre Kompartimentierung beider Interaktionspartner gekoppelt ist. Initiale Veränderungen in der zentralen Cholesterol- und Lipid-Homöostase bei Alzheimer-Patienten und daraus resultierende Abweichungen in der subzellulären Menge und Lokalisation insbesondere von Cholesterol sind nach diesen Befunden ein möglicher Auslöser für eine verstärkte amyloidogene Verstoffwechslung von APP im Laufe der Erkrankung. Umstritten bleibt bei dieser *Cholesterol-Hypothese* die eigentliche Rolle des Cholesterols. Einerseits fördert es die zelluläre Bildung von A β in Neuronen und kolokalisiert in senilen Plaques, andererseits schwächt es die zellulären Effekte von maturem A β insbesondere auf Membranebene in *in vitro* Modellen deutlich ab.

Das „Spannungsfeld“ dieses scheinbaren Widerspruchs bildete den wissenschaftlichen Rahmen der vorliegenden Arbeit. *Im Fokus stand dabei die Frage, inwieweit man durch Veränderungen des Gesamtcholesterol-Gehalts und der Verteilung von Membrancholesterol-Pools in Hirnmembranen einen Einfluß auf A β -induzierte membranäre und zelluläre Dysregulationen nehmen kann.* Die Verfügbarkeit pharmakologischer Strategien zur Modifikation des zentralen Cholesterolspiegels im Gehirn gewinnt vor dem Hintergrund der Cholesterol-Hypothese der Alzheimer Demenz und darauf basierender zukünftiger Therapieoptionen zunehmend an Bedeutung. Im Laufe der Dissertationsarbeit wurden dementsprechend Cholesterol-Modulationen an *in vitro* und *in vivo* Versuchsmodellen durchgeführt. *In vitro* Variationen des Membrancholesterol-Spiegels wurden mit M β CD und seinen Cholesterol-Einschlußverbindungen an Membranfraktionen von PC12-Zellen und Maushirn-Membranen etabliert. An einem *in vivo* Maus-Modell wurde getestet, ob und inwieweit die in der Therapie peripherer Hypercholesterinämien etablierten Hemmstoffe der HMG-CoA-Reduktase (Statine) auch Veränderungen der *zentralen* Cholesterol- und Lipid-Homöostase induzieren. In einem vergleichbaren Rattenmodell wurde den Tieren eine cholesterolreiche Diät verabreicht, um eine mögliche Einflußnahme des Nahrungscholesterols auf die zerebrale Lipid-Homöostase zu überprüfen.

Bei sämtlichen Strategien zur Cholesterol-Modulation wurde weiterhin der Frage nachgegangen, inwiefern diese Modulationen

1. die zellulären Membraneffekte von aggregiertem A β auf Ebene der PM beeinflussen, und
2. eine Umverteilung submembranärer Cholesterol-Pools bewirken, die womöglich an einer Interaktion von Cholesterol und A β auf molekularer Ebene beteiligt sind.

Sowohl *ex vivo* als auch *in vitro* wurden die Versuchsreihen an der Maus zum einen an Ganzhirnmembran-Fractionen, und zum anderen an frisch isolierten SPMs durchgeführt. Basierend auf den Ergebnissen dieser Studien sollte anschließend an SPMs aus Kortex-Gewebe von Alzheimer-Patienten untersucht werden, inwieweit hier Umverteilungen von membranären Cholesterol-Domänen im Vergleich zu Kontrollpatienten vorliegen, die eventuell ursächlich an der Amyloid-Pathologie bei der Alzheimer Demenz beteiligt sind.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Materialien

Abbe-Refraktometer Modell Atago, Firma Jakobs, Mainz
Block-Thermostat Block-Heater SHT/D, Firma Merck, Darmstadt
Block-Thermostat Modell HB-130, Firma CLF, Emersacker
Branson Sonifier, Cell Disruptor B15, Firma Branson Ultrasonics Corp., Danbury
Combitips® 0.5 ml, 2.5 ml, 10 ml, Firma Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
DC-Kammern, Vollglas, Firma Desega, Heidelberg
DC-Platten Kieselgel 60 F₂₅₄, 5x10 cm und 10x20 cm, 0.25 mm Schichtdicke, sowie 20x20 cm, 1 mm Schichtdicke; Firma Merck, Darmstadt
Duran-Glasröhrchen 10 ml, Firma Schott, Mainz
Edelstahlkanülen Luer-Lock, stumpf, 10 cm, 1410LL-25, Firma Acufirm, Dreieich
Einmal-Inkubationsröhrchen Modell Assistent 2775/5, 100x10 mm, Firma Fisher Scientific, Nidderau
Einmalspritzen Injekt 5 ml Luer, Firma Braun, Melsungen
Elektrophorese-Kammer Modell Mini-Protean® II, Firma BioRad, München
Elektrophoretische Transfer-Kammer Mini-Trans-Blot®, Firma BioRad, München
Eppendorf-Rack, 80 well, Firma Roth, Karlsruhe
Exsiccator Vollglas, belüftbar, Firma Aswer, Wertheim
Falcon-Zentrifugenröhrchen 15 ml und 50 ml, Firma Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Feinwaage Modell Ab204, Firma Mettler, Giessen, Schweiz
Feinwaage Modell AT261, Firma Mettler, Giessen, Schweiz
Filterpapier Nr. 597, 185 mm Marke Selecta, Firma Schleicher & Schüll GmbH, Einbeck, Deutschland
Fluoreszenzspektrometer SLM Aminco Bowman Series 2, Firma SLM Instruments, Urbana, USA
Ganzglasspritzen Fortuna® Optima® 5 ml, 10 ml, 20 ml, Firma Poulten&Graf GmbH, Wertheim
Gelgieß-Kammer Modell Easy-Cast B1, Firma Peqlab, Heidelberg
Glaskapillaren 100x1 mm, Firma Hilgenberg, Malsfeld
Glas-Mikroliterspritze Volumen 1 µl, Firma Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Hand-Teflonpistill für 1.5 ml Eppendorf-Cups, Eigenanfertigung
HPLC-Anlage Varian Star mit zwei Kolbenhubpumpen Typ Rainin Dynamay solvent delivery system SD-200 und Pressure-Modul (4000 psi), dynamischem Mischer, Autosampler Typ Varian pro Star 410, UV-Detektor Typ Rainin Dynamax absorbance detector UV-D II; Steuerung und Auswertung über Varian Star 5.31 Chromatography Software; Firma Varian Deutschland GmbH, Darmstadt
HPLC-Säule LichroSpher® 100 RP-18, 5 µm, 250-4; Firma Merck, Darmstadt
Knopfkanüle Edelstahl, Innendurchmesser 1 mm, Luer-Lock, Firma Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen
Kryo-Gefäße Modell Cryo-S, 2 ml, Firma Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Kühlzentrifuge Modell GS-6R, Firma Beckman, München
Kühlzentrifuge Modell J2-21 mit JA-20 und JA-20.1 Rotor, Firma Beckmann, München

Luer-Lock Kanülen Microlance 3, 0.45x13, 26G1/2, Firma Becton Dickinson, GmbH, Heidelberg

Magnetrührer, Modell Variomag, Firma Mono, München

Meßpipetten 10 ml, 20 ml, 25 ml, 30 ml, 50 ml, Glas, Firma Brand, Wertheim,

Mikro-Kühlzentrifuge Modell Mikrofuge R, Firma Beckman, München

Mikro-Zentrifuge, Mikrofuge B, Firma Beckmann, München

Mikrotiterplatten Maxisorb 96 well, Firma Nunc, Wiesbaden

Multipette, Firma Eppendorf, Hamburg

Orbitalschüttler, Modell Promax 1020, Firma Heidolph, Kelkheim

Parafilm[®], Firma Roth, Karlsruhe

Pasteurpipetten, Firma Merck, Darmstadt

pH-Meter Modell CG825, Firma Schott, Hofheim

Photometer für Mikrotiterplatten Modell Digiscan, Firma Asys Hightech, Eugendorf

Pipetten Modelle Pipetman 2, 10, 20, 100, 200, 1000, 5000 µl, Firma Abimed, Langenfeld

Plastik-Einmal-Küvette Modell PMMA, Firma Brand, Wertheim

Plastik-Einmal-Pipette, Firma Greiner Labortechnik, Frickenhausen

Plastikspritzen Plastipak[®] 1 ml, 40 I.U., Firma Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

Porzellanfritte 127c, 5 cm, Firma Haldenwanger, Berlin

Potter, Glashomogenisator mit Teflonpistill, Firma B. Braun, Melsungen

Pottergläser 15 ml, Firma B. Braun Biotech International, Melsungen

Pottergläser 5 ml, Firma Kontes Glass Co., Vineland, New Jersey, USA

Präparierbesteck, Firma Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen

PVDF-ImmobilonTM-P-Transfermembran, Firma Millipore, Eschborn

Quarzküvetten Modelle 101-QS 10 mm mit Glasboden, polarimetrisch geeicht, Firma Helma, Mühlheim

Reaktionsgefäße 0.5, 1.5 und 2 ml, Firma Eppendorf, Hamburg

Rotavapor R, Firma Büchi-Labortechnik GmbH, Konstanz; Membranpumpe M72C und Steuereinheit CVC 24, Firma Vacuubrand GmbH Co KG, Wertheim

Schüttler Modell ST5, Firma Zipper GmbH, Staufen

Spektralphotometer Modell UV2000, Firma Hitachi, Tokyo, Japan

Steril-Membranfilter Modell Minisart SRP 25 PTFE, Porengröße 0.45 µm, Firma Satorius, Göttingen

Thermomixer Modell Comfort, Firma Eppendorf, Hamburg

Transferpipetten Modell E800 10-100 µl und 100-300 µl, Firma Brand, Wertheim

Trockenschrank Modell TK E 117, Firma Ehret GmbH, Emmendingen

Tube-Sealer Modell 342428, Firma Beckman, München

Ultraschallbad, Sonorex RK105H, Firma Bandelin, Berlin

Ultra-Turax, Firma Janke und Kunkel GmbH, Staufen

Ultrazentrifuge Modell L8-70M mit SW-28 und SW-41 Rotor, Firma Beckmann, München

Universalindikator-Stäbchen pH 0-14 sowie pH 7.5-14, Firma Merck, Darmstadt

Universal UV-Lampe, Firma Camag, Berlin

Vollpipetten 10 ml, 20 ml, 25 ml, 50 ml, Glas, Firma Brand, Wertheim

Vortexer Modell Reax 2000, Firma Heidolph, Kelkheim

Wasserbad Modell 1083, Firma GFL, Burgwedel

Wasserbad Modell 6A, Firma Julabo, Seelbach

Zentrifugenbecher Modell PP (30 ml und 12 ml), Firma Schubert, Mannheim

Zentrifugenbecher, Modell Ultraclear (30 ml und 12 ml), Firma Beckman, München

Zentrifugenbecher Polyallomer Quick-Seal 3.9 ml und 5.9 ml Tubes mit Kappe, Firma Beckman, München

2.1.2 Chemikalien

Acetonitril		Merck, Darmstadt
Acrylamid 40%		Bio-Rad, München
Agarose		Sigma, München
4-Aminoantipyrin		Sigma, München
Ammoniak	NH ₃	Merck, Darmstadt
Ammoniumchlorid	NH ₄ Cl	Merck, Darmstadt
Ammoniummolybdat-Tetrahydrat	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4H ₂ O	Fluka, Buchs
Ammoniumpersulfat	APS	Sigma, München
Amyloid-Peptide:	Aβ	
Aβ ₂₅₋₃₅ (Lot 30K49521, 76H0657, 70K49531)		Sigma, München
Aβ ₂₅₋₃₅ (Lot 0539704)		Bachem, Heidelberg
Aβ ₁₋₄₂ (Lot 0535120, 0511908, 0524548)		Bachem, Heidelberg
Bis-Solution 2%		Bio-Rad, München
Bovines Serum Albumin	BSA	Roche, Mannheim
Brij® 35		Merck, Darmstadt
Bromphenolblau		Sigma, München
Chloroform		Merck, Darmstadt
Cholesterol		Sigma, München
Cholesterol-Oxidase (<i>cellulomonas sp.</i>)		Sigma, München
Cholesterol-Oxidase (<i>rhodococcus erythropolis</i>)		Roche, Mannheim
Cholesterolstandards Periset		Roche, Mannheim
Dehydroergosterol (Lot 32K4028, 52K4120, 81K4067, 75H4053, 87H4034, 110K4038)	DHE	Sigma, München
Dichlormethan		Merck, Darmstadt
Dimethylformamid	DMF	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid	DMSO	Merck, Darmstadt
Diphenylhexatrien	DPH	Sigma, München
ECL-Detektionslösung	ECL	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England
Eisen(III)chlorid	FeCl ₃	Merck, Darmstadt
Ethanol	EtOH	Merck, Darmstadt
Ethylacetat		Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure	EDTA	Sigma, München
Ficoll		Sigma, München
Glucose		Merck, Darmstadt
Glycerin		Merton Apotheke, Frankfurt
Heptan		Merck, Darmstadt
Hexan		Merck, Darmstadt
Hydroxyethylpiperazinethansulfonat	HEPES	Sigma, München
Isopropanol		Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	KCl	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogencarbonat	KHCO ₃	Merck, Darmstadt

Kohlendioxid	CO ₂	Messer Griesheim, Krefeld
Lactose		Inst. f. Pharm. Technologie, Biozentrum Niederursel
Lactulose		Fluka, Buchs
Lovastatin		MSD Sharp & Dohme GmbH, Haar
Lysoform®		Dr. Hans Rosemann, Berlin
Magnesiumchlorid	MgCl ₂	Merck, Darmstadt
Magnesiumstearat		Inst. f. Pharm. Technologie, Biozentrum Niederursel
Magnesiumsulfat	MgSO ₄	Merck, Darmstadt
Maisstärke		Inst. f. Pharm. Technologie, Biozentrum Niederursel
Malachitgrün		Sigma, München
Mercaptoethanol		Merck, Darmstadt
Methanol		Merck, Darmstadt
Methyl-β-cyclodextrin	MβCD	Sigma, München
Mevinacor® 40		MSD Sharp & Dohme GmbH, Haar
Mikrokristalline Cellulose		Inst. f. Pharm. Technologie, Biozentrum Niederursel
Natriumchlorid	NaCl	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	NaOH	Merck, Darmstadt
N,N,N,N'-Tetramethylethylendiamin	TEMED	Bio-Rad, München
1-Palmitoyl-2-oleylphosphatidylcholin	POPC	Sigma, München
Perchlorsäure	HClO ₄	Merck, Darmstadt
Perform®		Schülke & Mayr, Norderstedt
Peroxidase (Horseradish)		Sigma, München
Phenol		Sigma, München
Picrylsulfonsäure	TNBS	Sigma, München
Polyoxyethylen-20-sorbitanmonolaurat	Tween 20	Sigma, München
Polyoxyethylen-80-sorbitanmonooleat	Tween 80	Sigma, München
Ponceau S Solution		Sigma, München
Pravastatin-Natrium		Sankyo Pharma GmbH, München
Pyren		Sigma, München
Saccharose		Sigma, München
Salzsäure	HCl	Merck, Darmstadt
Simvastatin		MSD Sharp & Dohme GmbH, Haar
Sodiumdodecylsulfat	SDS	Sigma, München
Sphingomyelinase (<i>streptomyces sp.</i>)		Sigma, München
Stickstoff	N ₂	Messer Griesheim, Krefeld
Sucrose, ultrarein		Sigma, München
Tetrahydrofuran	THF	Merck, Darmstadt
t-Octylphenoxypolyethoxyethanol	Triton X-100	Sigma, München
Trimethylammoniumdiphenylhexatrien	TMA-DPH	Sigma, München
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	TRIS	Sigma, München
Wasserstoffperoxid, 30 %	H ₂ O ₂	Sigma, München

2.1.3 Kits und Antikörper

Kits

Bio-Rad DC Protein Assay	(Lowry)	BioRad, München
Bio-Rad Protein Assay	(Bradford)	BioRad, München
Enzymkit Chol Nr. 2016630	(CHOD-PAP)	Roche, Mannheim
Enzymkit F-Chol MPR1	(CHOD-PAP)	Roche, Mannheim
Lipid Peroxidation Assay Kit	(LPO)	Calbiochem, Bad Soden/T.

Antikörper

Anti-Flotillin IgG1 von der Maus	Primär-Ak	Transduction Laboratories, Lexington
Anti-Na ⁺ -K ⁺ -ATPase β 2 IgG2b von der Maus	Primär-Ak	Transduction Laboratories, Lexington
Anti-mouse IgG, H&L Ch. (Goat), Peroxidase konjugiert	Sekundär-Ak	Calbiochem, Bad Soden/T.

2.1.4 Puffer und Lösungen

Alle selbst angesetzten Puffer und Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser frisch hergestellt und der geforderte pH-Wert mit einer Einstabmeßkette eingestellt. Das pH-Meter (CG825, Firma Schott) wurde täglich neu kalibriert.

Puffer

PBS-Puffer (136.75 mmol/l NaCl; 2.68 mmol/l KCl; 6.48 mmol/l Na₂HPO₄; 1.47 mmol/l KH₂PO₄; pH 7.4)

Puffer I (0.32 mol/l Sucrose; 10 mmol/l HEPES; pH 7.4)

Puffer II (0.32 mol/l Sucrose; 10 mmol/l HEPES; 0.25 mmol/l EDTA; pH 7.4)

Puffer III (TRIS-HCl Puffer 5 mmol/l; pH 8.5)

Puffer IV (TRIS-HCl Puffer 5 mmol/l; pH 7.4)

Puffer V (TRIS-HCl Puffer 50 mmol/l; pH 7.4)

Puffer VI (136.75 mmol/l NaCl; 2.68 mmol/l KCl; 8.1 mmol/l Na₂HPO₄; 1.47 mmol/l KH₂PO₄; Glucose 2 mg/ml; pH 7.4)

Puffer VII (30 mmol/l NaCl; 120 mmol/l NaHCO₃; 11 mmol/l Glucose; 1 % (m/v) BSA; pH 8.3)

Puffer VIII (TRIS-HCl Puffer 0.5 mol/l; pH 6.8)

Puffer IX (TRIS-HCl Puffer 1.5 mol/l; pH 8.8)

Puffer X (TRIS-HCl Puffer 20 mmol/l; pH 7.4)

Lösungen

Ammoniummolybdat-Malachitgrün-Lösung (4.2 % Ammoniummolybdat in 5N HCl / 0.2 % Malachitgrün in H₂O_{bidest.} 1/3 (v/v))
 Brij® 35-Lösung, 15 % in Puffer IV
 BSA/PBS-Lösung (1 % BSA (m/v) in PBS-Puffer)
 DHE-Lösung (5 mmol/l in Ethanol)
 Doles Reagenz Lösung (Isopropanol/Heptan/Wasser 4/1/0.1)
 DPH Fluoreszenzfarbstoff-Stammlösung (0,1 mg/ml in DMSO)
 DPH Fluoreszenzfarbstoff-Stammlösung (5 mmol/l in THF)
 EDTA-Stammlösung (2 mmol/l; pH 7.4)
 Gradient I (7.5 w/v % Ficoll + 0.25 mmol/l EDTA in H₂O_{bidest.})
 Gradient II (14 w/v % Ficoll + 0.25 mmol/l EDTA in H₂O_{bidest.})
 Gradient III (1.5 mol/l Sucrose; 10 mmol/l HEPES; 0.25 mmol/l EDTA; pH 7.4)
 Gradienten-Stammlösung (30% Ficoll in Puffer I)
 Kaliumdihydrogenphosphat-Stammlösung (KH₂PO₄ 100 mg/l in H₂O_{bidest.})
 Komplexlösung (M β CD 30 mmol/l, Cholesterol 3 mmol/l)
 M β CD-Lösung 30 mmol/l, 400 mmol/l
 POPC-Lösung 1 mg/ml in Chloroform
 Protein Reagenz A, Firma BioRad, München (alkalische Kupfer-Tatratlösung)
 Protein Reagenz B, Firma BioRad, München (Folin-Ciocalteu-Reagenzlösung)
 Pyren-Stammlösung (1 mmol/l in DMF)
 Saccharoselösung (0.32 mol/l in H₂O_{bidest.})
 SDS-Lösung 10 % in H₂O_{bidest.}
 TMA-DPH Fluoreszenzfarbstoff-Stammlösung (5 mmol/l in DMF)
 Tween 20-Lösung 1.5 %

Lösungen für den Cholesterol-Assay

Lösung 1	Phenol	188.22 mg/100 ml
	Methanol	5.93 g/100 ml
	M β CD	1 g/100 ml
	Puffer V	ad 100 ml
	pH	7.7
Lösung 2	4-Aminophenazon	40.64 mg/100 ml
	Methanol	5.93 g/100 ml
	Brij 35	0.4 g/100 ml
	Puffer V	ad 100 ml
	pH	7.7
Enzymlösung	Cholesterol-Oxidase (<i>cellulomonas sp.</i>)	12 U/ml
	Peroxidase	8 U/ml
	Puffer IV	ad 1 ml

Lösungen für Western Blot-Technik

Elektrophorese-Puffer (10x)	Tris-Base	29 g
	Glycin	144 g
	SDS	10 g
	H ₂ O _{bidest.}	ad 1 Liter
Transfer-Puffer (10x)	Tris-Base	30.3 g
	Glycin	144 g
	H ₂ O _{bidest.}	ad 1 Liter
Transfer-Puffer (1x)	10x-Konzentrat	100 ml
	H ₂ O _{bidest}	800 ml
	Methanol	100 ml
	SDS 20 %	2 ml
TBS-Lösung (1x)	Tris-Base	3 g
	NaCl	8 g
	H ₂ O _{bidest}	ad 1 Liter (pH 7.4)
TBST-Lösung (1x)	TBS	500 ml
	Tween 20	1 ml
Milchlösung	TBST-Lsg.	50 ml
	NonFat Dry Milk	2.5 g
	BSA	1.5 g
Azid-Lösung (100x)	Natriumazid	2 %
Azid-Lösung für Primär-Antikörper (Flotillin)	Azid-Lsg. (100x)	10 µl
	Pferdeserum HS/TBST 1:1	10 ml
	Antikörper	40 µl
Azid-Lösung für Primär-Antikörper (Na ⁺ -K ⁺ -ATPase)	Azid-Lsg. (100x)	10 µl
	Pferdeserum HS/TBST 1:1	10 ml
	Antikörper	20 µl
Lösung für Sekundär-Antikörper	Pferdeserum HS/TBST 1:1	10 ml
	Antikörper	1 µl
Samplebuffer (2x)	Glycerol	4 ml
	10 %ige SDS-Lsg.	3 ml
	Mercaptoethanol	0.6 ml
	Bromphenolblau	
	H ₂ O _{bidest.}	2.4 ml

Sammelgel	40 % Acrylamid	0.48 ml
	2 % Bis-Acrylamid	0.26 ml
	Puffer VIII	1.26 ml
	10 %ige SDS-Lsg.	0.05 ml
	H ₂ O _{bidest.}	2.92 ml
	TEMED	0.006 ml
	APS-Lsg.	0.026 ml
Trenngel	40 % Acrylamid	5.83 ml
	2 % Bis-Acrylamid	3.22 ml
	Puffer IX	5.00 ml
	10 %ige SDS-Lsg.	0.20 ml
	H ₂ O _{bidest.}	5.65 ml
	TEMED	0.01 ml
	APS-Lsg.	0.10 ml

2.2 Gewebe-Proben

2.2.1 Zellkultur-Proben

In einer Kooperations-Arbeit mit Herrn Dr. Steffen Leutz und Herrn Dr. Gunter P. Eckert wurden Versuche an einem Stamm von Phäochromozytom-Zellen der Ratte (PC12-Zellen) durchgeführt. Diese Zellen ähneln in ihren Eigenschaften neuronalen Zellen und sind ein etabliertes Modell in unserer Zellkultur (Leutz, 2001).

2.2.1.1 Gesamtmembran-Präparation aus PC12-Zellen

Zur Präparation des Zellhomogenats wurde ein Zellpellet aus etwa 15 Millionen Zellen (entsprechend etwa 800 µg Protein) in 15 ml eiskaltem Puffer IV (Tris-HCl 5mmol/l, pH 7.4) aufgenommen und mit Hilfe eines Homogenisators (Glashomogenisator mit Teflonpistill, Firma Braun) bei ca. 1.200 U/min durch 10-maliges Auf- und Abbewegen des Teflonpistills homogenisiert (Pottergläser 15 ml, Firma Braun Biotech International). Anschließend wurde die Suspension in Zentrifugenröhrchen (PP 30 ml, Firma Schubert) überführt. Pistill und Pottergefäß wurden mit einer definierten Menge eiskaltem Puffer IV nachgespült und das Hirnhomogenat bei 4°C für 20 Minuten bei 48.000 g (= 20.000 U/min) zentrifugiert (Beckman Kühlzentrifuge J2-21, Rotor JA-20). Der Überstand wurde verworfen und das resultierende Zellpellet mit einer 1000 µl-Pipette (Firma Abimed) grob in 0.5 ml kaltem Puffer IV suspendiert und in ein 1.5 ml Eppendorf-Cup überführt (1. Waschschrift). Das

Zentrifugenröhrchen wurde nochmals mit 0.5 ml Puffer IV nachgespült. Es folgte Zentrifugation des Ansatzes für 5 Minuten bei 4°C und 20.000 g (= 14.950 U/min) in einer Tisch-Kühlzentrifuge (Modell Microfuge R, Firma Beckman). Der Überstand wurde verworfen und das neuerliche Pellet in 250 µl Puffer IV mit Hilfe eines kleinen Hand-Teflon-Pistills resuspendiert (2. Waschschrift). Die Suspension wurde dann ein 2. Mal analog für 10 Minuten zentrifugiert. Das resultierende Zellpellet wurde in 200 µl Puffer IV mittels einer 1 ml Plastikspritze mit Kanüle (Microlance 3, 0.45x13, 26G1/2) fein dispergiert und gevortext. Ein Aliquot dieser Zellsuspension wurde 1:5 verdünnt und der Proteingehalt bestimmt. Weiterhin wurden Cholesterol- und DPH-Anisotropiemessungen sowie Fluoreszenzmessungen mit Pyren durchgeführt (siehe 2.3.2 und 2.6).

2.2.2 Maus-Proben

2.2.2.1 Maus-Proben für *in vitro* Studien

Für *in vitro* Untersuchungen im Rahmen von Alt-Jung-Vergleichen wurden weibliche NMRI-Mäuse (Naval Medical Research Institute) verschiedenen Alters von der Firma Harlan-Winkelmann GmbH, Gartenstraße 27, 33178 Borcheln (Tel.: 05251/131510), bezogen. NMRI-Mäuse unterliegen als Auszucht-Stamm einer ständigen Veränderung des Genpools durch Auskreuzen der Tiere und weisen insofern einen heterogenen genetischen Hintergrund auf. Der NMRI-Stamm wird weltweit in etablierten Tiermodellen eingesetzt.

Die Tiere wurden im zentralen Tierstall des Pharmakologischen Instituts in Standard-Altrominkäfigen mit Futter und Wasser *ad libitum* gehalten (siehe auch 2.3.2). Die Temperatur im Tierstall betrug konstant 25°C bei ebenfalls konstanter Luftfeuchtigkeit. Beleuchtung und Verdunklung erfolgten im 12 Stunden-Rhythmus.

2.2.2.2 Maus-Proben für *in vivo* Studien

Im folgenden werden die in den Tierversuchsstudien eingesetzten Mäusestämme spezifiziert.

A) C57BL/6JICO-Mäuse, nicht genetisch modifiziert

Bei den C57BL/6J-Mäusen handelt es sich um einen weltweit eingesetzten Inzucht-Stamm mit homogenem genetischen Hintergrund der Nachkommen (Geschwister-Verpaarung). Männliche und weibliche C57BL/6J-Mäuse im Alter von 1-2 Monaten (Jungtiere) bzw. im

Alter von 12 Monaten (mittelalte Tiere) wurden über die Firma Charles River, Sandhofer Weg 7, 97633 Sulzfeld (Tel.: 09761/40630), bezogen.

B) C57BL/6-apoE^{tm1Unc}-Mäuse

Diese apoE-knockout-Mäuse entstehen vor einem C57BL/6JICO-Hintergrund durch gerichtete Inaktivierung des apoE-Gens in embryonalen Stammzellen (129/Ola) nach einer Rekombinationstechnik von Dr. Maeda, University of North Carolina, USA. Weibliche C57BL/6-apoE^{tm1Unc}-Mäuse im Alter von 12 Monaten wurden bei IFFA-CREDO S.A. Transgenic Alliance Department, BP 0109 – F69592 L'Arbresle Cedex, France (Tel.: 33474016970), bezogen.

Infolge abnormal hoher Serum-Cholesterol-Spiegel zeigen diese Tiere bereits ab einem Alter von 6 Wochen atherosklerotische Läsionen (Moghadasian et al., 2001). Gleichfalls gibt es Hinweise auf einen veränderten zerebralen Lipidmetabolismus dieser Tiere (Walker et al., 1997; Mato et al., 1999; Pratico et al., 1999) (siehe 4.5).

Untersuchungen an diesen Tieren erlaubten uns im Vergleich mit nicht genetisch modifizierten Black-Six-Mäusen wertvolle Aussagen zur Bedeutung des ApoE-Lipoproteins im zentralen Cholesterolstoffwechsel.

2.2.2.3 Präparation von tierischem Gewebe

Hirnmateriale für *in vitro* Untersuchungen wurde weiblichen NMRI-Mäusen verschiedener Altersklassen entnommen. Hinsichtlich der mittleren Lebenserwartung dieser Mäuse sind sie in einem Alter von 1 bis 5 Monaten als jung, von 6 bis etwa 15 Monaten als mittelalt und von 16 bis 24 Monaten als alt zu klassifizieren. Im Alter von 2 bis 22 Monaten wurden die Tiere durch zervikale Überstreckung und sofortige Dekapitation für die weitere Organentnahme getötet. Nach Entnahme des Gehirns wurden der Hirnstamm, die Medulla Oblongata und das Cerebellum auf einem Eisbett entfernt. Die Hemisphären bzw. das unzerteilte Großhirn wurden anschließend bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C gelagert.

Analog wurde auch Gewebemateriale von Black-Six-Mäusen aus *in vivo* Studien gewonnen (siehe 2.4).

2.2.2.3.1 Präparation von Ganzhirnmembranen der Maus

Für die Ganzhirnmembran-Präparation wurde die Vorschrift von Eckert (2000) verwendet. Die tiefgefrorenen oder frischen Maus- Hemisphären wurden nach dem Wiegen in 15 ml eiskaltem (4°C) Puffer IV (Tris-HCl 5mmol/l, pH 7.4) aufgenommen und mit Hilfe eines Homogenisators (Glashomogenisator mit Teflonpistills, Firma Braun) bei ca. 1.100 U/min durch 15-maliges Auf- und Abbewegen des Teflonpistills homogenisiert (Pottergläser 15 ml, Firma Braun Biotech International). Anschließend wurde die Suspension in Zentrifugenröhrchen (PP 30 ml oder PP 12 ml, Firma Schubert) überführt. Pistill und Pottergefäß wurden mit einer definierten Menge eiskaltem Puffer IV nachgespült und das Hirnhomogenat bei 4°C für 20 Minuten bei 48.000 g (= 20.000 U/min) zentrifugiert (Beckman Kühlzentrifuge J2-21, Rotor JA-20). Der Überstand wurde verworfen und das resultierende Pellet mit 20 ml eiskaltem Puffer IV aufgenommen. Diese Suspension wurde mit Hilfe eines Ultra-Turrax (T25, Firma Janke & Kunkel) bei etwa 13.500 U/min für 15 Sekunden homogenisiert, aliquotiert (4x5 ml sowie ein 100 μl -Aliquot für eine Proteinbestimmung) und erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die daraus resultierenden Pellets wurden bei -20°C tiefgefroren und für weitere Verarbeitungsschritte neuerlich unter Einstellung eines definierten Proteingehaltes resuspendiert.

2.2.2.3.2 Präparation von subzellulären Hirnmembranen der Maus

Bei dieser Präparation wurde die Vorschrift von Eckert et al. (2001b) angewendet. Hierbei wird das Hirnhomogenat durch differentielle Zentrifugation grob fraktioniert. Anschließend wird die synaptosomen- und mitochondrienreiche Fraktion durch einen zweistufigen, diskontinuierlichen Dichtegradienten aufgetrennt.

Für die Membranpräparation wurden 2x3 bis 2x5 Gehirne (ein Gehirn wiegt im Durchschnitt etwa 0.25-0.4 g) in zwei Pottergefäßen mit je 15 ml Puffer II (0.32 mol/l Sucrose; 10 mmol/l HEPES; 1 mmol/l EDTA; pH 7.4) mit Hilfe eines Homogenisators (Glashomogenisator mit Teflonpistill, Firma Braun) bei ca. 1.100 U/min durch 15-maliges Auf- und Abbewegen des Teflonpistills homogenisiert und in Zentrifugenröhrchen (PP 30 ml, Firma Schubert) überführt. Pistill und Pottergefäß wurden mit einer definierten Menge Puffer II nachgespült und das Homogenat bei 4°C für 10 Minuten bei 585 g (= 2.200 U/min) zentrifugiert (Beckman Kühlzentrifuge J2-21, Rotor JA-20). Der Überstand wurde aufbewahrt und das resultierende P1-Pellet verworfen. Die gesammelten Überstände wurden anschließend bei 4°C für 20 Minuten bei 17.400 g (= 12.000 U/min) zentrifugiert (Beckman Kühlzentrifuge J2-21, Rotor JA-20). Das resultierende synaptosomen- und mitochondrienreiche Pellet P2 wurde in 5 ml Puffer I (0.32 mol/l Sucrose; 10 mmol/l HEPES; pH 7.4) aufgenommen und mit einer Pipette (Abimed 5ml) resuspendiert, die Suspension dann in ein 5 ml Pottergläschen überführt und mit einem Teflonpistill mit der Hand homogenisiert. Das Homogenat wurde vorsichtig in einem Zentrifugenröhrchen (Ultraclear 30 ml, Firma Beckman) über einen zweistufigen Ficoll-Gradienten (10 ml 7.5% & 15 ml 14% Ficoll (w/v)) geschichtet. Die Zusammensetzung der jeweils frisch hergestellten Ficoll-Gradienten wurde vor jeder Präparation über eine Dichtebestimmung mit Hilfe eines Abbe-Refraktometers (Atago, Firma Jakobs) überprüft. Die geforderte Dichte des 7.5 % Gradienten lag im Bereich von 1.3750-1.3580 (entspricht ca. 16.5 Brix), die des 14 % Gradienten lag im Bereich von 1.3640-1.3650 (entspricht ca. 20.5 Brix). Die Gradienten wurden dann bei 4°C für eine Stunde bei 87.300 g (= 22.000 U/min) zentrifugiert (Beckman Ultrazentrifuge L8-70M, Rotor SW-28). Das resultierende mitochondriale Pellet P4 wurde aufbewahrt. Das Material an der Zwischenschicht der beiden Gradienten wurde vorsichtig mittels einer 20 ml Fortuna® Glasspritze (Firma Poulten & Graf GmbH, Wertheim) mit abgestumpfter 10 cm Edelstahlkanüle (Firma Acufirm, Dreieich) abgesaugt und gesammelt. Die vereinigten Zwischenschichten wurden mit Puffer I 1:3 verdünnt und bei 4°C und 48.000 g (= 20.000 U/min) für 20 Minuten zentrifugiert (Beckman Kühlzentrifuge J2-21, Rotor JA-20). Das resultierende Pellet wurde mit 5 ml Puffer I

resuspendiert und nochmals für 20 Minuten bei 48.000 g (= 20.000 U/min) zentrifugiert (Beckman Kühlzentrifuge J2-21, Rotor JA-20). Der Überstand wurde verworfen und das aufgereinigte synaptosomale Pellet P3 mit 15 ml Puffer III (Tris-HCl 5 mmol/l; pH 8.5) mittels einer 5 ml Abimed-Pipette in einem Zentrifugenröhrchen (PP 30 ml, Firma Schubert) resuspendiert.

Im Rahmen der TNBS-Quenching Technik (siehe 2.7.1) wurden die Synaptosomen an dieser Stelle in einem Zwischenschritt mit TNBS gelabelt (siehe Protokoll 2.7.1.1). Andernfalls wurde wie nachfolgend beschrieben mit der Präparation fortgefahren.

Um die Synaptosomen osmotisch zu lysieren, wurde die Synaptosomen-Suspension für eine Stunde auf Eis gestellt und alle 15 Minuten für 30 Sekunden gevortext. Anschließend wurde die Suspension bei 4°C für 20 Minuten bei 43.000 g (= 19.000 U/min) zentrifugiert (Beckman Kühlzentrifuge J2-21, Rotor JA-20). Das resultierende Pellet wurde mit 5 ml eiskaltem H₂O_{bidest.} mit Hilfe einer 5 ml Abimed-Pipette resuspendiert und in einem 5 ml Potterglas mit einem Teflonpistill per Hand homogenisiert. Die homogene Mischung wurde dann vorsichtig in ein Zentrifugenröhrchen (Ultraclear 12 ml, Firma Beckman) überführt und mit 5 ml Gradient III (1.5 mol/l Sucrose; 10mmol/l HEPES; 0,25 mmol/l EDTA; pH 7.4) unterschichtet. Dieser einstufige Gradient wurde anschließend bei 4°C für 45 Minuten bei 41.000 g (= 15.000 U/min) zentrifugiert (Beckman Ultrazentrifuge L8-70M, Rotor SW-41).

Die an der Zwischenschicht des Gradienten angereicherten synaptosomalen Plasmamembranen (SPM) wurden mit Hilfe einer 10 ml Fortuna® Glasspritze (Firma Poulten & Graf GmbH, Wertheim) mit abgestumpfter 10 cm Edelstahlkanüle (Firma Acufirm, Dreieich) abgesaugt und gesammelt. Ein eventuell auftretendes Pellet enthielt Mitochondrien und gehörte insofern der P4-Fraktion an. Die SPM wurden mit der darüber befindlichen Wasserschicht vereinigt und mit ca. 5 ml eiskaltem H₂O_{bidest.} 1:3 verdünnt. Es folgte eine abschließende Zentrifugation bei 4°C für 30 Minuten bei 43.000 g (= 19.000 U/min) (Beckman Kühlzentrifuge J2-21, Rotor JA-20). Die aufgereinigten SPM-Fraktionen wurden anschließend in Puffer IV (Tris-HCl 5 mmol/l; pH 7.4) suspendiert, aliquotiert, und bei -20°C tiefgefroren. Die Anreicherung der SPM in dieser Fraktion wurde an frisch hergestellten Membranen mit Hilfe des Markerenzym Na⁺-K⁺-ATPase überprüft (siehe 2.3.4, Abb. M1).

Zur Isolation der mitochondrialen Membranen wurde das P4-Pellet mit 10 ml Puffer IV (Tris-HCl 5 mmol/l; pH 7.4) rehomogenisiert und bei 4°C für 30 Minuten bei 43.000 g (= 19.000

U/min) zentrifugiert (Beckman Kühlzentrifuge J2-21, Rotor JA-20). Das aufgereinigte Mitochondrien-Pellet wurde bei -20°C tiefgefroren.

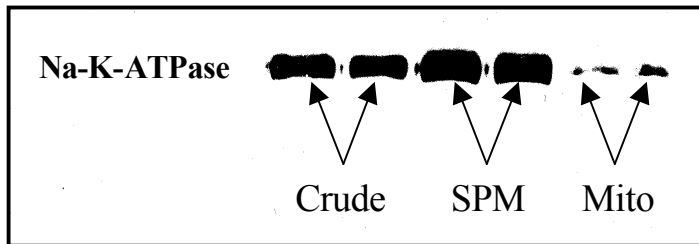


Abb. M1. Charakterisierung von Membranfraktionen.

Western-Blot-Analyse auf $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase (crude = Ganzhirn-Fraktion, SPM = synaptosomale Plasmamembran, Mito = Mitochondrien-Fraktion).

2.2.2.3.3 Spezielle Gewebeprparationen

Cerebellum

Die Präparation der nach der Entnahme tiefgefrorenen Maus-Cerebelli erfolgte analog zu 2.2.2.3.1.

Leber

Die Leber wurde aus dem Rumpf der dekapitierten Mäuse herauspräpariert und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C gelagert. Gesamtmembran-Pellets der Leber wurden analog zu 2.2.2.3.1 hergestellt und anschließend auf ihren Gesamtcholesterol-Gehalt hin untersucht.

Serum

Frisches Blut dekapitierter Mäuse wurde an der durchtrennten Schlagader mit Hilfe einer Plastikspritze (Plastipak® 1ml, 40 I.U., Firma Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) gesammelt und in mit 0.05 ml Heparin beschickte Eppendorf-Cups transferiert. Auf diese Weise wurde eine Koagulation der Proben verhindert. Nach kräftigem Vortexen folgte eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 4°C und 10.000 g (= 10.500 U/min) in einer Tisch-Kühlzentrifuge (Modell Microfuge R, Firma Beckman). Das Pellet wurde verworfen und die überstehende gekühlte Serum-Fraktion auf ihren Gehalt an Gesamtcholesterol hin untersucht.

2.2.3 Ratten-Proben

Gewebe von 2 Monate alten weiblichen Albino Wistar Ratten (Cerebellum, Kortex, Pons, Thalamus/Hypothalamus, Leber, Serum) wurde uns im Rahmen einer externen Cholesterol-Fütterungsstudie von Dr. A. R. Koudinov (Berezov Academic Laboratory, Russian Academy

of Medical Sciences; Weizmann Institute, Biological Regulation, Rehovot, Israel) freundlicherweise überlassen (siehe 2.4.4).

Eine Gesamtmembran-Präparation analog zu 2.2.2.3.1 wurde bei der Aufarbeitung von peripherem Lebergewebe und definierten Hirnarealen (Cerebellum, Pons, Thalamus) der Ratte durchgeführt. Serum-Proben der Ratte bedurften keiner weiteren Aufarbeitung, aus Kortex-Proben wurden in einem adaptierten Mikropräparationsansatz SPMs hergestellt (siehe 2.2.3.1).

2.2.3.1 Mikropräparationsansatz

Für einen Mikropräparationsansatz zur Herstellung von SPMs aus Kortexgewebe der Ratte wurde Protokoll 2.2.2.3.2. mengenbezogen modifiziert. Alle eingesetzten Volumina wurden unter Beibehaltung sämtlicher Arbeitsschritte mit einem Faktor umgerechnet. Die daraus resultierenden apparativen Änderungen sind nachfolgend tabellarisch zusammengefaßt (Tabelle M1).

Tabelle M1: Mikroansatz zur SPM-Präparation

Arbeitsschritt	Material
Gewebehomogenisation	Pottergläser 5 ml, Kontes Glass Co.
1., 2. und weitere Kühlzentrifugationen	PP-Röhrchen 12 ml, Firma Schubert
1. Gradientenzentrifugation zur Herstellung von Synaptosomen	Ultraclear-Röhrchen 12 ml, Firma Beckman
2. Gradientenzentrifugation zur Aufreinigung von TNBS ⁽¹⁾	Polyallomer-Tubes 5.9 ml, Firma Beckman
3. Gradientenzentrifugation zur Herstellung von SPMs	Polyallomer-Tubes 3.9 ml, Firma Beckman

⁽¹⁾ siehe 2.7.2.1.

2.2.4 Humane Proben

2.2.4.1 Charakterisierung des Gewebes

Humanes Hirngewebe aus dem frontalen Kortex von Alzheimer-Patienten (AD) und alten, nicht dementen Kontroll-Personen wurde von der University of California, Irvine, Institute for Brain Aging and Dementia, USA, sowie von der Medical Research Council Alzheimer's

Disease Brain Bank, Institut für Psychiatrie, London, bezogen. Alzheimer-Patienten wurden zu Lebzeiten gemäß dem MMSE-Score bzw. nach den NINCDS-ADRDA-Kriterien klassifiziert (Tierney et al., 1988). Die endgültige neuropathologische Postmortem-Diagnose wurde gemäß den CERAD-Richtlinien getroffen (histopathologische Diagnose von senilen Plaques und neurofibrillären Bündeln) (Mirra et al., 1991). Tabelle M2 faßt die Proben-Charakteristika zusammen.

Tabelle M2: Humane Hirnproben (frontaler Kortex)

	AD	Kontrolle
Lebensalter in Jahren	78.79 \pm 1.25 (64-91)	72.88 \pm 1.95* (50-91)
Postmortem-Zeit in Stunden	16.41 \pm 3.46 (2.25-58)	18.28 \pm 3.19 (2.3-48)
Geschlecht	12M, 12F	16M, 8F
apoE-Index	14 x 3/4, 10 x 4/4	zum Großteil n.d.
Krankheitsdauer in Jahren	7.76 \pm 4.93 (n = 16)	n.d.
Gesamtzahl Proben	24	24

*p<0.05 signifikant gegenüber Alter von AD-Patienten; n.d.=nicht definiert; F = Frauen, M = Männer.

Angegeben sind das durchschnittliche Lebensalter (Wertebereich), die durchschnittliche Postmortem-Zeit (Wertebereich), die Geschlechtsverteilung (M = männlich, F = weiblich), der apoE-Index, die Krankheitsdauer bei Alzheimer-Patienten (AD) sowie die Gesamtzahl Proben je Gruppe. Durchschnittswerte sind Mittelwerte \pm SEM. Der apoE-Index wurde bei den nicht dementen Kontrollpersonen nicht umfassend bestimmt. Die Todesursache in der Kontrollgruppe war zumeist ischämisches Herzversagen, bei AD-Patienten in der Regel Bronchopneumonie. Altersunterschiede zwischen Kontroll- und AD-Gruppe waren statistisch signifikant (*p<0.05, t-Test). In der Kontrollgruppe ergab sich eine signifikante negative Korrelation zwischen der Postmortem-Zeit und der DPH-Gesamtanisotropie von kortikalen SPM (**p<0.001, r²=0.4953).

2.2.4.2 Präparation von subzellulären Membranen

Bei der Autopsie wurden die einzelnen Hirne entfernt, gewogen und blockweise auf Eis präpariert. Die Lagerung bis zur Membranpräparation erfolgte bei -80°C . Für *in vitro* Untersuchungen wurden jeweils aus der Kontroll- und der AD-Gruppe 24 Proben des

frontalen Kortex gemittelt nach Geschlecht, Alter und Postmortem-Zeit entnommen. Aus dem frontalen Kortex-Gewebe wurden das Myelin sowie restliche Hirnhautstücke auf Eis entfernt und die graue Substanz freipräpariert. Aus der verbleibenden grauen Substanz wurden SPMs gemäß Vorschrift 2.2.2.3.2 hergestellt (Eckert et al., 2001).

2.3 Gewebecharakterisierung

2.3.1 Proteinbestimmung nach der Lowry-Methode

Diese Mikrotiterplatten-Methode basiert auf der Vorschrift von Lowry et al. (Lowry et al., 1951), bei der sich in alkalischem Milieu zunächst ein Kupfer-Protein-Komplex ausbildet. Dieser Komplex reduziert im folgenden stöchiometrisch ein Phosphomolybdat-Phosphowolfram-Reagenz (Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz), was in einer diskreten Blaufärbung resultiert (Graham, Higgins, 1998). Nach 15-minütiger Inkubation unter leichtem Schütteln (Orbitalschüttler Promax 1020, Firma Heidolph) kann die Absorption der Lösung bei 620 nm in einem Mikroplatten-Photometer (Modell Digiscan, Firma HighTech) gemessen werden. Hierzu werden 5 µl Puffer IV (Leerwert), Standard oder Probe mit 25 µl Kit-Reagenz A (alkalische Kupfertartratlösung, Firma BioRad) und anschließend mit 200 µl Kit-Reagenz B (Folin-Ciocalteu-Reagenz, Firma BioRad) versetzt. Als Standard dient Bovines-Serum-Albumin (Stammlösung 1 mg BSA/ml H₂O_{bidest}) in einer Konzentration von 0.1 bis 1 mg/ml Puffer IV. Die Methode nach Lowry wurde als Standardmethode zur Proteinbestimmung verwendet, da in den Ansätzen grundsätzlich keine Störstoffe wie reduzierende Zucker enthalten waren. Die Bestimmungsmethode nach Bradford diente in einzelnen Fällen zur Ergebnis-Verifizierung.

2.3.2 Cholesterol-Bestimmung

2.3.2.1 Freies Cholesterol

Die quantitative enzymatische Bestimmung von freiem Cholesterol wurde auf Basis der sogenannten CHOD-PAP-Methode (**C**holesteroloxidase-**P**eroxidase-**A**minophenazon-**P**henol-Methode) nach einem modifizierten Protokoll von Auerbach et al. (1990) durchgeführt. Hierbei wird Cholesterin in Anwesenheit von Sauerstoff durch das Enzym Cholesteroloxidase (von *cellulomonas species*) zunächst zu 4-Cholesten-3-on und Wasserstoffperoxid umgesetzt.

Das entstandene Wasserstoffperoxid bildet dann mit 4-Aminophenazon und Phenol unter katalytischer Wirkung der Peroxidase (von Meerrettich) den roten Farbstoff 4-(p-Benzochinon-monoimino)-phenazon, dessen Farbintensität der Cholesterolkonzentration direkt proportional ist und bei 490 nm photometrisch gegen einen Leerwert gemessen werden kann.

Da der bis dahin verwendete Enzymkit F-Chol MPR1 CHOD-PAP der Firma Roche vom Markt genommen wurde, mußte ein selbstentwickelter Enzymkit etabliert werden. Zur Erhöhung der Sensitivität des Testes wurde das Testmaterial zusätzlich mit 15 %iger Brij-Lösung (nichtionischer Emulgator) und 0.5% Methyl- β -Cyclodextrin „extrahiert“, so daß das native Cholesterol nahezu vollständig in die Farbreaktion eingehen kann. Gegenüber dem ehemals kommerziell erhältlichen Kit der Firma Roche konnte die Testsensitivität somit noch zusätzlich gesteigert werden ($< 30 \mu\text{g/ml}$, Abb. M2).

Die Durchführung des Test erfolgte in 96-Well-Mikrotiterplatten (Firma Greiner). Je 10 μl Leerwert ($\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$), Standard (50-400 μg Cholesterol / ml Puffer IV; Periset, Firma Roche) oder Membransuspension (ca. 200 μg Protein / 100 μl Puffer IV) wurden dabei mit 5 μl 15 %iger wäßriger Brij-Lösung für 15 Minuten inkubiert. Als Reaktionsmischung diente eine 1:1 Mischung aus Lösung 1 und Lösung 2 (siehe 2.1.4) versetzt mit 1/100 an Enzymlösung (siehe 2.1.4). Als Blank-Mischung diente eine 1:1 Mischung aus Lösung 1 und Lösung 2. Die Auftragung erfolgte in Triplets, wobei jede Membranprobe in sechs Kavitäten pipettiert wurde, so daß drei Meß- und drei Blankwerte vorlagen. Blankwerte dienten zur Nivellierung der Eigentrübung der Probensuspension. Standards und Proben wurden nach der Inkubation mit Brij-Lösung mit jeweils 200 μl Reagenzlösung bzw. Blanklösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler (Promax 1020, Firma Heidolph) unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurde die Platte bei 490 nm (ELISA Reader Modell Digiscan, Firma HighTech) vermessen und die Differenz aus Proben- und Leerwert gebildet.

2.3.2.2 Gesamtcholesterol

Die enzymatische Gesamtcholesterol-Bestimmung verläuft prinzipiell analog zur Bestimmung des freien Cholesterols nach der CHOD-PAP-Methode. Der Reaktionskaskade ist lediglich die Hydrolyse von vorhandenen Cholesterol-Estern durch Cholesterolesterase vorgeschaltet. Das freie Cholesterol geht dann in die eigentliche Reaktion ein. Die Determination von Gesamtcholesterol wurde mit dem Fertigkit CHOL 2016630 der Firma Boehringer-Mannheim durchgeführt. 10 μl Leerwert ($\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$), Standard (50-400 $\mu\text{g/ml}$ Cholesterol, Periset) oder

verdünnte Probe wurden mit 200 µl Kit-Reagenzlösung versetzt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Serum-Proben wurden ohne Blank bei 490 nm vermessen, bei Hirnproben dienten zusätzlich Triplets mit 200 µl Puffer IV als Blanks.

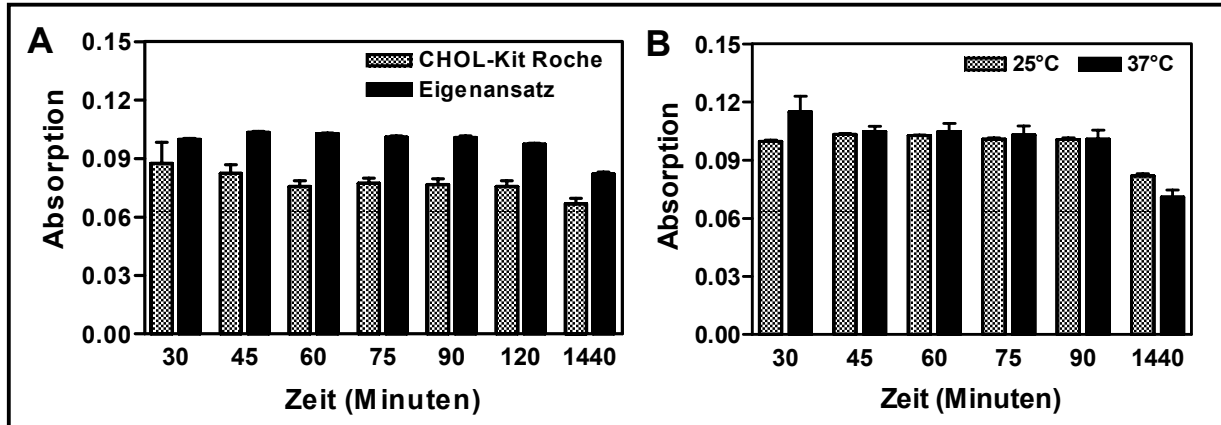


Abb. M2. Etablierung des Cholesterol-Assays zur Bestimmung von freiem Cholesterol. A: Vergleich von kommerziellem Kit und Eigenansatz bei Raumtemperatur an Maushirn-Homogenat. Der Eigenansatz zeigt höhere Empfindlichkeit. B: Vergleich des Eigenansatzes bei unterschiedlichen Temperaturen. Ausgewählt wurden folgende Meßparameter: 25 °C (Raumtemperatur), Meßzeit 60 Minuten. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM bei einer Meßwellenlänge von 490 nm; n = 3.

2.3.3 Bestimmung der Gesamtlipolipide

Membranphospholipide wurden nach der Methode von Chalvardjian et al. (1970) bestimmt. Diese Methode erfaßt die Absolutmenge an Phosphor in jeder Probe und ist insofern eine indirekte Determinationsmethode. 200 µl der wäßrigen Membransuspension (0.05 mg Protein total) wurden mit 1 ml einer 2:1 (v/v) Mischung von Chloroform / Methanol für 5 Minuten bei 20°C ausgezogen und danach bei 4 °C und 2000 U/min (Tisch-Kühlzentrifuge Microfuge R, Firma Beckman) abzentrifugiert. 0.5 ml der organischen Unterphase wurden eingedampft und der Rückstand mit 50 µl 70 %iger Perchlorsäure für 15 Minuten bei 180°C verascht (Block-Thermostat Modell HB-130, Firma CLF). Dieser Aufschluß lieferte anorganisches Phosphat, das im folgenden quantitativ photometrisch bestimmt wurde. Hierzu wurden dem Ansatz 150 µl H₂O_{bidest} zupipettiert und die 200 µl Aufschluß-Lösung anschließend mit 1 ml einer definierten HCl-sauren Mischung aus Malachitgrün und Ammoniummolybdat versetzt (4.2 % Ammoniummolybdat in 5N HCl – 0.2 % Malachitgrün in H₂O_{bidest} 1:3 (v/v)). Das farbige Reaktionsprodukt bildet ein Komplexsalz mit Ammoniummolybdatophosphat als Anion-, und dem Malachitgrün-Carbeniumion als Kation-Komponente (Abb. M3). Die Farblösung wurde mit 40 µl 1.5 %iger wäßriger Tween-20-Lösung stabilisiert. Die

Absorption des Komplexes bei 660 nm ist direkt proportional zur vorhandenen Menge Phosphor in der Probe. Als Standard diente getrocknetes Kaliumdihydrogenphosphat in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ (1-10 μg Phosphor / ml), als Leerwert diente $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$. Als Leerwert diente ein Ansatz ohne Phosphor, der analog den Proben behandelt wurde. Dieser Leerwert wurde vor der eigentlichen Berechnung vom Meßwert abgezogen.

Nach diesem Protokoll ergibt sich für die totale Phosphormenge P folgende Berechnungsformel: P [μmol Phosphor / mg Protein] = 0,1718 C; C = Meßkonzentration [μg Phosphor / ml].

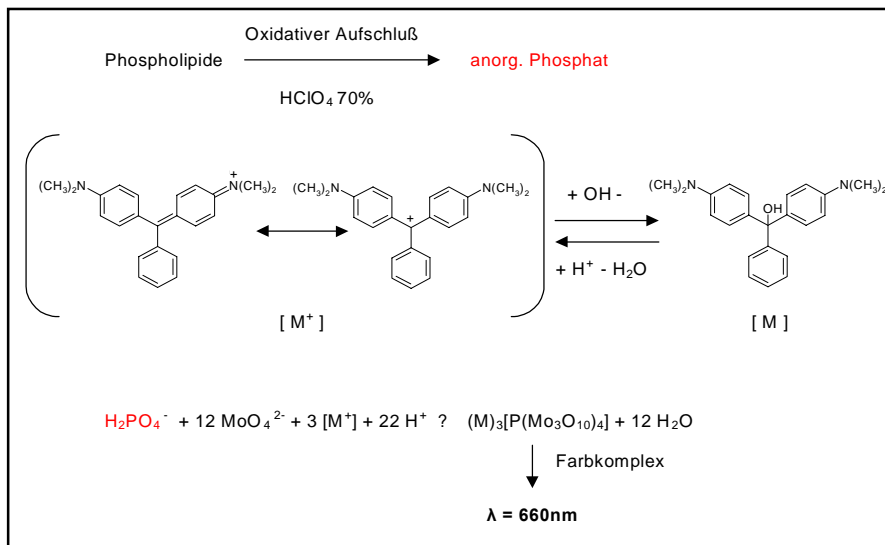


Abb. M3. Prinzip der Bestimmung der Gesamtphospholipide. Nach der Veraschung wird anorganisches Phosphat in einen Komplex-Farbstoff eingebaut, der photometrisch bestimmt werden kann. [M] = Malachitgrün.

2.3.4 Western-Blot-Analyse auf Markerproteine

$\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase und Flotillin wurden mittels SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Blot-Analyse bestimmt (Eckert et al., 2003a). Entsprechend dem Molekulargewicht der Proteine wurden Gele mit 40% Acrylamid und 2% Bisacrylamid gegossen. Proben synaptosomaler Plasmamembranen entsprechend einer Proteinmenge von 40 μg wurden 1:1 mit Probenpuffer verdünnt, für 3 Minuten bei 90°C erhitzt (Blockthermostat Modell HB-130, Firma CLF) und anschließend auf die Gelkammern aufgetragen. Die anschließende elektrophoretische Trennung wurde bei 100 V (konstant) und etwa 40 mA für 2 Stunden durchgeführt. Die Proteinbanden wurden im nächsten Schritt auf eine mit Isopropanol konditionierte Polyvinyliden-Difluorid (PVDF)-Membran (Firma Millipore) geblottet (Transfer bei konstanten 400 mA für 1.5 Stunden). Zur Kontrolle eines erfolgreichen Transfers wurde die Membran mit Ponceau-Rot angefärbt, gewaschen und

schließlich zur Blockierung unspezifischer Bindungen über Nacht bei 4°C mit einer 5 %igen Milchlösung inkubiert. Nach mehreren Waschschritten mit TBST wurde die Membran mit der jeweiligen Primärantikörper-Lösung (Flotillin-Ak der Maus bzw. Na⁺-K⁺-ATPase-Ak der Maus) für vier Stunden bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert.

Im Anschluß folgten fünf weitere Waschschrritte mit TBST sowie die Inkubation mit Sekundärantikörper-Lösung (Anti-Mouse IgG-HRP-Ak der Ziege) für weitere vier Stunden bei Raumtemperatur. Die Detektion nach neuerlicher Waschung der Membran erfolgte mittels Chemolumineszenz-Färbung (ECL) unter Verwendung einer frisch angesetzten Reagenzlösung (Firma Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire). In diesem System läßt sich die Bindung des mit Meerrettichperoxidase gekoppelten Sekundär-Ak an den Primär-Ak im Fotolabor über Belichtungsstufen detektieren und anschließend densitometrisch (Kodak DC1C Software, Firma Kodak) semiquantitativ auswerten.

2.4 Subchronische *in vivo* Behandlungsstudien

2.4.1 Ratio der Mausstudien

Das Ziel unserer Forschungsvorhaben an der Maus war es, mit Hilfe von parallelen *in vivo*-Behandlungsstudien zu untersuchen, inwieweit bestimmte Hemmstoffe der HMG-CoA-Reduktase (Statine, siehe 1.3) einen Einfluß auf die zerebrale Membranlipid-Homöostase zeigen. Unsere Wirkstoffauswahl umfaßte ein relativ breites Feld aus der Gruppe der HMG-CoA-Reduktase-Hemmer. Eingesetzt wurden die Stoffe Lovastatin (bezogen als Reinsubstanz von MSD Sharp & Dohme GmbH, Haar, sowie kommerziell als Fertigarzneimittel Mevinacor®), Simvastatin (bezogen als Reinsubstanz von MSD Sharp & Dohme GmbH, Haar) und Pravastatin (bezogen als Natrium-Salz von Sankyo Pharma GmbH, München). Statine sind aktuelle Forschungstargets auf dem Gebiet der Alzheimer Forschung. Im Hinblick auf die Übertragbarkeit unserer Ergebnisse auf den Menschen sind präklinische Studien an entsprechend großen Säugetier-Kohorten unabdingbar. Das Versuchsmodell Maus ist für derartige Studien etabliert. Die physiologischen und biochemischen Vorgänge in den unterschiedlichen Hirnstrukturen (Großhirn, Cerebellum) der Maus sind denen des Menschen hierbei in begrenztem Maße ähnlich.

2.4.2 Tierhaltung, Behandlung und Überwachung

Die Haltung der Tiere erfolgte unter Standard-Bedingungen. Während den Studien wurden die Tiere getrennt nach Geschlecht, Alter und Behandlungsgruppe gehalten und erfuhren eine tägliche Gewichtskontrolle zum genauen Dosisabgleich. Die Tiere erhielten freien Zugang zu Futter und Wasser. Die Raumtemperatur im Tierstall betrug 25°C bei konstanter Luftfeuchtigkeit und einem 12-Stunden-Verdunklungs-Rhythmus. Der Gesundheitszustand der Tiere wurde täglich in Augenschein genommen und dokumentiert. In jeder Versuchsstudie wurden die Tiere in Gruppengrößen von 2 bis maximal 12 Tiere pro Käfig gehalten. Die Gesamtzahl der Tiere je Studie ergab sich aus der Verwendung unterschiedlicher Alters- und Geschlechtskohorten der jeweiligen Mausspezies, aus der Untersuchung von Arzneistoff-Gruppen versus Placebo-Gruppen, aus dem Einsatz von genetisch modifizierten und nicht modifizierten Mäusen, sowie aus der Notwendigkeit einer aussagekräftigen Statistik. Unter Berücksichtigung dieser Punkte wurden die Gruppengrößen so klein wie möglich gewählt.

Am Ende der Behandlungsstudien wurden die Tiere 24 Stunden nach der letzten Arzneistoffapplikation durch Dekapitation getötet. Zur weiteren biochemischen Untersuchung wurden Gehirn und Leber der Tiere entnommen sowie Serum gewonnen. Da Veränderungen im Hirngewebe, die die Versuchsergebnisse negativ beeinflussen, durch eine chemische Betäubung nicht ausgeschlossen werden können, wurden die Tiere vor der Tötung durch zervikale Überstreckung betäubt.

Die Notwendigkeit einer wiederholten Mitführung von Kontrollgruppen zu den jeweiligen Wirkstoff-Behandlungsgruppen bei sämtlichen Fixdosisstudien ergab sich zwingend aus der interexperimentellen Varianz unserer Bestimmungsmethoden innerhalb jeder Behandlungsgruppe. Aus dem gleichen Grund mußten je nach Untersuchungsziel der jeweiligen Einzelstudie auch bestimmte Behandlungs- und Alterskohorten wiederholt eingesetzt werden, um valide Ergebnisse zu erhalten.

2.4.3 Studiendesigns

Den Tieren wurde über einen Zeitraum von 23 Tagen einmal täglich eine Einzeldosis des zu untersuchenden Wirkstoffes (Suspension bzw. Lösung in H₂O/Agarosegel 0.2%) bzw. eine entsprechende Menge Vehikel (H₂O/Agarosegel 0.2%) per os mittels Schlundsonde (Metall-Knopfkanüle der Firma Aesculap, 1 mm Innendurchmesser) appliziert. Hierzu wurde eine

Suspension (Lovastatin, Simvastatin) bzw. Lösung (Pravastatin-Na) mit 10 mg Wirkstoff/ml Agarosegel bzw. reines Agarosegel als Placebo täglich frisch angesetzt und vor der Behandlung auf 37°C temperiert. Das maximale Applikationsvolumen betrug 0.5 ml per Einzeldosis. Die orale Gabe entspricht gleichfalls der Standardapplikation bei Hypercholesterinämie-Patienten. Die eingesetzten Tagesdosen an Wirkstoff entsprachen Literaturvorgaben und waren nicht toxisch (J.C. et al., 1999). Sie lagen mit 100 mg/kg/Tag bei den Fixdosis-Studien im oberen Konzentrationsbereich (Krause, Newton, 1995). Dieser wurde gewählt, um auch geringe pharmakologische Effekte auf die Cholesterollhomöostase im Behandlungszeitraum nach Erreichen eines Steady-state sicher zu erfassen. Wenngleich die Behandlungsdauer in Relation zur Halbwertszeit von Cholesteroll im Gehirn von Mäusen vergleichsweise kurz ist, so sind bei einem geschätzten ZNS-Cholesteroll-Turnover von 0.4 - 0.5% pro Tag (Björkhem et al., 1997; Dietschy, Turley, 2001; siehe 1.2) Statin-induzierte Veränderungen der zentralen Cholesteroll-Homöostase in diesem Zeitfenster zuverlässig detektierbar.

Die Behandlungen fanden morgens zwischen 9.00 Uhr und 10.00 Uhr statt. Die Tiere wurden vor dem Versuch mit Ohrclip-Markierungen versehen, was für die Tiere nur eine geringe Belastung darstellte. Auch die Streß-Belastung bei der Behandlung war gering.

Die Aufteilung der Tiere auf die einzelnen Gruppen sowie die jeweiligen Einzel-Studiendesigns sind nachfolgend aufgeführt.

2.4.3.1 Behandlungsstudie 1

***In vivo* Studie zur Untersuchung des Einflusses von Lovastatin auf die zerebrale Cholesterollhomöostase**

Testung von Lovastatin in 0.2% Agaroseschleim versus Agaroseschleim-Placebosuspension

Maustyp (siehe 2.2.2.2): C57BL/6J-Mäuse, nicht transgen

Gewinnung von Großhirn (Ganzhirnmembranen), Cerebellum, Leber und Serum

Mauskohorte (Alter)	Placebo-Gruppe	Lovastatin-Gruppe
C57BL/6J (1 Monat)	8 Weibchen, 2 Männchen	8 Weibchen, 2 Männchen
C57BL/6J (12 Monate)	5 Weibchen, 2 Männchen	5 Weibchen, 2 Männchen

Gesamtzahl Mäuse: 34

2.4.3.2 Behandlungsstudie 2

***In vivo* Studie zur Untersuchung unterschiedlicher Lovastatin-Einflüsse auf die zerebrale Cholesterollhomöostase bei genetisch unmodifizierten und apoE-knockout-Mäusen**

Testung von Lovastatin in 0.2% Agaroseschleim versus Agaroseschleim-Kontrollsuspension

Maustypen (siehe 2.2.2.2): C57BL/6J-Mäuse (apoE^{+/+}), nicht genetisch modifiziert; C57BL/6apo^{Etm1Unc}-Mäuse (apoE^{-/-})

Gewinnung von Großhirn (Ganzhirnmembranen) und Serum

Mauskohorte (Alter)	Placebo-Gruppe	Lovastatin-Gruppe
apo E +/+ (12 Monate)	7 Weibchen	8 Weibchen
apo E -/- (12 Monate)	7 Weibchen	8 Weibchen

Gesamtzahl Mäuse: 30

2.4.3.3 Behandlungsstudie 3

***In vivo* Studie zur vergleichenden Untersuchung der Einflüsse von Lovastatin, Simvastatin und Pravastatin auf die zerebrale Cholesterollhomöostase**

Testung von Lovastatin, Simvastatin und Pravastatin-Na in 0.2% Agaroseschleim versus Agaroseschleim-Placebosuspension

Maustyp (siehe 2.2.2.2): C57BL/6J-Mäuse, nicht genetisch modifiziert

Gewinnung von Großhirn (Ganzhirnmembranen, SPM, Kortexmaterial und Mitochondrien), Cerebellum und Serum

Mauskohorte (Alter)	Placebo-Gruppe	Lovastatin-Gruppe	Simvastatin-Gruppe	Pravastatin-Gruppe
C57BL/6J (1-2 Monate)	24 Weibchen	23 Weibchen	23 Weibchen	23 Weibchen

Gesamtzahl Mäuse: 93

2.4.3.4 Behandlungsstudie 4

***In vivo* Studie zur vergleichenden Untersuchung der Einflüsse von Lovastatin, Simvastatin und Pravastatin auf die zerebrale Genexpression**

Testung von Lovastatin, Simvastatin und Pravastatin-Na in 0.2% Agaroseschleim versus Agaroseschleim-Placebosuspension

Maustyp (siehe 2.2.2.2): C57BL/6J-Mäuse, nicht genetisch modifiziert

Gewinnung von Großhirn (Kortex-Hemisphären), Hippokampus, Cerebellum und Serum

Mauskohorte (Alter)	Placebo-Gruppe	Lovastatin- Gruppe	Simvastatin- Gruppe	Pravastatin- Gruppe
C57BL/6J (1-2 Monate)	11 Weibchen	11 Weibchen	11 Weibchen	11 Weibchen

Gesamtzahl Mäuse: 44

2.4.4 Externe Cholesterolfütterungsstudie an Ratten

Die Studie wurde von Herrn Dr. A. R. Koudinov vom Berezov Academic Laboratory, Russian Academy of Medical Sciences, Weizmann Institute, Biological Regulation, Rehovot, Israel, durchgeführt. Junge weibliche Albino Wistar Ratten wurden im Alter von zwei Monaten über sechs Monate mit cholesterolfreier Nahrung (Kontroll-Gruppe) oder mit 2%iger Cholesteroldiät (Verum-Gruppe) gefüttert und im Anschluß getötet, um in Kooperationsarbeit mit unserem Labor Einflüsse des Nahrungscholesterols auf die periphere und zerebrale Cholesterolf-Homöostase zu untersuchen.

2.5 *In vitro* Modulation der Membranlipid-Homöostase

2.5.1 Cholesterolf-Oxidase-Assay

Die enzymatische Cholesterolf-Modulation mit Cholesterolf-Oxidase (von *Rhodococcus erythropolis*) (Gimpl et al., 1997) wurde nur im Rahmen von Vorversuchen durchgeführt und nicht auf größere Versuchsansätze ausgeweitet. Grund hierfür war ein Spezies-abhängiger Effekt des Enzyms, der sich mit Markrücknahme des oben genannten Produktes nicht

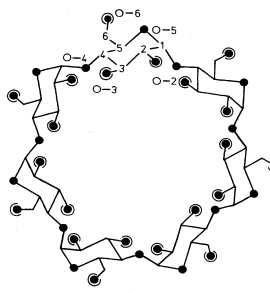
reproduzieren ließ. Eine konzentrationsabhängige Cholesterol-Modulation konnte mit folgendem Meßprotokoll erzielt werden. 250 µl Membransuspension (Ganzhirnmembran der Maus in Puffer VI, Proteingehalt 200 µg/100 µl) wurden mit 5 µl einer 15 %igen wäßrigen Brij-Lösung und einer definierten Menge Enzymlösung (3 mmol/l NaCl-Lösung, pH 6) entsprechend einer Aktivität von 0.83, 1.25 und 1.67 Einheiten/ml Gesamtansatz versetzt. Anschließend wurde mit Puffer VI auf 300 µl aufgefüllt. Kontrollen wurden ohne Enzymlösung nur mit Puffer VI aufgefüllt. Die Proben wurden gevortext und anschließend für 30 Minuten bei 37°C im Ultraschallbad beschallt. Im Anschluß erfolgte Abzentrifugation für 15 Minuten bei 4°C und 20.000 g (= 14.950 U/min) in einer Tisch-Kühlzentrifuge (Modell Microfuge R, Firma Beckman). Der Überstand wurde verworfen und das resultierende Pellet in 100 µl Puffer IV gewaschen, nochmals analog zentrifugiert und dann in 250 µl Puffer VI mit einem kleinen Hand-Teflonpistill resuspendiert.

2.5.2 Cholesterol-Modulation mit M β CD und seinen Einschlußverbindungen

Cyclodextrine sind ringförmige 1,4- α -glykosidisch verknüpfte Oligosaccharide, die sich durch enzymatischen Stärke-Abbau gewinnen lassen (Christian et al., 1997). β -Cyclodextrine sind aus sieben Glucose-Einheiten aufgebaut und lassen sich wie andere Cyclodextrine chemisch modifizieren (Christian et al., 1997; Fernandes et al., 2003). Cyclodextrine besitzen die Fähigkeit, je nach Ringgröße Moleküle definierter Größe in ihren Hohlraum aufzunehmen und damit zu solubilisieren, weswegen sie insbesondere in der pharmazeutischen Technologie breite Verwendung finden. Abb. M4 faßt einige Charakteristika dieser Substanzgruppe zusammen.

Abb. M4. Charakteristika und Kennzahlen von häufig eingesetzten Cyclodextrinen. Diese natürlichen oder chemisch abgewandelten Verbindungen vermögen andere Moleküle im Innenraum ihrer Helix zu „komplexieren“. Aus Bauer, Pharmazeutische Technologie, Govi-Verlag 1997.

Wichtige Kennzahlen:	α -	β -	γ -Cyclodextrin
Summenformel:	C ₃₆ H ₆₀ O ₃₀	C ₄₂ H ₇₀ O ₃₅	C ₄₈ H ₈₀ O ₄₀
M _r :	972,9	1135	1297
Ringabmessungen			
$\varnothing_{\text{innen}}$:	0,57 nm	0,78 nm	0,95 nm
$\varnothing_{\text{außen}}$:	1,37 nm	1,53 nm	1,69 nm
Höhe h:	0,78 nm	0,78 nm	0,78 nm



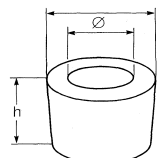


Abb. 6.4 Modell des β -Cyclodextrins und Ringabmessungen. ● Sauerstoff, ● Hydroxy-Gruppe.

Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD) und seine Cholesteroleinschluverbindungen sind etablierte Substanzen zur *in vitro* Modulation des membranären bzw. zellulären Cholesterolgehalts. Während reines M β CD der Membran Cholesterole und Moleküle vergleichbarer Größe entzieht, wirken seine Cholesterole-Chlathrate Cholesterole-beladend (Bodovitz, Klein, 1996; Christian et al., 1997; Simons et al., 1998). Eine Methodik zur *in vitro* Cholesterole-Modulation wurde im Laufe der Arbeit neu etabliert. Sämtliche Meßbedingungen wurden in Vorversuchen an Ganzhirnmembranen der Maus optimiert und dann adaptiert. Mit M β CD ließen sich in Vorversuchen eklatante Cholesterole-Depletionen um 70% bereits mit 15-16 mmol/l M β CD erzielen (dies entspricht im Ansatz etwa 10 μ Mol M β CD/mg Protein) (Abb. M5), so daß in sämtlichen Haupt-Versuchsansätzen diese Konzentration nicht überschritten bzw. je nach Zielsetzung deutlich unterschritten wurde.

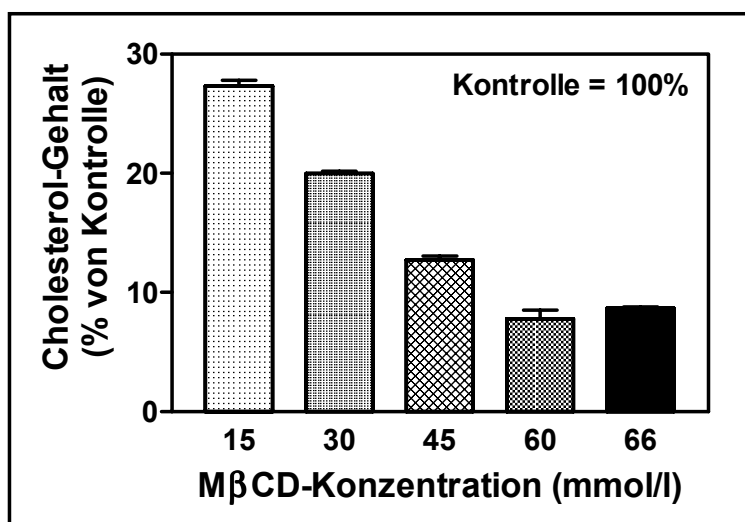


Abb. M5. Cholesterole-Depletion mit M β CD.

Maus-Membranen (200 μ g Protein/100 μ l) wurden für 30 Minuten bei 37°C mit M β CD inkubiert. Maximale Depletions-Effekte treten bei etwa 60 mmol/l M β CD auf (~ 90% Cholesterole-Senkung). Mittelwert \pm SEM; n = 2-5.

Die durchgeführten Cholesterole-Modulationen umfaßten Cholesterole-Depletionen mit M β CD, Cholesterole-Anreicherungen mit M β CD-Cholesterole-Komplexverbindungen (siehe 2.5.2.1) sowie Cholesterole-Wiederbeladungen nach bereits erfolgter Depletion (Kombination beider Methoden). Sämtliche Versuche wurden sowohl an Ganzhirnmembranen, als auch an Synaptosomen und synaptosomalen Plasmamembranen durchgeführt (siehe 2.5.2.2 bis 2.5.2.4). Cholesterole-Modulationen an PC12-Zellen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. S. Leutz vorgenommen (Behandlungs-Protokoll: siehe Leutz, 2001).

2.5.2.1 Präparation von M β CD-Cholesterol-Komplexen

Die Präparation wurde im Laufe der Arbeit in Anlehnung an Literaturvorgaben (Klein et al., 1995; Gimpl et al., 1997; Williams et al., 1998) neu etabliert. Nachfolgendes Protokoll resultiert aus Ergebnissen von zahlreichen Vorversuchen zu den Inkubations-Bedingungen. Cholesterol (Firma Sigma) wurde zunächst in Dichlormethan (LichroSolv-Qualität, Firma Merck) umkristallisiert, um eine feinere und besser lösliche Kristallstruktur zu erhalten. Anschließend wurde ein Überschuß an kristallinem Cholesterol in 1 ml einer wäßrigen M β CD-Lösung (30 mmol/l) resuspendiert (Vortex-Mixer Modell Reax 2000, Firma Heidolph). Die Suspension wurde anschließend bei 50°C und 1.400 U/min für 1 h im Thermomixer (Modell Comfort, Firma Eppendorf) inkubiert. Danach wurde überschüssiges Cholesterol durch 10-minütige Zentrifugation bei 20.000 g (= 14.950 U/min) und 4°C (Tisch-Kühlzentrifuge Modell Microfuge R, Firma Beckman) abgetrennt. Der Überstand wurde abgenommen und nochmals analog zentrifugiert. Der klare Überstand der 2. Zentrifugation wurde nun durch einen Sartorius Minisart SRP 25 PTFE-Membran Spritzenfilter (Porengröße 0.45 μ m, Firma Sartorius) filtriert. Die fertige Lösung ist angereichert an M β CD-Cholesterol-Sättigungs-Komplexen. Eine Cholesterol-Bestimmung dieser Komplexlösung offenbarte eine molare Ratio von M β CD/Cholesterol von 10/1. Die Komplexverbindungen wurden vor jeder Membrancholesterol-Beladung frisch hergestellt.

2.5.2.2 Cholesterol-Modulation an Ganzhirnmembranen

Membran-Pellets (siehe 2.2.2.3.1) wurden aufgetaut und durch Resuspension mit Puffer IV auf einen Proteingehalt von 200 μ g/100 μ l eingestellt. 380 μ l dieser Suspension wurden nun entweder mit 120 μ l Puffer IV (Kontrolle), 100 μ l Puffer IV und 20 μ l einer wäßrigen 400 mmol/l M β CD-Lösung (Depletion 1 = 10.5 μ Mol M β CD/mg Protein), 100 μ l Puffer IV und 10 μ l einer wäßrigen 400 mmol/l M β CD-Lösung (Depletion 2 = 5.25 μ Mol M β CD/mg Protein), 20 μ l Puffer IV und 100 μ l frisch angesetzter M β CD-Cholesterol-Komplexverbindung (Beladung 1 = 0.4 μ Mol Cholesterol/mg Protein) oder 70 μ l Puffer IV und 50 μ l frisch angesetzter M β CD-Cholesterol-Komplexverbindung (Beladung 2 = 0.2 μ Mol Cholesterol/mg Protein) versetzt. Die Proben wurden bei 37°C für 30 Minuten im Thermomixer (Modell Comfort, Firma Eppendorf) bei 1.400 U/min inkubiert, danach bei 20.000 g (= 14.950 U/min) und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert (Tisch-Kühlzentrifuge Microfuge R, Firma Beckman), zweimal mit 200 μ l eiskaltem Puffer IV gewaschen

(Mikropistill), analog ein zweites Mal zentrifugiert, und anschließend in 380 µl Puffer IV resuspendiert (Mikropistill). Ein Aliquot dieser Suspension (30 µl) wurde für die Cholesterol-Bestimmung eingesetzt, der Rest der Suspension wurde bei -20°C für weitere Messungen tiefgefroren. Im Falle einer Wiederbeladung von bereits depletierten Membranen wurde die gewonnene Suspension aus dem Depletionsansatz 1 (380 µl) analog Beladung 1 behandelt (Wiederbeladung 1).

2.5.2.3 Cholesterol-Modulation an Synaptosomen

Bei diesen Versuchen wurde im Rahmen der Präparation von SPMs (siehe 2.2.2.3.2) bereits auf der Stufe der Synaptosomen eine Cholesterol-Modulation vorgenommen. Hierzu wurde ein Synaptosomen-Pellet aus 8-10 Maushirnen in 20 ml Puffer IV resuspendiert, in 2 gleiche Aliquote aufgeteilt und das Protein der Suspension bestimmt.

Zur Cholesterol-Depletion wurden anschließend 2 ml Puffer IV (Kontrolle), 500 µl Puffer IV und 1500 µl einer wäßrigen 400 mmol/l M β CD-Lösung (Set 1 = 8 - 10.5 µMol M β CD/mg Protein), 1500 µl Puffer IV und 500 µl einer wäßrigen 400 mmol/l M β CD-Lösung (Set 2 = 2.6 - 3.5 µMol M β CD/mg Protein), oder 1750 µl Puffer IV und 250 µl einer wäßrigen 400 mmol/l M β CD-Lösung (Set 3 = 1.3 - 1.75 µMol M β CD/mg Protein) zur Suspension zugefügt und kräftig gevortext. Zur Cholesterol-Beladung wurde die Suspension mit 8 ml Puffer IV (Kontrolle) oder 8 ml einer frisch angesetzten M β CD-Cholesterol-Komplexlösung (Beladung = 0.3 - 0.4 µMol Cholesterol/mg Protein) versetzt und gevortext. Danach folgte Inkubation sämtlicher Proben für 30 Minuten bei 37°C im Schüttelwasserbad (Modell 6A, Firma Julabo) und Zentrifugation für 20 Minuten bei 4°C und 48.000 g (= 20.000 U/min) in der Kühlzentrifuge (Modell J2-21, Firma Beckman). Das resultierende Pellet wurde in 5 ml eiskaltem Puffer IV resuspendiert und analog ein zweites Mal zentrifugiert. Das neuerliche Pellet wurde dann in 5 ml Puffer VII aufgenommen und dem anschließenden TNBS-Labeling zugeführt (siehe 2.7.1.1).

2.5.2.4 Cholesterol-Modulation an SPM

Grundsätzlich wurden an SPM von Mäusen als Modulations-Strategien nur die Depletion 1 und die Beladung 1 aus 2.5.2.2 eingesetzt. Wiederbeladungen wurden nicht durchgeführt. Die einzelnen Versuchs-Sets wurden analog zu 2.5.2.2 angesetzt, d.h. 380 µl einer Suspension von

SPMs in Puffer IV (200 µg Protein/100 µl) wurden wie oben beschrieben inkubiert und aufgearbeitet.

2.5.3 Degradation von Sphingomyelin mit Sphingomyelinase

Eine enzymatische Degradation von Sphingomyelin wurde an Maus-Synaptosomen in Anlehnung an das Protokoll von Rao et al. (1993) durchgeführt. Hierzu wurde ein Synaptosomen-Pellet aus 8-10 Maushirnen in 10 ml Puffer IV resuspendiert, in 2 gleiche Aliquote aufgeteilt und das Protein der Suspension bestimmt. 25 Einheiten Sphingomyelinase (SMase, *streptomyces species*) wurden vorab in 1 ml eiskaltem Puffer IV gelöst. Entsprechend einer Endkonzentration von 40 mUnits SMase/mg Protein wurde nun die Enzymlösung dem 1. Aliquot zupipettiert. Das 2. Aliquot wurde mit derselben Menge Puffer IV versetzt (Kontrolle). Beide Aliquote wurden anschließend für 10 Minuten bei 37°C im Schüttelwasserbad (Modell 6A, Firma Julabo) inkubiert. Nach dieser Zeit erfolgte Zugabe von 5 ml eiskaltem Puffer IV und Zentrifugation für 15 Minuten bei 4°C und 48.000 g (= 20.000 U/min) in der Kühlzentrifuge (Modell J2-21, Firma Beckman). Die gewonnenen Pellets wurden nochmals in 5 ml kaltem Puffer IV resuspendiert und analog ein zweites Mal zentrifugiert. Das neuerliche Pellet wurde dann in 5 ml Puffer VII aufgenommen und dem anschließenden TNBS-Labeling zugeführt (siehe 2.7.1.1).

2.6 Membranfluiditäts-Messungen

2.6.1 Grundlagen der Fluoreszenz-Polarisationsspektroskopie

Biologische Membranen stellen dynamische Assoziate aus Lipiden, Proteinen und Kohlenhydraten dar (siehe 1.1). Einzelne Membranbestandteile besitzen eine weitestgehend freie Lateralbeweglichkeit und können Rotationen um eine zur Membranebene senkrechte Achse durchführen (Abb. M6). Biologische Membranen zeigen insofern die Charakteristik einer geordneten zweidimensionalen Flüssigkeit (Quasi-flüssig-kristalline Matrix) (Singer, Nicolson, 1972), was für zahlreiche physiologische Prozesse (vesikulärer Membrantransport, Endozytose, Signaltransduktion etc.) von entscheidender Bedeutung ist (Lenaz et al., 1983). Die relativ freie Beweglichkeit von intra-membranären Molekülen macht man sich bei der spektroskopischen Bestimmung der Fluiditätseigenschaften von Membranen zunutze. Bei der sogenannten Fluoreszenz-Polarisationsspektroskopie werden membrangebundene Fluoreszenzsonden (Abb. M6) mit linear polarisiertem Licht definierter Wellenlänge (monochromatisch) bestrahlt und dadurch in einen energetisch ungünstigen angeregten Singulettzustand gebracht ($\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang). Nach der Lichtabsorption tritt beim Übergang vom niedrigsten Schwingungsniveau des angeregten Singulettzustandes in ein Schwingungsniveau des Singulett-Grundzustandes eine diskrete Fluoreszenz-Emission auf, deren Lebensdauer durch eine Übergangsrate von 10^{-7} bis 10^{-8} s gekennzeichnet ist (siehe auch 2.7.1, Abb. M11). Die Fluoreszenz-Strahlung ist neben Wellenlänge und Frequenz auch durch ihre Polarisationsrichtung charakterisiert. Die Fluoreszenz-Polarisation P ist dabei von der Orientierung des Emissions-Übergangsdipolmoments und damit von der Beweglichkeit R der angeregten Moleküle innerhalb der Membran direkt abhängig ($P = f(R)$). Äquivalent zum Begriff der Polarisation beschreibt auch die sogenannte Anisotropie die Richtungsabhängigkeit des elektrischen Emissions-Feldstärkevektors, weswegen beide Begriffe in der Literatur oftmals synonym verwendet werden. Die Anisotropie läßt sich nach Lentz aus der Polarisation errechnen (Lentz et al., 1988, 1993).

Polarisation und Anisotropie verhalten sich umgekehrt proportional zur Membranfluidität in der Umgebung der betrachteten Moleküle. Absorbiert das Fluorophor einer Fluoreszenz-Sonde einen passenden Energie-Quant und wird angeregt, so lassen sich prinzipiell zwei Fälle unterscheiden. Ist die Sonde in ein starres Umfeld eingebettet, so wird die Emissionsstrahlung in der gleichen Richtung polarisiert sein wie der elektrische Feldvektor der Exzitationsstrahlung, und $P=1$. Erlaubt das Umfeld der Sonde bestimmte Bewegungs-

Freiheitsgrade, so wird das Sondenmolekül über den Zeitraum der Fluoreszenz-Lebensdauer diskrete Rotationsbewegungen vollführen und der Emissionsvektor mehrfach gedreht. Das Ausmaß dieser Emissionsdepolarisation repräsentiert somit die Rotationsfähigkeit der Sonde in der Membran, die dadurch ihre anfängliche Orientierung verliert, und es gilt $0 < P < 1$ (van Blitterswijk et al., 1981).

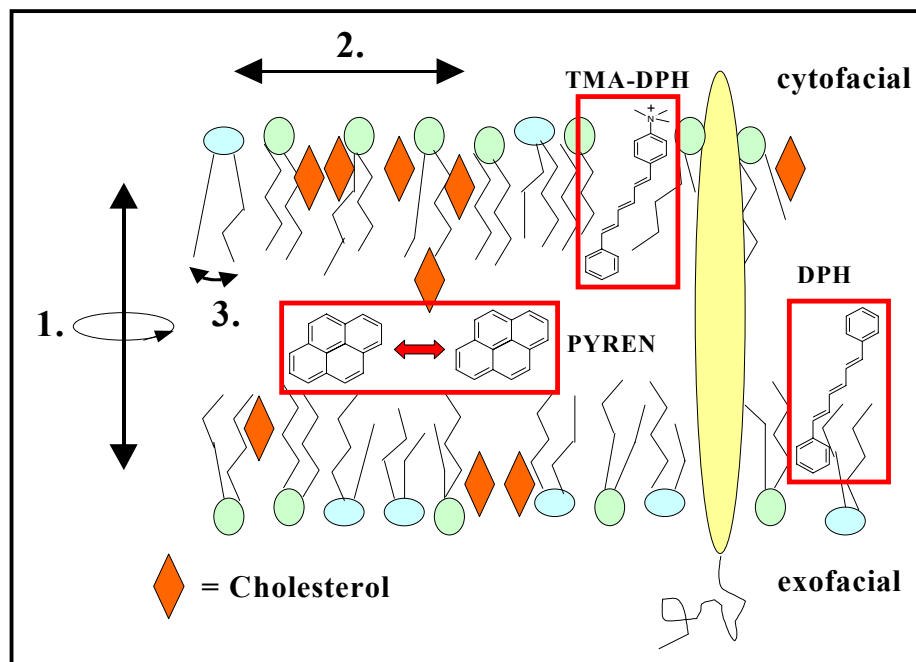


Abb. M6. Grundlagen der Membranfluiditäts-Bestimmung über Fluoreszenz-Polarisation und Excimer-Fluoreszenz. Membranmoleküle führen im wesentlichen drei Bewegungsformen aus: 1. Axiale Rotationen, 2. Lateral-Fluß, 3. Flexibilität von länger-kettigen Fettsäuren. Je nach Membranviskosität sind in definierte Membranareale eingebrachte Fluoreszenzsonden (DPH, TMA-DPH) in ihrer rotationalen Beweglichkeit mehr oder weniger eingeschränkt, so daß der Feldvektor der Lichtemission im Vergleich zum Richtungsvektor der linear-polarisierten, monochromatischen Exzitations-Strahlung um einen bestimmten Betrag gedreht wird. Pyren-Fluoreszenz entsteht im Gegensatz hierzu durch Molekül-Kollision und Excimer-Bildung, die vor allem durch die Lateralbeweglichkeit des Moleküls in der Membran determiniert wird.

Prinzipiell läßt sich die Fluoreszenz-Anisotropie in einem zeitlich aufgelösten (time resolved fluorescence anisotropy) wie auch in einem statischen Verfahren (steady state fluorescence anisotropy) bestimmen. Letzteres wurde für die folgenden Messungen gewählt. Dabei wird zugrundegelegt, daß innerhalb geordneter Lipid-Layer wie Membrane grundsätzlich nicht alle denkbaren Bewegungs-Freiheitsgrade möglich sind, d.h. die Fluoreszenz-Emissions-Dipole der Fluorophore erreichen infolge Bewegungsrestriktionen keine isotropische Verteilung. Die im Plateau erfaßte steady state anisotropy r_s setzt sich dann zusammen aus der statischen Komponente r_ϕ (infinite time anisotropy) und der dynamischen Komponente r_f (rotational relaxation) (Gleichung nach Perrin):

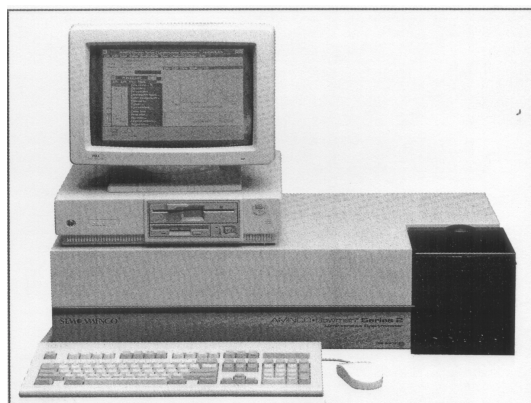
$$r_s = r_f - r_\phi$$

r_f ist proportional zur Mikroviskosität der Membran, r_ϕ ist eine Funktion des sogenannten Lipidordnungsparameters (van Blitterswijk et al., 1981).

2.6.2 Anisotropie-Messung

2.6.2.1 Meßapparatur

Abb. M7. Lumineszenzspektrometer SLM Aminco Bowman. Das Meßgerät wird über ein Software-Programm gesteuert, mit dem sich gleichzeitig die Messungen auswerten lassen.



Die Fluiditätsmessungen wurden an einem SLM Aminco Bowman Series 2 Lumineszenzspektrometer (Firma SLM Aminco, Abb. M7) durchgeführt. Die Meßanordnung in diesem Gerät folgt dem sogenannten L-Format (Abb. M8). Als Lichtquelle erzeugt eine Xenon-Bogenlampe (Firma Osram, München) ein Lichtspektrum von 270-700 nm. Ein nachgeschalteter Monochromator generiert dann je nach Exzitationsmaximum der verwendeten Sonde einen Lichtstrahl mit definierter Anregungswellenlänge im Bereich von 300-400 nm. Das monochromatische Licht wird durch einen Exzitationspolarisator je nach Einstellung (0° bzw. 90°) horizontal bzw. vertikal polarisiert und trifft dann in der Küvette (Quarzküvetten QS-101 UV-durchlässig, Firma Helma) auf den in der Membran inkorporierten Fluorophor (siehe Abb. M9 zum Strahlengang). Probenkammer und Küvette sind durch ein externes Thermostat konstant auf 37°C temperiert. In Abhängigkeit der Mobilität des Fluorophors wird die Drehrichtung des emittierten Fluoreszenzlichtes erneut um einen bestimmten Betrag variiert. Dieser Änderungsbetrag wird durch Messung der Lichtemission bei horizontaler bzw. vertikaler Stellung des Emissionpolarisators erfaßt (der Emissionspolarisator befindet sich senkrecht zum Exzitationsstrahl und muß folglich während der Messung zwischen der horizontalen und vertikalen Stellung gedreht werden). Als Detektionssystem dienen Photomultiplier-Röhren, denen zur Justierung der optimalen Emissionswellenlänge ein Emissions-Monochromator vorgeschaltet ist. Der Photomultiplier wandelt das Lichtsignal in ein elektrisches Potential um, dieses wird verstärkt und an die zentrale Steuereinheit weitergeleitet.

Die Depolarisation des Fluoreszenzlichtes ergibt sich aus dem Verhältnis der Lichtintensitäten, die den vertikal orientierten (I_{\parallel}) bzw. den horizontal orientierten Polarisator (I_{\perp}) passieren. Die steady state Polarisation P_S bzw. die Anisotropie r_S errechnen sich wie folgt (Lakowicz et al., 1983):

$$r_S = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + 2I_{\perp})$$

$$P_S = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + I_{\perp})$$

$$r_S = 2P_S / (3 - P_S)$$

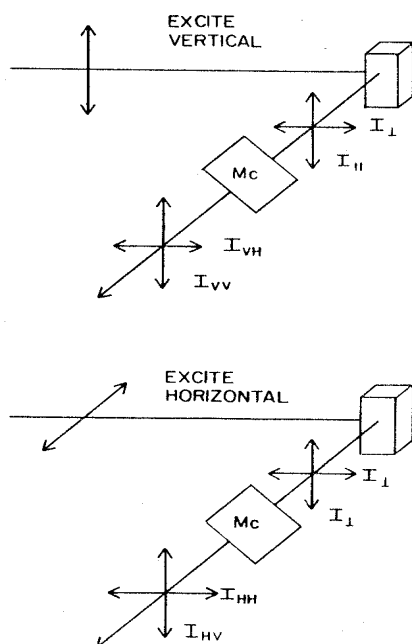


Abb. M8. L-Format-Anordnung. Die Intensitäten der vertikalen (I_{\perp}) und der horizontalen (I_{\parallel}) Komponente der Emission werden durch Drehen des Emissionspolarisators um 90° erfaßt.

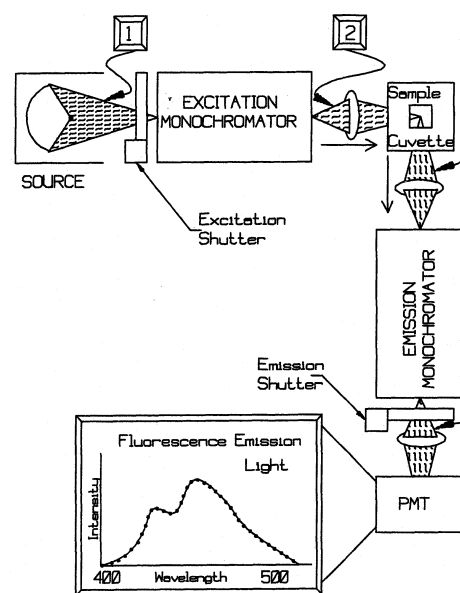


Abb. M9. Schematischer Strahlengang im L-Format Polarisations-Spektrometer. Der Emissions-Polarisator befindet sich in senkrechter Anordnung zum Exzitations-Polarisator.

2.6.2.2 Verwendete Fluoreszenzsonden

Als Fluoreszenz-Sonden im Rahmen der Anisotropie-Messungen dienen die Fluoreszenzfarbstoffe Diphenylhexatrien (DPH) sowie sein kationisches Derivat Trimethylammonium-Diphenylhexatrien (TMA-DPH). DPH interkaliert infolge seiner kompakten und linearen Struktur sowie aufgrund seiner hohen Lipophilie sehr gut in Membran-Bilayer. Es ist intramembranär tief im lipophilen Bereich der Fettsäureketten der

Membranphospholipide lokalisiert (Kaiser, London, 1998, McDonald et al., 1988; Abb. M6), wohingegen TMA-DPH infolge seiner erhöhten Amphiphilie weiter außen im Bereich der hydrophilen proteinreichen Membranoberfläche residiert und nur mit dem Kohlenwasserstoff-Schwanz in tiefere Regionen vorstößt (Kaiser, London, 1998; Abb. M6). Aufgrund seiner kationischen Eigenschaften residiert TMA-DPH vornehmlich im mit anionischen Phospholipiden und Cholesterol angereicherten cytofacialen Membranblatt, wohingegen sich DPH randomisiert über die Membran verteilt (Schroeder et al., 1988). Fluoreszenz-Messungen mit dem Farbstoff TMA-DPH liefern daher am gleichen Meßsystem grundsätzlich höhere Anisotropie-Werte als DPH-Messungen. Beide Farbstoff-Moleküle orientieren sich infolge ihrer Molekülstruktur vornehmlich parallel zu den Fettsäureketten der Membranphospholipide (Kaiser, London, 1998; Abb. M6). Die Beweglichkeit der beiden Fluoreszenzsonden hängt daher im wesentlichen von der Flexibilität dieser Fettsäurereste speziell in der Region von C-10 bis C-12 ab (Heyn, 1979). Verändert man die Fettsäure-Flexibilität z.B. durch Cholesterol-Beladung, so verändert man damit auch gleichzeitig die Mobilität der Fluorophore und damit deren Fluoreszenzpolarisation (Kaiser, London, 1998. McDonald et al., 1988). Unterschiede in der Fluoreszenzpolarisation beider Derivate resultieren aus der differierenden Molekülstruktur wie auch aus den unterschiedlichen Fluiditätseigenschaften der Membran in den Lokalisationsbereichen der jeweiligen Sonde. Somit kann man durch Derivatisierung ein und desselben Farbstoffes die Membranviskosität parallel in zwei Regionen untersuchen.

2.6.2.3 Meßdurchführung

Die Methode zur Erfassung der Membranfluidität mit DPH und TMA-DPH wurde bereits in früheren Untersuchungen etabliert und von Dr. G.P. Eckert übernommen (Eckert, 2000).

Für die Anisotropie-Bestimmung wurden 35 µl der jeweiligen Membransuspension (300 µg Protein/ml Puffer IV), 250 µl Puffer IV (Tris-HCl 5mM, pH 7.4), 350 µl einer 1:150 verdünnten DPH-Stammlösung (5 mM in Tetrahydrofuran) oder einer 1:300 verdünnten TMA-DPH-Stammlösung (5 mM in Dimethylformamid) sowie je 70 µl der jeweiligen Testsubstanz bzw. Puffer IV in Einmal-Inkubationsröhrchen (Assistent 27775/5, Firma Fisher Scientific) pipettiert. Zur Verdünnung der Fluoreszenzfarbstoff-Stammlösungen diente gleichfalls Puffer IV. Die Inkubationsröhrchen wurden anschließend im Wasserbad bei 37°C für 45 Minuten inkubiert und direkt danach die steady-state Anisotropie in einem SLM Aminco Bowman Series 2 Lumineszenzspektrometer (Firma SLM Aminco) bei 37°C

bestimmt. Die Anregungswellenlängen lagen bei 360 nm bzw. 364 nm für DPH bzw. TMA-DPH (Bandpass 4 nm), die Emissionswellenlänge lag für beide Farbstoffe bei 450 nm (Bandpass 8 nm). Der Auto-Range für die Intensität des Emissionslichtes wurde auf 80% der maximalen Detektorspannung gesetzt. Polarisations- bzw. Anisotropiewerte wurden durch Mittelwertbildung aus 20 aufeinanderfolgenden Messungen automatisch erfaßt. Jede Probe wurde in einer Vierfach-Bestimmung vermessen. Für die eingesetzten Testsubstanzen wurden zum Ausschluß falsch-positiver Ergebnisse Blank-Werte ohne Farbstoff vermessen. Als Testsubstanzen dienten die folgenden Peptide (siehe 2.8):

- a) A β ₁₋₄₂-Peptid: 1 μ mol/l im Gesamtansatz
- b) A β ₂₅₋₃₅-Peptid: 2.5 und 5 μ mol/l im Gesamtansatz.

2.6.3 Fluoreszenzmessungen mit Pyren

Die Bestimmung von Membran-Fluiditätseigenschaften mit der Fluoreszenzsonde Pyren basiert auf der konzentrationsabhängigen Bildung angeregter Pyren-Dimer-Komplexe, sogenannter Excimere (Galla, Sackmann, 1974; Aksentev et al.; 1995, McDonald et al., 1988). Excimere existieren grundsätzlich nur im angeregten Zustand. Ihre Bildung erfolgt durch Wechselwirkung zwischen einem angeregten Monomeren und einem Partnermolekül im Grundzustand. Im Fluoreszenzspektrum der Sonde tritt eine zusätzliche Emissions-Bande des Excimeren bei höherer Wellenlänge auf (Abb. M10), wohingegen das Absorptionsspektrum des Fluorophors unverändert bleibt.

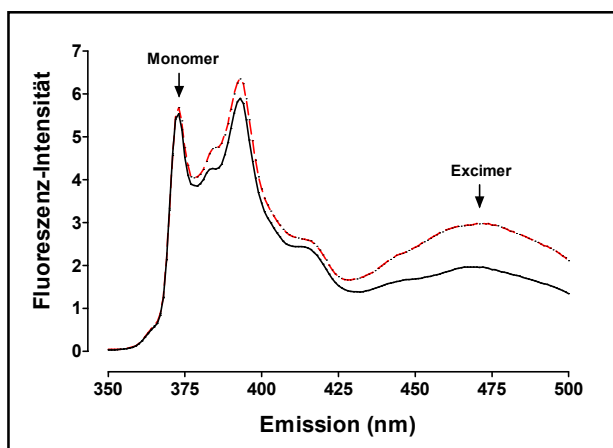


Abb. M10. Modellspektrum von Pyren in nativen Lipidmembranen. Der Excimer-Peak ist im Vergleich zur Monomer-Emission bathochrom verschoben.

Die Excimeren-Bildung kann als eine dynamische Fluoreszenzlöschung der Monomeren mit einer Stern-Volmer-Gleichung beschrieben werden (aus Galla: Spektroskopische Methoden in der Biochemie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1988):

$$(\Phi M_{\max} / \Phi M) - I = k_a c \tau_0$$

ΦM_{\max} ist die maximale Quantenausbeute der Monomeren für $c \rightarrow 0$, $k_a c$ ist die Excimeren-Bildungsrate und τ_0 die Lebensdauer des angeregten Monomers. Für die Excimeren-Dissoziation gilt die reziproke Beziehung. Neben einem Zerfall in Monomere unter Emission von Fluoreszenz können die thermodynamisch instabilen Excimere auch strahlungslos dissoziieren, was die Quantenausbeute der Excimer-Fluoreszenzemission herabsetzt.

Pyren ist ein kleines, kompaktes und sehr lipophiles Molekül. Es weist eine planares Grundgerüst aus vier Benzolringen auf (Polyzyklus) und verteilt sich vornehmlich tief im lipophilen Membraninnern im Bereich der Endgruppen der Fettsäurereste der Membranphospholipide (Aksentev et al., 1995; Abb. M6). Diese Core-Region trennt die beiden Membranblätter voneinander ab. Die Molekülstruktur erlaubt der Pyren-Sonde eine weitestgehend freie Beweglichkeit entlang aller Ebenen des hydrophoben Membrankerns, weshalb man bei diesem mit Pyren erfaßbaren Fluiditätsparameter auch von der lateralen Gesamtmobilität bzw. von der sogenannten Bulk-Fluoreszenz spricht (Binkova et al., 1990; Sawyer, 1988). Die physikochemischen Eigenschaften des Pyrens ermöglichen dem Molekül womöglich zu gewissem Grad auch eine Diffusion in weiter außen gelegene Membranregionen im Bereich der Phospholipid-Kopfgruppen (McDonald et al., 1988).

Bis heute ist nicht geklärt, ob der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für die Bildung von Pyren-Excimeren in der Fähigkeit des Moleküls zur lateralen Diffusion (Galla, Sackmann, 1974) und / oder in der Möglichkeit zur Formung lokaler Pyren-Aggregate innerhalb der Membran (Blackwell et al., 1986) liegt, was für die Interpretation der Meßergebnisse von zentraler Bedeutung sein kann. Je häufiger die in der Membran inkorporierten Pyrenmoleküle in definierter Orientierung aufeinandertreffen, desto größer wird die Quantenausbeute an Excimeren sein, und desto größer wird auch die Intensität des Excimer-Fluoreszenzsignals I_E in Relation zur Intensität des Fluoreszenzsignals der Monomere I_M . Bildet man den Quotienten I_E / I_M , so sagt dieser als Meßgröße etwas über die Eigenschaften des membranären Umfelds im Lokalisationsbereich der Pyren-Sonde aus. Bei der Interpretation der Ergebnisse muß man dann allerdings berücksichtigen, daß eine erhöhte Excimeren-Bildung nicht zwangsläufig mit einer erhöhten Lateral-Fluidität der Membran in diesem Bereich gleichzusetzen ist, weshalb der Begriff der *Fluidität* hier ungeeignet erscheint. In einer durch Cholesterol-Anreicherung rigidisierten Membran können z.B. Cholesterol-Moleküle freie Membranplätze einnehmen, so daß sich verdrängte Pyren-Moleküle auf einen

relativ eng umgrenzten Bereich verteilen müssen. Bei einer erhöhten Teilchenzahl pro Flächeneinheit steigt gleichfalls die Kollisionswahrscheinlichkeit der Teilchen, so daß eine erhöhte Excimer-Fluoreszenz in diesem Fall keine Fluidisierung, sondern eine Rigidisierung der Membran widerspiegelt.

Fluoreszenzmessungen mit Pyren können auf zwei verschiedene Arten durchgeführt werden. Bei einer Anregungswellenlänge von 334 nm bilden sich reine Pyren-Excimere und man erhält Rückschlüsse auf die oben genannten Bulk-Eigenschaften der Membran. Wählt man die Exzitation bei 286 nm, so lassen sich auch Excimere des Pyrens mit den Tryptophan-Resten von Membranproteinen erfassen. Das Verhältnis der Fluoreszenzemission dieser Excimere zur Fluoreszenzemission der Pyren-Monomere repräsentiert die Molekülbeweglichkeit in der Nachbarschaft der Membranproteine. Hierfür wurde der Begriff der Annular-Fluoreszenz (Avdulov et al., 1997a) geprägt.

Die Durchführung der Versuche erfolgte gemäß der Vorschrift von Eckert et al. (2001b). Die jeweiligen Membranpellets wurden mit Puffer IV (Tris-HCl 5mmol/l, pH 7.4) mit Hilfe eines Ultra-Turax (T25, Firma Janke & Kunkel) resuspendiert und auf einen Proteingehalt von 500 µg/ml eingestellt. 100 µl dieser Membran-Suspension wurden mit 900 µl Puffer IV (Kontrollen) bzw. 800 µl Puffer IV und 100 µl einer Lösung der jeweiligen Testsubstanz in Puffer IV versetzt und in Einmal-Inkubationsröhrchen (Assistent 27555/5, Firma Fischer Scientific) für 45 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde 1 µl einer Pyrenlösung (10 mmol/l in Dimethylformamid) mit einer 2 µl-Pipette (Firma Abimed) hinzupipettiert, die Suspension kräftig gevortext und für eine weitere Minute zur Erreichung maximaler Fluoreszenzintensität bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde in eine Quarzglasküvette (QS 101, 10 mm, Firma Helma) überführt und sofort im Anschluß im Lumineszenzspektrometer Aminco Bowman Series 2 (Firma SLM Aminco) vermessen. Die Exzitationswellenlänge für die Bestimmung der Bulk-Fluoreszenz bzw. der Annular-Fluoreszenz lag bei 334 nm bzw. 286 nm (Bandpass 4 nm). Die jeweiligen Emissionsspektren wurden bei einem Auto-range von 60% maximaler Detektorspannung aufgenommen (Vierfach-Bestimmung), wobei alternierend die Anregungswellenlängen gewechselt wurden. Den aufgezeichneten Spektren wurde die Fluoreszenzintensität der Pyren-Excimere (I_E) bei 482 nm bzw. der Pyren-Monomere (I_M) bei 373 nm entnommen. Als eigentliche Meßgröße wurde der Quotient I_E / I_M gebildet.

Als Testsubstanzen dienten die folgenden Peptide (siehe 2.8):

- a) $A\beta_{1-42}$ -Peptid: 1 µmol/l im Gesamtansatz
- b) $A\beta_{25-35}$ -Peptid: 2.5 und 5 µmol/l im Gesamtansatz.

2.7 Charakterisierung submembranärer Domänen

2.7.1 Grundlagen des Fluoreszenz-Quenchings mit TNBS

Bei der TNBS-Quenching-Technik handelt es sich ebenfalls um eine Methode aus dem Bereich der Fluoreszenz-Spektroskopie. Mit ihrer Hilfe lassen sich submembranäre Strukturen und Lipid-Verteilungen in Membranpräparationen bestimmen (Schroeder, 1981; Schroeder et al., 1991). TNBS (**T**rin**i**trobenzensulfonsäure) fungiert dabei als Fluoreszenz-Akzeptor (Quencher), der Fluoreszenzlicht angeregter Fluoreszenz-Donoren durch sogenannten Resonanz-Energie-Transfer (Förster-Transfer) zu löschen vermag. Auf diese Weise wird die Quantenausbeute Q der Fluoreszenz vermindert und die absolute Fluoreszenzintensität I der Probe nimmt ab:

$$I = c k Q; \quad c = \text{Konzentration der Probe}; \quad k = \text{Konstante}; \quad Q = \text{Quantenausbeute}$$

Ein effektiver Energie-Transfer erfordert hierbei im wesentlichen zwei Grundvoraussetzungen:

1. Eine weitreichende Überlappung des Absorptionsmaximums der Quenchersubstanz mit dem Emissionsmaximum der fluoreszierenden Probe.

TNBS zeigt eine breite Absorption mit einem Maximum bei etwa 420 nm. Zahlreiche Fluoreszenzderivate wie Diphenylhexatrien (DPH) oder Dehydroergosterol (DHE) zeigen nach Anregung im langwelligen UV genau in diesem Bereich ihr Fluoreszenz-Emissionsmaximum, was letzten Endes die hohe Effizienz der Methodik begründet (Schroeder et al., 1987).

2. Die enge räumliche Nachbarschaft und definierte Ausrichtung von Fluoreszenz-Donor und Fluoreszenz-Akzeptor.

Der Quenching-Prozess ist entfernungsabhängig und tritt effizient nur bei Unterschreiten einer kritischen Distanz zwischen Donor und Akzeptor auf. Diese Distanz beschreibt einen Bereich von etwa 10-15 Angström. Physiologische Membran-Monolayer weisen eine Dicke von ca. 20 Angstrom auf. Fluoreszenzquenching tritt folglich nur dann auf, wenn Quencher und Fluoreszenzprobe im selben Membranleaflet lokalisiert sind (Schroeder, 1988).

TNBS bindet sich mit seiner Säurefunktion kovalent an freie Aminogruppen membranärer Aminophospholipide und wird somit in der Membran fixiert (Fontaine, Schroeder, 1979). Je nach Inkubationsbedingung kann man hierbei steuern, in welche Membranblätter die Substanz

vordringt. Eine Inkubation bei 4°C bedingt eine selektive TNBS-Beladung des exofacialen Blatts der Membran, erst bei 37°C vermag TNBS auch die core-region der Membran zu überwinden und labelt dann beide Membranblätter (Fontaine, Schroeder, 1979). Die Bestimmung der Membran-Cholesteroll-Verteilung mit DHE sowie der Leaflet-DPH-Anisotropien von SPM basiert auf genau diesem Prinzip (siehe 2.7.1.2 und 2.7.1.3; Abb. M11).

2.7.1.1 TNBS-Labeling von Membranen

Die Inkubation der Membranpräparation mit TNBS erfolgte auf der Stufe der Synaptosomen nach dem Protokoll von Igbavboa et al. (1996). Hierzu wurde ein frisches Synaptosomen-Pellet aus 4-6 Maushirnen mit 5 ml Puffer III mit einer Pipette (Abimed 5 ml) resuspendiert und in zwei gleich große Anteile aliquotiert. 15 µl wurden zuvor für eine Proteinbestimmung abgenommen. Das erste Aliquot wurde anschließend mit einer entsprechenden Menge einer 5%igen TNBS-Stammlösung zur Erreichung einer Endkonzentration von 2 mmol/l TNBS versetzt. Das zweite Aliquot erhielt als Kontrolle keinen TNBS-Zusatz. Die Proben wurden dann für 15 Sekunden mit Kohlendioxid begast, mit Parafilm abgedeckt, und in Alufolie gepackt. Danach folgte Inkubation der Proben für 40 Minuten bei entweder

- a) 4°C auf Eis, wobei nur das exofaciale Membranblatt durch TNBS trinitrophenyliert wird, oder bei
- b) 37°C im Schüttelwasserbad, wobei beide Membranblätter mit TNBS beladen werden (Positiv-Kontrolle mit Absolut-Quenching).

Die Trinitrophenylierungs-Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 2.5 ml einer eiskalten Lösung von 1% BSA in PBS-Puffer gestoppt. Die Suspension wurde dann unverzüglich bei 17.200 g (= 12.000 U/min) für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert (Kühlzentrifuge J2-21, Firma Beckman). Der Überstand wurde verworfen und das resultierende Pellet in 5 ml eiskaltem Puffer I resuspendiert (Abimed-Pipette 5 ml), danach auf 7.5% und 14% Ficoll in Puffer I geschichtet und zur Aufreinigung und Gewinnung der fertigen Synaptosomen analog wie unter 2.2.2.3.2 beschrieben aufgearbeitet. Aus Kontroll- und TNBS-gelabelten Synaptosomen wurden anschließend SPMs präpariert (siehe 2.2.2.3.2). Grundsätzlich wurde die Positiv-Kontrolle bei 37°C nur stichprobenartig mitgeführt, um abschließend die Güte des TNBS-Labelings beurteilen zu können.

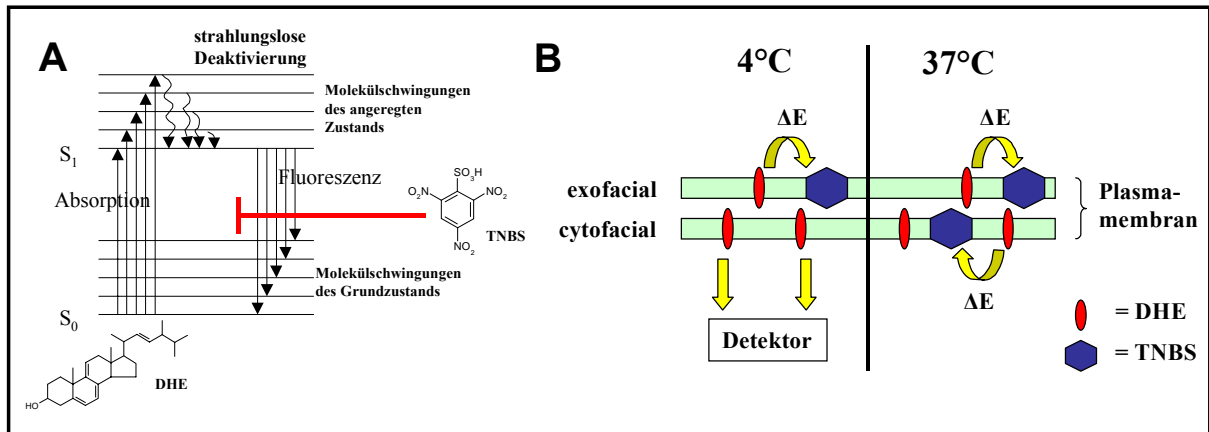


Abb. M11. Prinzip der Fluoreszenz-Quenching-Methode mit TNBS. A: Das Fluorophor der Fluoreszenzsonde (hier DHE) wird in einen angeregten Singulettzustand überführt und emittiert beim Rückfall der Elektronen in den Grundzustand Energie-Quanten, die durch Förster-Energie-Transfer von TNBS als Quencher absorbiert werden. B: Bei 4°C quencht TNBS nur Fluoreszenz von Fluoreszenz-Molekülen (hier DHE) im exofacialen Blatt, bei 37°C erfolgt komplettes Quenching. ΔE = Energie-Quant.

2.7.1.2 Bestimmung der SPM-Leaflet-Anisotropien mit DPH

Die Kombination der TNBS-Quenching-Technik mit dem Fluoreszenzfarbstoff DPH ist möglich, da die Fluoreszenzemission von DPH im Bereich des Absorptionsmaximums von TNBS liegt und eine ausreichend lange Lebensdauer aufweist. Somit lassen sich selektiv Anisotropie-Werte für einzelne Membran-Leaflets bestimmen und man erhält eine Aussage über die Fluiditätseigenschaften der Membran in diesen Regionen. Die Methode geht zurück auf Schroeder (1988).

Bei der Bestimmung werden Fluoreszenz-Intensitäten und Anisotropie-Werte simultan erfaßt (Weber, 1952). Man vermisst parallel sowohl unmarkierte als auch bei 4°C TNBS-markierte Proben jeweils mit und ohne DPH-Zusatz (Meßwerte und Leerwerte).

Zu $900\ \mu\text{l}$ PBS-Puffer wurden $100\ \mu\text{l}$ SPM-Suspension entsprechend $30\ \mu\text{g}$ Protein in PBS-Puffer sowie $0.1\ \mu\text{l}$ einer DPH-Stammlösung von $0.1\ \text{mg DPH} / \text{ml THF}$ hinzupipettiert. Blank-Proben wurden ohne DPH angesetzt. Die Proben wurden anschließend im Wasserbad bei 37°C für 45 Minuten inkubiert und im Fluoreszenz-Spektrometer (Firma SLM Aminco) vermessen. Als Exzitationswellenlänge wurden $360\ \text{nm}$ eingestellt, die Emissionswellenlänge betrug $450\ \text{nm}$ (Polarisationsfilter). Der Auto-range wurde für die ungelabelte DPH-beladene Probe auf 80% maximale Detektorspannung gesetzt. Bei der einjustierten Detektorspannung wurden dann die TNBS-gelabelten Ansätze als auch die Blanks vermessen (jeweils 20 Wiederholungen) und im Polarisationsreport das jeweilige Fluoreszenzsignal und die Anisotropie- bzw. Polarisations-Werte aufgezeichnet. Unter der mathematischen Annahme,

daß die Plasmamembran aus verschiedenen, für TNBS unterschiedlich zugänglichen Fluoreszenz-Kompartimenten besteht (Weber, 1952; Sweet, Schroeder, 1986), gilt nach diesem Modell für das vorliegende binäre System (exofaciales und cytofaciales Membranblatt in SPM) folgende Beziehung zwischen Fluoreszenzintensität F und Steady-state-Anisotropie r (Sweet, Schroeder 1986):

$$r = F_c r_c / F + (F - F_c) r_e / F$$

r = Steady-state-Anisotropie der ungelabelten DPH-beladenen Probe (Gesamt-Anisotropie)

r_c = Steady-state-Anisotropie der bei 4°C TNBS-gelabelten DPH-beladenen Probe (Anisotropie des cytofacialen Leaflets)

r_e = Steady-state-Anisotropie des exofacialen Leaflets

F = Netto-Fluoreszenzintensität der ungelabelten DPH-beladenen Probe (abzüglich Blankwert)

F_c = Netto-Fluoreszenzintensität der bei 4°C TNBS-gelabelten DPH-beladenen Probe (abzüglich Blankwert)

Alle Parameter außer r_e sind direkt aus der Messung zugänglich, so daß sich DPH-Anisotropie des exofacialen Membranblattes wie folgt errechnen läßt:

$$r_e = (r F - F_c r_c) / (F - F_c)$$

Um sicherzustellen, daß das TNBS-Labeling auf Stufe der Synaptosomen auch erfolgreich war, wurde als Kontrollversuch parallel immer der Prozentgehalt an TNBS in der bei 4°C gelabelten Probe mitbestimmt. Er errechnet sich nach der Formel

$$\% \text{ TNBS} = \% \text{ Quenching} = 100 \times (\Delta \text{ Kontrolle} - \Delta \text{ TNBS}) / \Delta \text{ Kontrolle}.$$

Δ Kontrolle = Fluoreszenzintensität DPH-beladene ungelabelte Probe –
Fluoreszenzintensität unbeladene ungelabelte Probe

Δ TNBS = Fluoreszenzintensität DPH-beladene TNBS-gelabelte Probe –
Fluoreszenzintensität unbeladene TNBS-gelabelte Probe

Eine erfolgreiche und selektive Beladung des exofacialen Blattes mit TNBS ist gekennzeichnet durch Prozentwerte im Bereich von 42-52% und erlaubt zuverlässige Aussagen bei der Leaflet-Anisotropiebestimmung (Igbavboa et al., 1996). Diese Aussage ist möglich, weil sich DPH randomisiert über die gesamte Membran verteilt, d.h. in beiden Membran-Leaflets sind im Gleichgewichtszustand etwa 50 mol% DPH lokalisiert (Sweet, Schroeder, 1986). Das Verteilungsmuster von DPH ist somit Grundvoraussetzung für die gesamte Meßmethodik. Untersucht man bei 37°C TNBS-gelabelte Proben, so sollte das prozentuale Quenching der DPH-Fluoreszenz bei 90-100% liegen (Positivkontrolle).

2.7.1.2.1 Bestimmung des Leaflet-Amyloideffekts (DPH)

Die Bestimmung des Amyloid-Effektes auf die Leaflet-DPH-Anisotropie von synaptosomalen Plasmamembranen verläuft analog zu 2.7.1.2. Man vermischt ungelabelte und bei 4°C TNBS-gelabelte SPMs ohne Amyloidzusatz sowie parallel einen zweiten, äquivalenten Versuchsansatz, dem man voraggregiertes Amyloid beta Protein zusetzt. Bei diesem Parallelansatz wurden zu 800 µl PBS-Puffer 100 µl SPM-Suspension entsprechend 30 µg Protein in PBS-Puffer, 100 µl einer 10 µmol/l Lösung von 24 Stunden voraggregiertem A β ₁₋₄₂ in Puffer IV, sowie 0.1 µl einer DPH-Stammlösung von 0.1 mg DPH / ml THF hinzupipettiert. Blanks wurden ohne DPH nur mit A β ₁₋₄₂ (1 µmol/l) inkubiert (45 Minuten bei 37°C). Man bestimmt analog zu 2.7.1.2 in beiden Versuchsansätzen die Leaflet-DPH-Anisotropie-Werte, so daß sich der Netto-Amyloid-Effekt auf das jeweilige Leaflet durch einfache Subtraktion errechnen läßt:

$$\text{A}\beta\text{-Effekt gesamt} = r (\text{Ansatz mit A}\beta) - r (\text{Ansatz ohne A}\beta) = \Delta r$$

$$\text{A}\beta\text{-Effekt cytofacial} = r_c (\text{Ansatz mit A}\beta) - r_c (\text{Ansatz ohne A}\beta) = \Delta r_c$$

$$\text{A}\beta\text{-Effekt exofacial} = r_e (\text{Ansatz mit A}\beta) - r_e (\text{Ansatz ohne A}\beta) = \Delta r_e$$

2.7.1.3 Bestimmung der SPM-Leaflet-Cholesterolverteilung

Bei dieser Methode behandelt man bei 4°C TNBS-gelabelte sowie ungelabelte Membrane mit Transfervesikeln (siehe 2.7.1.3.2), die als Sonde für das Fluoreszenzsterol-Derivat Dehydroergosterol (DHE) dienen. DHE ähnelt in seinen physikochemischen Eigenschaften sehr stark dem Cholesterol, so daß es intramembranär zu einem dynamischen Austauschprozess von nativem Membran-Cholesterol und DHE im Verhältnis 1:1 kommt

(Igbavboa et al., 1996). Vergleicht man anschließend die Fluoreszenzintensität von DHE in der ungelabelten und der exofacial gelabelten Probe, so spiegelt das Fluoreszenz-Quenching als prozentuale Verringerung der Gesamtfluoreszenz den prozentualen Cholesterolgehalt im exofacialen Membranblatt wider, da nur in diesem Blatt effizientes Quenching auftritt (Abb. M11).

2.7.1.3.1 Aufreinigung von DHE

Dehydroergosterol ist ein Fluoreszenzanalogen des Cholesterols. Seine Grundstruktur enthält ein Fluorophor mit mehreren konjugierten Doppelbindungen, was die Substanz sehr reaktionsfähig macht (siehe Abb. M11 und M13). DHE ist in hohem Maße sauerstoffempfindlich sowie thermo- und photoinstabil. Oxidations- und andere Degradationsprodukte können die Verteilungsmessung empfindlich beeinflussen. So verändern oxidierte Sterole *per se* die Transbilayer-Cholesterolverteilung (Schroeder, 1988) und müssen vor der Messung unbedingt ausgeschlossen werden. Zur Aufreinigung von DHE wurden dabei zwei Verfahren eingesetzt.

1. Präparative Dünnschichtchromatographie:

0.5 ml ethanolische DHE-Lösung (5 mmol/l) wurden mit Hilfe einer Glaskapillare unter Stickstoffbegasung hauchdünn auf die DC-Platte (Silicagel 60 F₂₅₄, 1 mm, Firma Merck) unter Einhaltung eines Seitenrandes von etwa 1 cm aufgetragen und im Gasstrom getrocknet. Die Platte wurde anschließend mit Ethylacetat: n-Hexan 1:1 (v/v) in einer mit Stickstoff gefluteten und fließmittelgesättigten Kammer im Dunkeln entwickelt. Nach der Entwicklung wurde das DHE im langwelligen UV-Licht durch seine blaue Eigenfluoreszenz sowie durch Fluoreszenzlöschung bei 254 nm detektiert ($R_f = 0.62$) und markiert. Die entsprechenden Banden wurden ausgekratzt, das Kieselgel mit Ethylacetat (Lichrosolv-Qualität, Firma Merck) zweimal ausgezogen und anschließend im Wasserstrahlvakuum filtriert (Filter Marke Selecta, 185 mm, Firma Schleicher & Schüll). Die vereinigten Filtrate wurden dann in stickstoffreicher Atmosphäre unter vermindertem Druck einrotiert, der Rückstand gegengewogen und in 0.5 ml eiskaltem Ethanol (p.a. Qualität, Firma Merck) aufgenommen. Diese Lösung wurde bis zur weiteren Verwendung unter Stickstoff bei -20°C gelagert.

2. HPLC-Analyse:

Auf der gleichen Trennmethode wie die DC beruht auch die HPLC, nur weist diese Methode eine wesentlich höhere Trennleistung auf. Gleichfalls ist die Substanz in geringerem Maße Umgebungseinflüssen wie Licht und Sauerstoff ausgesetzt. Das verwendete Trennsystem ist wie folgt charakterisiert und wurde routinemäßig zur Aufreinigung größerer DHE-Mengen eingesetzt:

HPLC-Anlage Varian Star, Firma Varian Deutschland GmbH

Pumpe: 2 Kolbenhubpumpen Typ Rainin Dynamax solvent delivery system SD-200 mit Pressure-Modul (4000 psi)

Fließmittel: Acetonitril:Methanol 30:70 (v/v) (Lichrosolv-Qualität), Flußrate 1 ml/min (isokratisch), dynamischer Mischer

Säule: LiChrospher® 100 RP-18, 5 µm, 250 x 4 mm, Firma Merck

Detektion: UV-Detektor Rainin Dynamax absorbance detector UV-D II;

Absorptionsmessung des Eluats bei 215 nm

Injektion: Autosampler Typ Varian pro Star 410; Injektionsvolumen 100 µl ethanolische DHE-Lösung (5 mg/ml)

Retentionszeit DHE: ca. 16.5 - 18 Minuten

Software: Varian Star 5.31 Chromatography Software (Steuerung, Auswertung)

Die einzelnen DHE-Fractionen wurden nach Durchlaufen der Säule entsprechend ihrem Detektorsignal gesammelt und anschließend in stickstoffreicher Atmosphäre unter vermindertem Druck einrotiert. Der Rückstand wurde gegengewogen und in eiskaltem Ethanol (p.a. Qualität, Firma Merck) entsprechend einer Endkonzentration von 5 mmol/l DHE aufgenommen. Diese Lösung wurde bis zur weiteren Verwendung unter Stickstoff bei -20°C gelagert. Ein exemplarisches HPLC-Chromatogramm ist nachfolgend aufgeführt (Abb. M12).

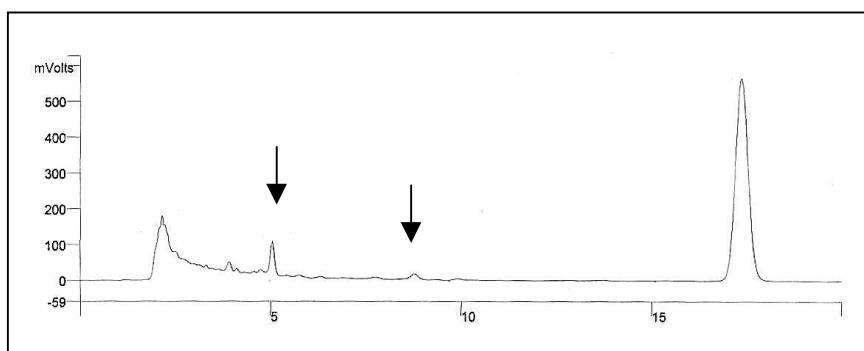


Abb. M12. Chromatogramm von DHE. Deutliche Verunreinigungen (Pfeile) sind bei $t \sim 5$ min und $t \sim 8$ min zu sehen. Der Hauptpeak erscheint bei $t \sim 17$ min.

2.7.1.3.2 Präparation von unilamellaren Transfer-Liposomen

Für die Membran-Inkorporation von DHE werden Transfer-Liposomen, sogenannte SUV (small unilammelar vesicles), benötigt. Diese ermöglichen einen stöchiometrischen und dynamischen Austausch von liposomalem DHE und nativem Membrancholesterol, indem ihr Matrixlipid mit dem Bilayer interferiert (Igbavboa et al., 1996). Als Matrixlipid diente 1-Palmitoyl-2-oleylphosphatidylcholin (POPC). Das Herstellungsverfahren folgte dem Protokoll von Igbavboa et al. (1996). Es handelt sich dabei um eine sogenannte Ultraschallmethode.

Zunächst wurden in Ethanol gelöstes DHE (5 mmol/l) und in Chloroform gelöstes POPC (1 mg/ml) in einem säuregewaschenen Rundkolben im Verhältnis 42/58 mol% gemischt. Aufgrund von Herstellungsverlusten wurde der Gesamtansatz großzügig kalkuliert. Die Mischung wurde anschließend unter Stickstoff bei maximal 45°C und vermindertem Druck einrotiert und für weitere 24 Stunden unter Stickstoff im Dunkeln nachgetrocknet. Der durch die Lösungsmittel- evaporation entstandene trockene Lipidfilm wurde mit 2 ml Puffer VI versetzt (Hydratisierung), für eine Minute kräftig gevortext, und dann für eine Minute im Ultraschallbad (Typ Sonorex RK105H, Firma Bandelin) bei Raumtemperatur beschallt. Diese zwei Behandlungsschritte wurden insgesamt dreimal wiederholt. Die trübe Dispersion ist angereichert an MLV (multilammelar vesicles). Sie wurde im folgenden in ein PP-Röhrchen gefüllt und mit einem Branson-Sonifier (Typ Cell Disruptor B15, Firma Branson Ultrasonics Corp.) zur Erzeugung von SUV für 45 Minuten bei 4°C (Eisbad) unter homogenem Stickstofffluß beschallt (Output 3 = 25-28% Leistung, duty cycle 40%, Eintauchtiefe des Ultraschall-Tips etwa 1 cm). Die klare Lösung wurde mit Puffer VI auf 3.9 ml aufgefüllt, in ein 3.9 ml-Polyallomer Tube (Firma Beckman) gefüllt, verschweißt (Tube-Topper Modell 342428 mit Tube-Set, Firma Beckman) und abschließend bei 140.000 g (= 39.000 U/min) und 4°C für 1.5 h in der Ultrazentrifuge (Modell L8-70M, Rotor SW 41-Ti, Firma Beckman,) zentrifugiert. Die obere Lösungshälfte enthielt SUV und wurde abgenommen, die untere, MLV-enthaltende Hälfte wurde verworfen. Die SUV-Präparation wurde unter Stickstoff bei Raumtemperatur im Dunkeln für maximal 3 Tage gelagert.

2.7.1.3.3 Membran-Inkorporation von DHE

Für die Membran-Inkorporation von DHE wurde die Methode von Igbavboa et al. (1996) adaptiert. Für einen stöchiometrischen Austausch von DHE und Cholesterol wurde ein

Inkubationsverhältnis beider Substanzen von 1:1 zugrundegelegt (Schroeder et al., 1996). Das setzt voraus, daß man den DHE-Gehalt in einem definierten Volumen SUV-Präparation kennt. Die DHE-Konzentrationsbestimmung erfolgte in diesem Fall über eine Fluoreszenzmessung. Zunächst wurde eine Konzentrationsreihe (0-100 µg/ml) von HPLC-reinem ethanolischem DHE in Aqua bidest. erstellt. Diese Standardreihe wurde dann bei 375 nm (Exzitation 324 nm) und 790 Volt (Filter 0°) am Fluoreszenzspektrometer (Firma SLM Aminco) unverzüglich vermessen und ausgewertet (Abb. M13). Bei einer analogen Fluoreszenzmessung mit der vorliegenden SUV-Präparation muß man zwei wesentliche Dinge beachten:

a) Bei einem Molverhältnis von POPC/DHE von 58/42 liegt DHE im POPC-Monolayer als eigenständige, kohärente Phase vor. In diesem Zustand tritt ein ausgeprägtes Eigen-Quenching der DHE-Fluoreszenz durch Nachbarmoleküle auf (Schroeder et al., 1987). Die Fluoreszenz-Löschung kommt hierbei vor allem durch dynamische Kollisionsprozesse von angeregten DHE-Molekülen zustande, so daß das Fluoreszenzsignal keine zulässigen Aussagen über die tatsächliche DHE-Konzentration im Liposom zuläßt.

b) Die Fluoreszenzintensität ist weiterhin eine Funktion der Dielektrizitätskonstanten und damit der Polarität des umgebenden Mediums, da die energetische Lage angeregter Molekülzustände durch das Medium mitdeterminiert wird (aus Galla, Spektroskopische Methoden in der Biochemie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1988). Im wäßrig-ethanolischen Medium ist folglich eine veränderte Fluoreszenz gegenüber dem POPC-Umfeld im Liposom zu erwarten.

Die Punkte a) und b) erfordern eine Extraktion von DHE aus dem liposomalen Medium. Hierzu bedient man sich einer Methode, mit der man polare von unpolaren Lipiden und Nicht-Lipiden trennen kann (Kosukhin, Akhmetova, 1987). Man versetzt 100 µl SUV-Lösung mit 900 µl Wasser, fügt 2 ml Doles Reagenz (Isopropanol/Heptan/Wasser 4:1:0.1) und 1 ml Heptan zu und vortext kräftig für 30 Sekunden. Danach zentrifugiert man bei 2000 U/min und 4 °C für 10 Minuten (Kühl-Tischzentrifuge Modell GS-6R, Firma Beckman) und nimmt die obere Heptanphase ab. Diese dampft man unter Stickstoffbegasung bis zur Trockne ein und nimmt den Rückstand in 500 µl Ethanol auf. Ein Aliquot dieser Lösung wird anschließend fluorezenzspektrometrisch äquivalent gegen die Standardreihe vermessen. Kennt man den Cholesterolgehalt der SPM-Proben, so läßt sich der Inkubationsansatz für ein Verhältnis von Cholesterol / DHE von 1:1 berechnen.

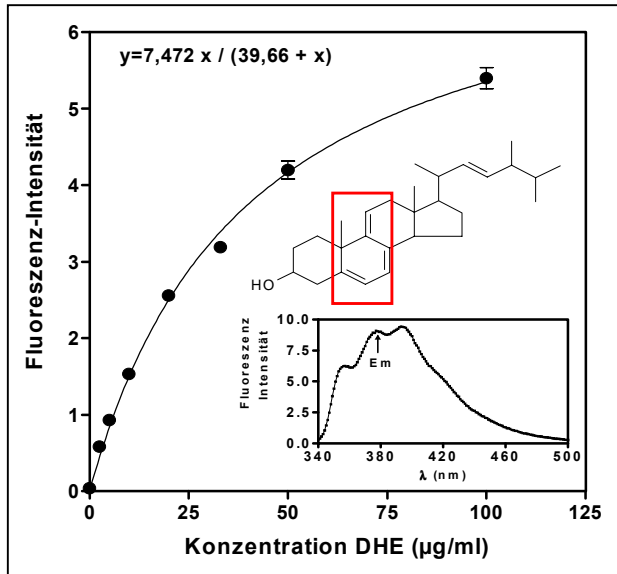


Abb. M13. Fluoreszenz-Spektrum und Fluoreszenz-Konzentrationsreihe von DHE in Ethanol. Das Fluorophor im Molekül, das sich bei 324 nm anregen läßt, ist hervorgehoben. Em = Emission (375 nm).

Im folgenden werden bei 4°C TNBS-gelabelte und ungelabelte SPMs (jeweils 150-200 µg Protein) mit einer dem Cholesterolgehalt entsprechenden Menge SUV-Lösung versetzt und mit Puffer VI ad 1 ml aufgefüllt. Blanks einer jeden Probe werden jeweils ohne DHE nur mit Puffer VI auf 1 ml aufgefüllt. Anschließend inkubiert man die Proben für 1 Stunde bei 37°C im Thermomixer (Modell Comfort, Firma Eppendorf) bei 1.400 U/min unter Lichtschutz und zentrifugiert danach bei 20.000 g (= 14.950 U/min) und 4°C für 15 Minuten ab (Kühl-Tischzentrifuge Modell Microfuge R, Firma Beckman). Der Überstand (überschüssige SUVs) wird verworfen und das Pellet nochmals in 0.5 ml eiskaltem Puffer VI resuspendiert und analog ein zweites Mal zentrifugiert. Das neuerliche Pellet wird dann in 1 ml kaltem PBS-Puffer mit einer Pipette resuspendiert.

2.7.1.3.4 Meßdurchführung

Die Fluoreszenzintensität der Proben wurde bei 37°C am Fluoreszenz-Spektrometer (Firma SLM Aminco) bestimmt (Dreifachbestimmung). Die Exzitationswellenlänge lag bei 324 nm, die Emissionswellenlänge bei 375 nm (Abb. M13). Bei geöffneten Polarisationsfiltern wurde der Auto-range für die ungelabelte DHE-beladene Probe auf 60% maximale Detektorspannung gesetzt und bei der einjustierten Detektorspannung die TNBS-beladenen Proben sowie die Blank-Proben vermessen. Aus den erhaltenen Meßwerten lassen sich die prozentualen Gehalte an exofaciale und cytofaciale Membrancholesterol wie folgt ermitteln (Igbavboa et al., 1996):

$$\% \text{ Cholesterol exofacial: } C_{exo} = 100 \times (\Delta \text{ Kontrolle} - \Delta \text{ TNBS}) / \Delta \text{ Kontrolle}$$

Δ Kontrolle = Fluoreszenzintensität DHE-beladene ungelabelte Probe –
Fluoreszenzintensität unbeladene ungelabelte Probe

Δ TNBS = Fluoreszenzintensität DHE-beladene TNBS-gelabelte Probe –
Fluoreszenzintensität unbeladene TNBS-gelabelte Probe

Der prozentuale Gehalt an cytofacialem Cholesterol ergibt sich dann durch einfache Subtraktion:

$$\% \text{ Cholesterol cytofacial: } C_{cyto} = 100 - C_{exo}$$

Multipliziert man weiter die prozentualen Leaflet-Cholesterol-Gehalte mit den zugehörigen Gesamtcholesterol-Gehalten der Proben, so erhält man die absoluten Leaflet-Cholesterol-Gehalte in $\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein.

2.8 Beta-Amyloid-Peptide

2.8.1 Charakterisierung

Die in den Untersuchungen verwendeten Amyloid beta-Peptide wurden in lyophilisierter Form von der Firma Bachem, Heidelberg, bezogen. Eingesetzt wurden die Peptidsequenzen $A\beta_{25-35}$ und $A\beta_{1-42}$. Anfänglich wurde das $A\beta_{25-35}$ -Fragment von der Firma Sigma, München, bezogen, aufgrund qualitativer Mängel zweier Chargen wurde der Lieferant jedoch gewechselt.

Das $A\beta_{25-35}$ -Peptid besitzt physiologisch keine Relevanz. Es stellt eine synthetische Sequenz des Full-length-Peptids dar und beinhaltet lediglich die für die biologische Aktivität essentiellen Epitope. Sein Vorteil gegenüber dem $A\beta_{1-42}$ -Peptid liegt in der einfachen und schnellen Handhabung. Die *in vitro* Effekte von $A\beta_{25-35}$ auf die verwendeten Hirnmembran-Präparationen sind zwar schwächer als die des muren $A\beta_{1-42}$ -Peptids, aber qualitativ gleichwertig, insbesondere was die Effekte auf einzelne Fluiditätsparameter von Membranen für einen adaptierten Konzentrationsbereich betrifft.

Das A β_{1-42} -Peptid kommt auch physiologisch vor und ist in aggregierter Form der Hauptbestandteil seniler Plaques im Gehirn von Alzheimer Patienten (siehe 1.4.3.1). Die zusätzlichen Aminosäuresequenzen am N- und C-Terminus bedingen die höhere Wirksamkeit des Peptids verglichen mit A β_{25-35} , da hierdurch insbesondere die Proteinfaltung (Sekundär- und Tertiärstruktur) in gewissem Maße beeinflusst wird. A β -Peptide, insbesondere A β_{1-42} , neigen im allgemeinen sehr stark zur Selbstaggregation und bilden dabei sogenannte β -Faltblattstrukturen aus (Cappai, White, 1999). Dieser dynamische Aggregationsprozess wird durch zahlreiche Faktoren wie Peptidsequenz, Peptidkonzentration, Ionenstärke des Mediums oder Temperatur beeinflusst (Burdick et al., 1992). Die Anlagerung von Fluoreszenzfarbstoffen an die β -Faltblattstruktur kann zur Bestimmung des Aggregationsgrades des Peptids genutzt werden (Eckert, 2000).

In den durchgeführten Untersuchungen wurden ausschließlich homogen dispergierte kolloidale Lösungen von aggregierten Peptiden verwendet. Die Peptide A β_{25-35} und A β_{1-42} wurden bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert. A β_{25-35} wurde unter Berücksichtigung des Proteingehalts in einer definierten Menge eiskaltem Puffer IV (Tris-HCl 5 mmol/l, pH 7.4) zur Erstellung einer 5 mmol/l Lösung gelöst, für 10 Minuten auf Eis im Ultraschallbad beschallt und dann nach kräftigem Vortexen aliquotiert (Eisbad) und weggefroren. A β_{1-42} wurde unter Berücksichtigung des Proteingehalts in einer definierten Menge von mit konzentriertem Ammoniak auf pH 9 justiertem bidestilliertem Wasser zur Erstellung einer 1 mmol/l Lösung gelöst, für 10 Minuten auf Eis im Ultraschallbad beschallt und dann nach kräftigem Vortexen aliquotiert (Eisbad) und weggefroren. Die ständige Kühlung ist zur Vermeidung frühzeitiger Aggregation notwendig.

2.8.2 Aggregation

Die jeweiligen Amyloid-Stammaliquote wurden vor jeder Messung aufgetaut und mit Puffer IV auf einen Peptidgehalt von 100 $\mu\text{mol/l}$ eingestellt. A β_{25-35} wurde anschließend zur vollständigen Aggregation für 4 Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert, die Inkubation von A β_{1-42} erfolgte für 16 Stunden bei 37°C (Eckert, 2000). Die aggregierten Ansätze wurden dann auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

2.9 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der Experimente erfolgte mit der Prism 3®-Software (Firma GraphPad, San Diego, USA). Angegebene Meßwerte sind Mittelwerte mit Standardfehler vom Mittelwert (\pm SEM). Mittelwert-Vergleiche zur Prüfung von statistisch signifikanten Unterschieden zwischen zwei unterschiedlichen Meßgruppen (z.B. verschiedene Alterskohorten) wurden mit dem zweiseitigen ungepaarten Student's t-Test durchgeführt. Zwei einheitliche Gruppen (z.B. Konzentrationsabhängigkeit an einer Kohorte) wurden mit dem gepaarten t-Test statistisch verglichen. Bei Vergleich von mehr als zwei Gruppen mit nur einer Meßvariablen (z.B. Alter) wurde eine einseitige (one-way) ANOVA (Varianzanalyse) mit anschließendem Bonferroni-posthoc-Test (Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander) gerechnet. Gruppenanalysen mit zwei veränderlichen Meßvariablen (z.B. Alter *und* Konzentration) wurden mit einer zweiseitigen (two-way) multivariablen ANOVA durchgeführt. Weiterhin wurden Korrelationen nach Pearson sowie lineare Regressionsanalysen gerechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Methodenetablierung

3.1.1 Etablierung der Cholesterol-Modulation mit M β CD und seinen Cholesterol-Einschlußverbindungen

In verschiedenen Vorversuchen wurde eine Konzentrationsreihe für die Cholesterol-Depletion ausgetestet und schließlich eine maximale Cyclodextrin-Konzentration von 10 $\mu\text{mol/mg}$ Protein gewählt. Nach Etablierung der optimalen Präparationsbedingungen für die M β CD-Cholesterol-Einschlußverbindungen wurden diese entsprechend einer Endkonzentration von 0.4 $\mu\text{mol Cholesterol/mg Protein}$ eingesetzt.

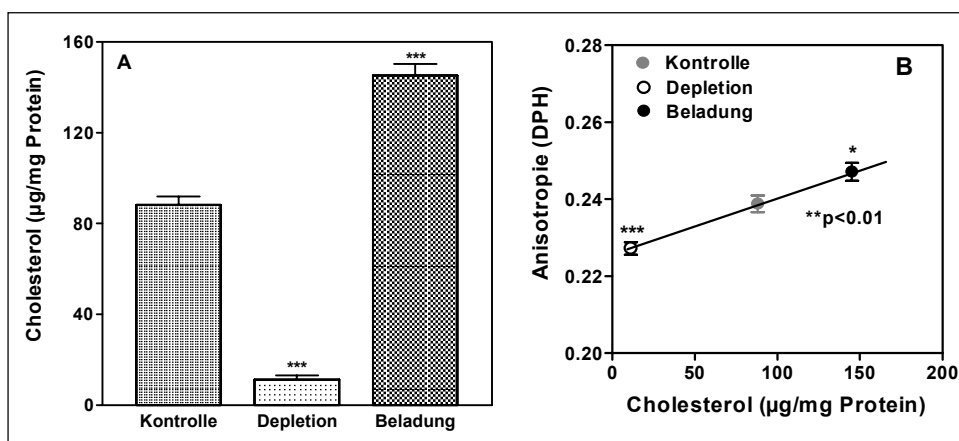


Abb.1. Cholesterol-Depletion und Beladung an Ganzhirn-Membranen mittelalter Mäuse. A: Membran-Cholesterolgehalt; B: DPH-Anisotropie. Mittelwert \pm SEM; n = 8-12; A,B: *p<0.05, ***p<0.001 signifikanter Unterschied gegenüber Kontrolle (t-Test); B: **p<0.01 signifikante Korrelation (Pearson).

Die mit diesem Versuchsdesign im Vorversuch erreichbaren Effekte auf den Membran-Cholesterolgehalt sind in Abb. 1A für Ganzhirnmembranen mittelalter Mäuse gezeigt. Die Depletion bedingte Cholesterolsenkungen um etwa 85%, wohingegen die Beladung den Cholesterolgehalt um ca. den Faktor 1.6 erhöhte. Die beobachteten Cholesterol-Veränderungen waren im Vorversuch gleichfalls mit einer deutlichen Variation der Membranfluidität im Bereich der Fettsäurereste der Phospholipide verbunden, wobei Fluidität und Cholesterolgehalt positiv korrelierten (Abb. 1B).

3.1.2 Etablierung der TNBS-Quenching-Technik

Die TNBS-Quenching-Technik ermöglicht die differentielle Betrachtung von Anisotropiewerten und Cholesterolgehalten im exofacialen und cytofacialen Membranblatt und basiert auf einem Fluoreszenz-Quenching-Prozess von TNBS in Kombination mit DHE und DPH (Schroeder et al. 1991). Mit zunehmendem Alter erhöht sich der Gehalt an exofacialem Membrancholesterol (der Quotient *Cholesterol exofacial / cytofacial* nimmt zu) und das exofaciale Membranblatt wird rigidisiert (Igbavboa et al. 1996, Wood et al., 2002).

Die Methode wurde zum einen an unbehandelten SPM verschiedener Maus-Alterskohorten etabliert, zum anderen an mit M β CD-modulierten SPM. M β CD ist ein unspezifisches Agens und beeinflusst insbesondere in höheren Konzentrationen die Membranintegrität (Hao et al., 2001), was die TNBS-Methode empfindlich stört.

Die Methodik erfordert ein selektives Quenching der DPH-Fluoreszenz mit TNBS im exofacialen Blatt unter nicht-penetrierenden Bedingungen bzw. als Positivkontrolle ein 90-100-prozentiges Quenching unter penetrierenden Bedingungen (Schroeder et al., 1988). Nach den Etablierungsversuchen lagen die entsprechenden %-Quenching-Werte bei 44.69 ± 1.82 (nicht-penetrierend) bzw. 91.35 ± 1.65 (penetrierend) (Mittelwert \pm SEM) und damit im geforderten Bereich.

Abb. 2 zeigt exemplarisch die ermittelten Leaflet-Parameter an unbehandelten SPM mittelalter Mäuse. Nur etwa 25% des Membrancholesterols sind im exofacialen Blatt lokalisiert, daß gleichfalls in Umgebung der Sonde DPH deutlich fluider ist als das cytofaciale Blatt. Dessen DPH-Anisotropie r_c ist gegenüber der Gesamt-Anisotropie r signifikant erhöht. r errechnet sich mathematisch aus den einzelnen Leaflet-Anisotropien r_c und r_e .

Zur Etablierung der Methode an Cholesterol-modulierten SPM wurden verschiedene M β CD-Konzentrationen ausgetestet und der Einfluß auf das prozentuale DPH-Quenching verfolgt. Im Falle einer Beeinflussung der Membranintegrität im core-Bereich durch M β CD würde man unter nicht-penetrierenden Bedingungen auch eine Einlagerung des Fluoreszenz-Quenchers in das cytofaciale Blatt erwarten. Abb. 3 zeigt, daß dies für hohe M β CD-Konzentrationen (Set 2, Set 3) auch der Fall ist. Da allerdings bereits mit einer Konzentration von $1.6 \mu\text{mol M}\beta\text{CD/mg Protein}$ (Set 1) eine signifikante Cholesterol-Senkung gegenüber Kontrollen erreicht werden konnte, wurden diese Testbedingungen für die Hauptversuche gewählt.

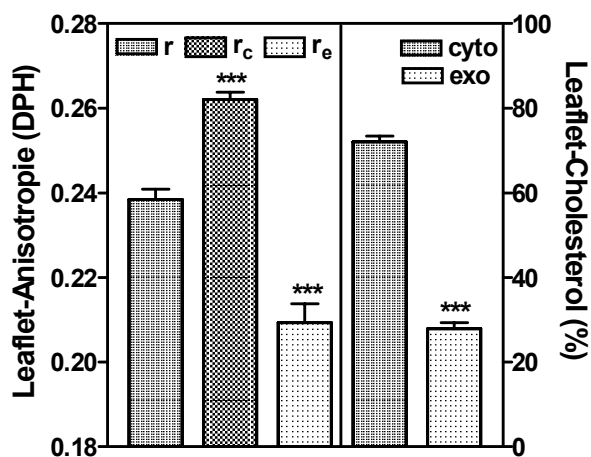


Abb. 2. DPH-Leaflet-Anisotropien und Leaflet-Cholesterolgehalte von SPM mittelalterer Mäuse. Mittelwert \pm SEM; n = 5 (a 5 Tiere); ***p<0.001 signifikant vs. r (linke Seite) bzw. vs. Cholesterol cytofacial (rechte Seite) (t-Test); cyto = cytofacial; exo = exofacial. r = Gesamt-Anisotropie, r_c = cytofaciale Anisotropie, r_e = exofaciale Anisotropie.

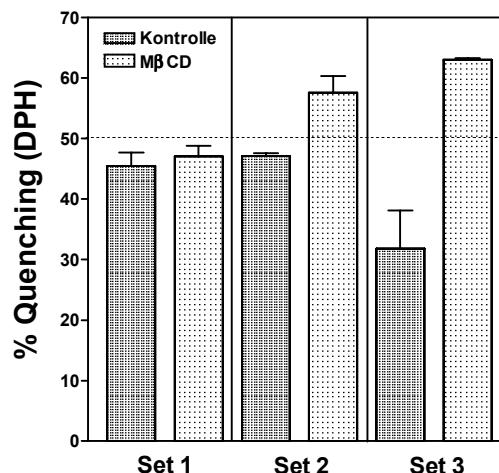


Abb. 3. %-Quenching (DPH) an MβCD-modulierten SPM; Set 1 = 1.6 μ mol MβCD/mg Protein; Set 2 = 3.3 μ mol MβCD/mg Protein; Set 3 = 8.0 μ mol MβCD/mg Protein; Mittelwert \pm SEM; n = 2-5. Die niedrigen %-Quenching-Werte bei Kontrollen von Set 3 resultieren aus nur zwei Messungen und zeigen, daß bei diesen Kontrollproben das exofaciale TNBS-Labeling nicht quantitativ verlief.

3.2 *In vitro* Lipid-Modulation an Hirnmembranen von NMRI-Mäusen verschiedener Alterskohorten

3.2.1 Cholesterol-Modulation an Ganzhirnmembranen

Cholesterol-Modulationen mit MβCD und seinen Einschlußverbindungen wurden an Ganzhirn-Membranen von jungen (1-2 Monate), mittelalten (10-12 Monate) und alten (22-24 Monate) NMRI-Mäusen durchgeführt und ihr Einfluß auf verschiedene physikochemische Membranparameter untersucht. Es wurden die Inkubationsbedingungen aus den Vorversuchen gewählt, erweitert um eine milde Depletion und eine Wiederbeladung. Folgende Abkürzungen sind im Folgenden allgemein gültig: K = Kontrolle, D1 bzw. D = starke Depletion (10 μ mol MβCD/mg Protein), D2 = milde Depletion (5 μ mol MβCD/mg Protein), B = Beladung (0.4 μ mol Cholesterol/mg Protein), WB =Wiederbeladung (Kombination aus D1 und B).

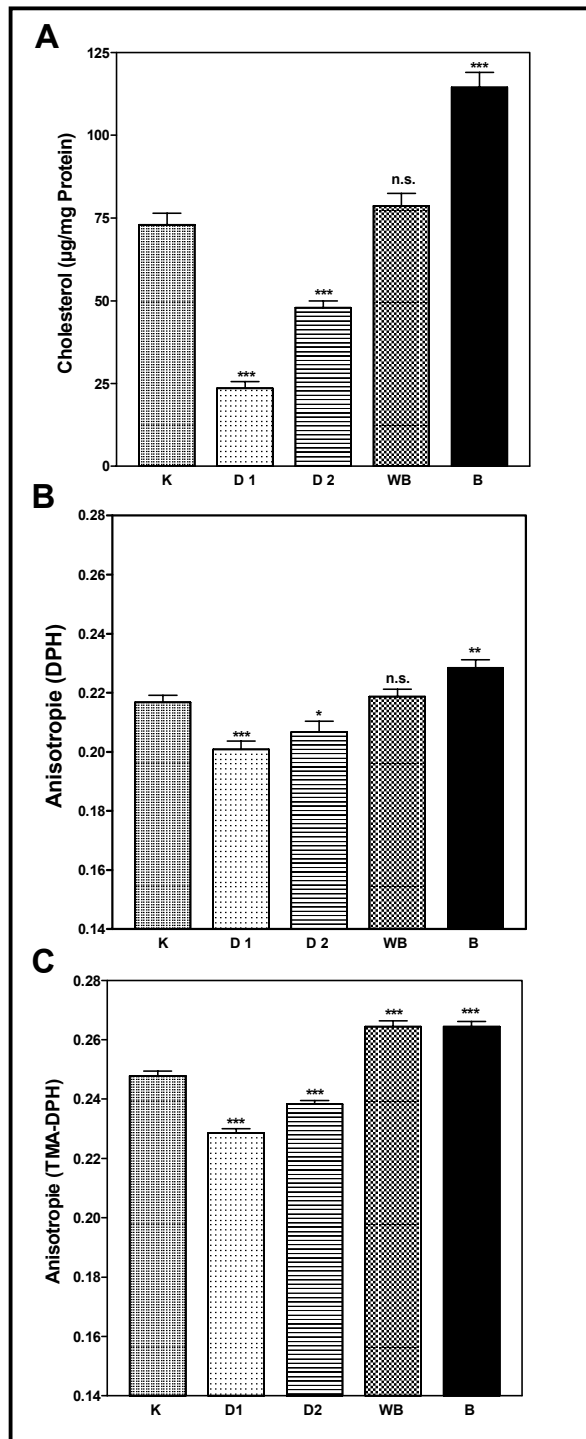


Abb. 4. Cholester-Modulation an Ganzhirnmembranen junger Mäuse: Einfluß auf den Cholestergehalt (A), die DPH- (B) und die TMA-DPH-Anisotropie (C). Mittelwert \pm SEM; $n = 7-9$; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ signifikant vs. Kontrolle K (ANOVA).

3.2.1.1 Einfluß auf den Membrancholester-Ge- halt

Abb. 4A zeigt, daß man den Membrancholester-Ge- halt von Ganzhirnmembranen junger Mäuse spezifisch modulieren kann. Die durchgeführten Cholester-Depletionen bedingen signifikante Abnahmen im Membrancholester-Spiegel. Durch Kombination von Depletion und Beladung läßt sich der native Cholester-Spiegel rekonstituieren. Zudem fällt der sehr stark ausgeprägte Beladungseffekt auf etwa 155% des Ausgangswertes auf (Abb. 4A). Qualitativ vergleichbare Modulations- Effekte sind auch an Ganzhirnmembranen alter Mäuse festzustellen (Tabelle 1). Diese weisen *per se* einen signifikant höheren Membrancholester-Ge- halt auf und lassen sich dementsprechend auch nicht mehr im gleichen Ausmaß beladen wie Hirnmembrane junger Mäuse (Tabelle 1). Zur besseren Vergleichbarkeit des quantitativen Ausmaßes der einzelnen Cholester-Modulationen sind die Cholester-Werte in Prozent der Kontrolle angegeben (Tabelle 1).

3.2.1.2 Einfluß auf verschiedene Membranfluiditäts-Parameter

3.2.1.2.1 DPH- und TMA-DPH-Anisotropie

Mit der Cholesterol-Modulation geht eine Veränderung der physikochemischen Membraneigenschaften einher. Sowohl an Membranen junger als auch alter Mäuse sind niedrigere Membrancholesterol-Gehalte mit einer erhöhten Membranfluidität im Bereich der Fettsäureketten (Abb. 4B; Tabelle 1) sowie der hydrophilen Phospholipid-Kopfgruppen (Abb. 4C; Tabelle 1) assoziiert. Umgekehrt führt die Cholesterolbeladung in beiden Kohorten zu deutlichen Zunahmen der jeweiligen Anisotropie-Werte (Abb 4B, C; Tabelle 1), was interessanterweise insbesondere bei alten Mäusen auch auf die rekonstituierten wiederbeladenen Membranen zutrifft (Tabelle 1). Die DPH-Anisotropie-Werte von Hirnmembranen alter Mäuse sind gegenüber Membranen junger Mäuse signifikant in allen Behandlungsgruppen erhöht, wohingegen die TMA-DPH-Anisotropie im Alter sogar leicht abnimmt (Tabelle 1). Die TMA-DPH-Anisotropie liegt für beide Altersgruppen grundsätzlich höher als die korrespondierende DPH-Anisotropie.

Tabelle 1. Cholesterol-Modulation an Ganzhirnmembranen junger und alter Mäuse. Cholesterolgehalte, DPH- und TMA-DPH-Anisotropie-Werte

		Cholesterol (% von Kontrolle)	DPH Anisotropie	TMA-DPH Anisotropie
jung	K	100.00 ± 4.63	0.2168 ± 0.0024	0.2478 ± 0.0016
	D	32.28 ± 2.69***	0.2009 ± 0.0029***	0.2284 ± 0.0017***
	WB	107.68 ± 5.16	0.2187 ± 0.0026	0.2644 ± 0.0020***
	B	156.56 ± 6.30***	0.2285 ± 0.0028**	0.2644 ± 0.0017***
alt	K	100.00 ± 3.63	0.2296 ± 0.0022 ⁺⁺⁺	0.2460 ± 0.0015
	D	35.20 ± 2.38***	0.2092 ± 0.0027*** ⁺	0.2291 ± 0.0019***
	WB	106.00 ± 4.46	0.2376 ± 0.0025* ⁺⁺⁺	0.2645 ± 0.0026***
	B	128.73 ± 5.49***	0.2455 ± 0.0019*** ⁺⁺⁺	0.2683 ± 0.0014***

Mittelwerte ± SEM, n = 8-10; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 signifikant vs. Kontrolle in der gleichen Altersgruppe; ⁺p<0.05, ⁺⁺⁺p<0.001 signifikant vs. Jung in der gleichen Behandlungsgruppe (ANOVA).

Über alle Modulations-Gruppen zeigt sich in beiden Alterskohorten eine signifikante positive Korrelation von Cholesterolgehalt und DPH- bzw. TMA-DPH-Anisotropie. Diese Korrelationen sind in Abb. 5 exemplarisch für junge Mäuse dargestellt. Bei alten Mäusen waren die entsprechenden Korrelationen wie folgt spezifiziert. DPH: * $p < 0.05$, $r^2 = 0.8692$; TMA-DPH: ** $p < 0.01$, $r^2 = 0.9558$, jeweils $n = 8-10$ je Behandlungsgruppe, jeweils 5 Gruppen.

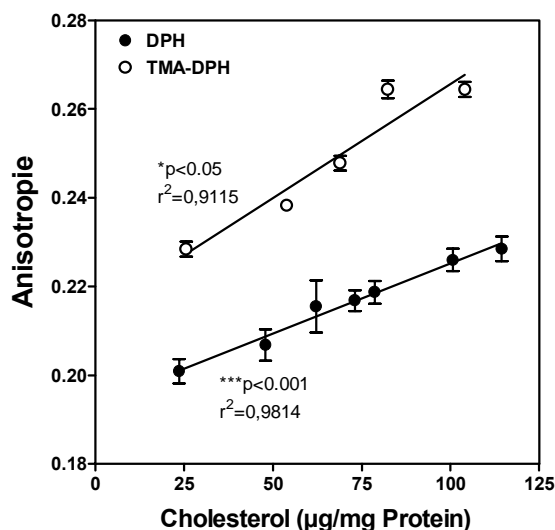


Abb. 5. Korrelation von Cholesterolgehalten verschiedener Behandlungsgruppen mit den entsprechenden DPH- und TMA-DPH-Anisotropie-Werten (Maushirn jung). Mittelwertpunkte \pm SEM; $n = 7-9$ je Gruppe. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ signifikante Korrelationen (Pearson).

3.2.1.2.2 Pyren-Fluoreszenz

Auch die Pyren-Fluoreszenz an Ganzhirnmembranen ändert sich in Abhängigkeit des membranären Cholesterolgehalts. Dabei muß man den physiologischen Alterungsprozess als „natürliche Cholesterolanreicherung“ von der externen Modulation klar abgrenzen. Die Pyren-Bulk-Fluoreszenz nimmt mit zunehmendem Alter deutlich zu, wohingegen eine externe Cholesterol-Beladung insbesondere an Membranen alter Mäuse den gegenteiligen Effekt hervorruft (Abb. 6, Abb. 7A). Umgekehrt führt eine Cholesterol-Depletion mit M β CD an Membranen alter Mäuse zu einer Zunahme der Pyren-Bulk-Fluoreszenz (Abb. 6). Die Pyren-Bulk-Fluoreszenz-Werte zeigen zudem über alle Altersgruppen für jede Behandlungsgruppe eine positive Korrelation mit den zugehörigen Cholesterol-Werten, was in Abb. 7B exemplarisch für unbehandelte Kontrollmembranen dargestellt ist. Vergleichbare Korrelationen zeigten sich auch bei der Pyren-Annular-Fluoreszenz, jedoch wurden hier keine signifikanten Behandlungseffekte beobachtet, weswegen die Werte hier nicht dargestellt sind.

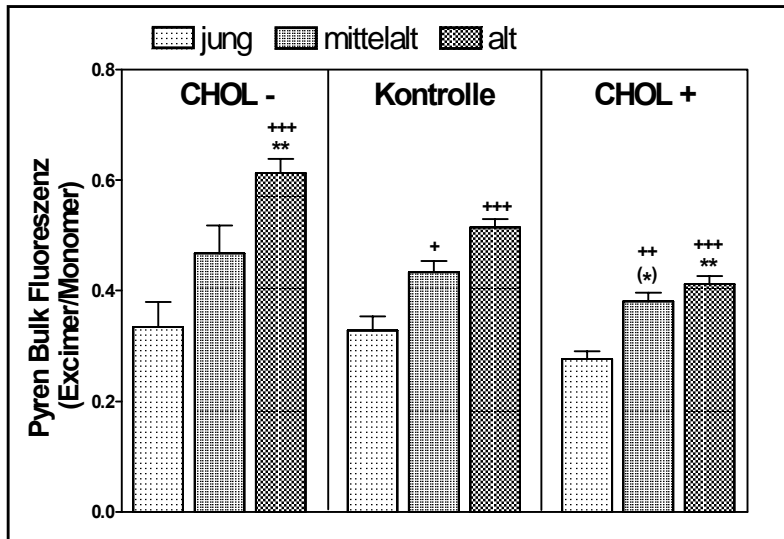


Abb. 6. Cholester-Depletion (CHOL-) und Beladung (CHOL+) an Ganzhirnmembranen junger, mittelalter und alter Mäuse: Einfluß auf die Pyren-Bulk-Fluoreszenz. Mittelwerte \pm SEM; n = 5; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 signifikant vs. Kontrolle der gleichen Altersgruppe; +p<0.05, ++p<0.01, +++p<0.001 signifikant vs. Jung in der gleichen Behandlungsgruppe. Cholester-Depletion und Beladung führten in allen Altersgruppen zu einer signifikanten Veränderung im Membrancholesterolgehalt (Daten nicht gezeigt).

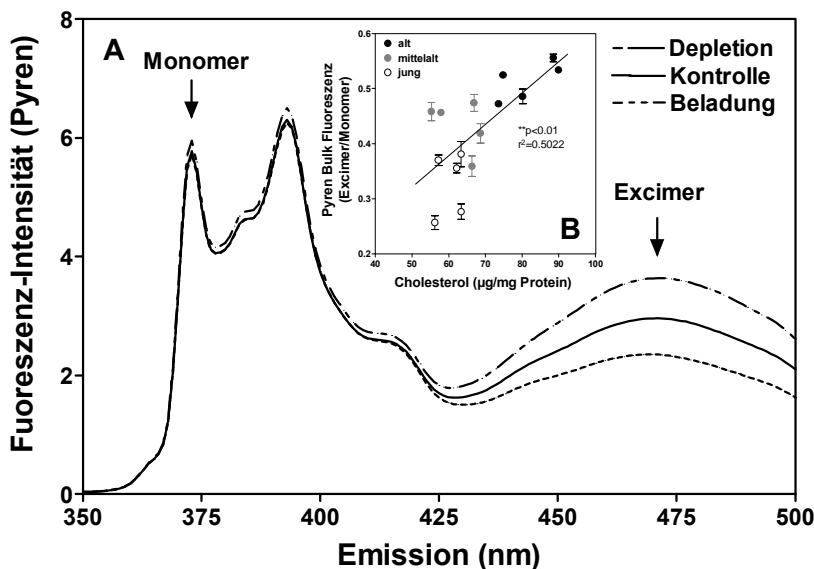


Abb. 7. A: Pyren-Mittelwertspektren (Bulk-Fluoreszenz) ohne SEM von modulierten Ganzhirnmembranen alter Mäuse (Kontrolle, Depletion, Beladung). B: Korrelation Cholesterolgehalt - Pyren-Bulk-Fluoreszenz für Kontrollen verschiedener Altersgruppen. Mittelwert \pm SEM, n = 5; **p<0.01 signifikante Korrelation (Pearson).

3.2.1.3 Einfluß auf den Membran-Amyloid-Effekt

3.2.1.3.1 DPH- und TMA-DPH-Anisotropie

Auch der Membran-Effekt von aggregiertem A β -Peptid läßt sich auf Ebene der DPH- und TMA-DPH-Anisotropie durch externe Cholester-Modulationen variieren. Grundsätzlich sind die Amyloid-Effekte auf die TMA-DPH-Anisotropie deutlich schwächer ausgeprägt als auf die DPH-Anisotropie (Abb. 8; man beachte die unterschiedliche Achsen-Skalierung). Hirnmembrane alter Mäuse sind vor allem bei hoher Peptidkonzentration wesentlich unempfindlicher gegenüber A β als Hirnmembrane von Jungtieren (Abb. 8). Durch die

Cholester-Depletion verstärkt sich der Amyloideffekt auf beide Fluoreszenzparameter, wohingegen eine Cholester-Beladung vor den Membran-perturbierenden Einflüssen von A β schützt (Abb. 8). Durch eine Wiederbeladung erzielt man keine signifikante Beeinflussung des membranären Amyloideffekts (Abb. 8).

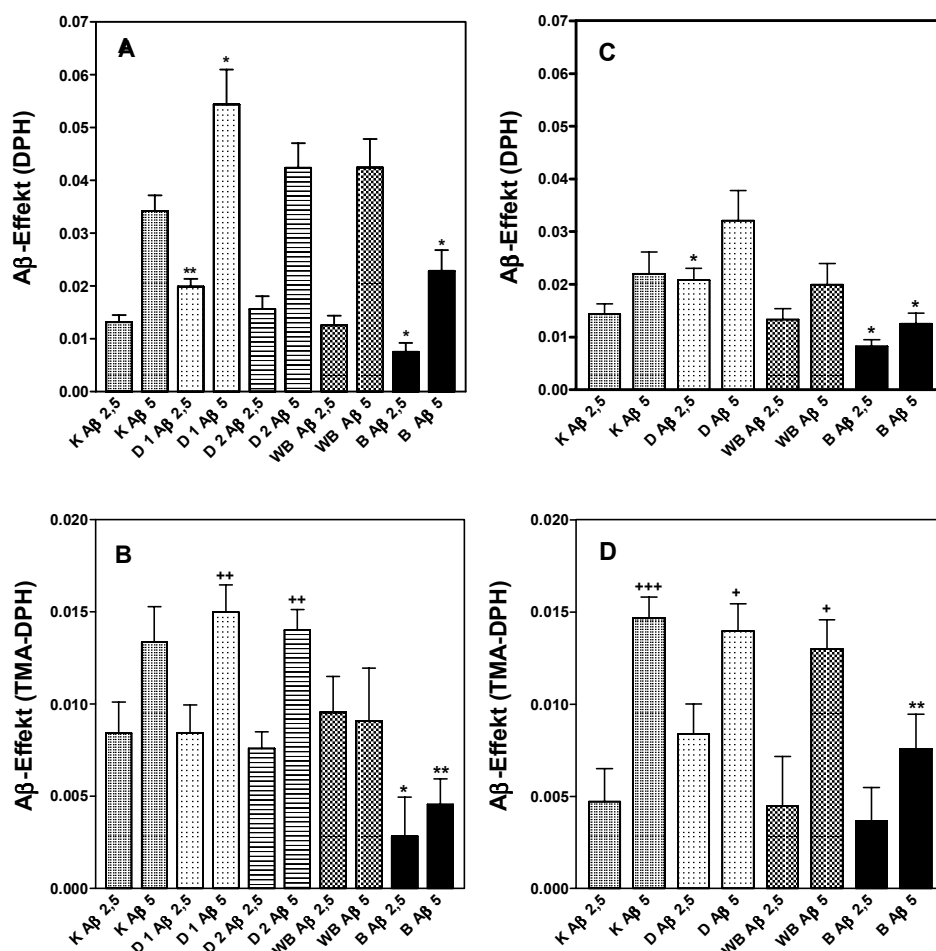


Abb. 8. Effekte von A β_{25-35} 2.5 μ mol/l und 5 μ mol/l auf die DPH- und TMA-DPH-Anisotropie von Ganzhirnmembranen junger (A,B) und alter (C,D) Mäuse. Mittelwert \pm SEM; n = 7-10 je Gruppe. *p<0.05, **p<0.01 signifikant vs. Kontrolle mit der gleichen A β -Konzentration; +p<0.05, ++p<0.01, +++p<0.001 signifikant vs. A β 2.5 μ mol/l in der gleichen Behandlungsgruppe. Die Depletion D in den Abb. 8C und 8D entspricht der Depletion D1 in den Abb. 8A und 8B.

Die einzelnen Cholesterolgehalte in den verschiedenen Behandlungsgruppen sind mit den zugehörigen Amyloideffekten negativ korreliert. Diese negativen Korrelationen waren für beide verwendeten Peptidkonzentrationen und beide Fluoreszenz-Parameter an Membranen junger und alter Mäuse evident und deuten auf einen protektiven Effekt des membranären Cholester gegenüber A β hin (Abb. 9). Beide Alterskohorten reagieren in Bezug auf die Cholester-Protektion vergleichbar sensitiv.

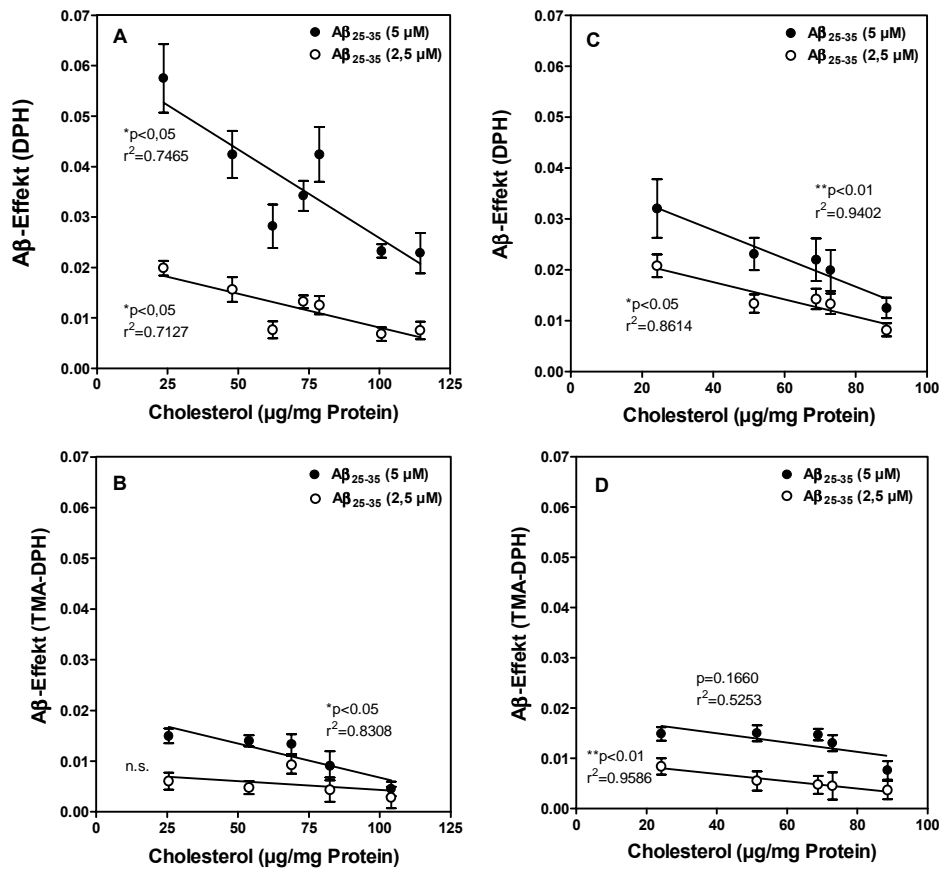


Abb. 9. Korrelation der Effekte von Aβ₂₅₋₃₅ 2.5 μmol/l und 5 μmol/l auf die DPH- und TMA-DPH-Anisotropie mit den Cholesterolgehalten von Ganzhirnmembranen junger (A,B) und alter (C,D) Mäuse für unterschiedliche Behandlungsgruppen. Mittelwertpunkte ± SEM; n = 7-10 je Gruppe. *p<0,05, **p<0,01 signifikante Korrelationen (Pearson).

3.2.1.3.2 Pyren-Fluoreszenz

Auf Ebene der Pyren-Fluoreszenz lassen sich die membranären Amyloideffekte durch die externe Cholesterol-Modulation nicht beeinflussen (Tabelle 2, Abb. 10). Die Aβ-Effekte sind zudem nur sehr marginal ausgeprägt, wobei Aβ im wesentlichen die Excimer-Bildung abschwächt (dargestellt als negativer Netto-Effekt in Tabelle 2). Eine Korrelation von Cholesterolgehalt und Amyloideffekt auf die Pyren-Bulk- und Annular-Fluoreszenz in den einzelnen Behandlungsgruppen ist für beide Alterskohorten nicht signifikant (Abb. 10).

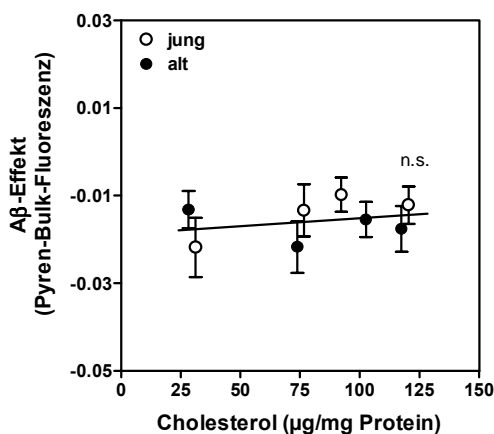


Abb. 10. Korrelation Cholesterol – Aβ-Effekt (Pyren-Bulk-Fluoreszenz). Mittelwert ± SEM; n = 12 je Behandlungsgruppe; Ganzhirnmembranen junger und alter Mäuse; Aβ₂₅₋₃₅ 5 μmol/l. Eine vergleichbare Korrelation mit den Pyren-Annular-Fluoreszenz-Werten war ebenfalls nicht signifikant (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 2. Amyloid-Effekt auf verschiedene Pyren-Fluoreszenz-Parameter

		A β -Effekt (Pyren-Bulk-Fluoreszenz)	A β -Effekt (Pyren-Annular-Fluoreszenz)
jung	K	-0.0134 \pm 0.0059	-0.0146 \pm 0.0163
	D	-0.0218 \pm 0.0068	-0.0202 \pm 0.0099
	WB	-0.0098 \pm 0.0039	0.0035 \pm 0.0153
	B	-0.0122 \pm 0.0043	0.0015 \pm 0.0120
alt	K	-0.0218 \pm 0.0059	-0.0108 \pm 0.0348
	D	-0.0132 \pm 0.0042	0.0035 \pm 0.0285
	WB	-0.0155 \pm 0.0040	-0.0446 \pm 0.0358
	B	-0.0176 \pm 0.0052	-0.0656 \pm 0.0276

Mittelwert \pm SEM, n = 12; A β ₂₅₋₃₅ 5 μ mol/l, Ganzhirnmembranen junger und alter Mäuse.

3.2.2 Cholesterol-Modulation an synaptosomalen Plasmamembranen (SPM)

3.2.2.1 Einfluß auf den Membrancholesterol-Gehalt

Auch an der reinen SPM-Fraktion läßt sich durch externe Cholesterol-Depletion und Beladung der Membrancholesterol-Gehalt nachhaltig modulieren (Abb. 11A). Dabei sind SPM bezogen auf den Proteingehalt wesentlich cholesterolreicher als die entsprechenden Ganzhirnmembranen. In Analogie zu diesen lassen sich SPM von alten Mäusen nur noch in sehr geringem Ausmaß mit externem Cholesterol anreichern, da sie *per se* im Vergleich zu anderen Alterskohorten bereits den höchsten nativen Cholesterolgehalt aufweisen (Abb. 11A).

3.2.2.2 Einfluß auf verschiedene Membranfluiditäts-Parameter

3.2.2.2.1 DPH- und TMA-DPH-Anisotropie

Die DPH- und TMA-DPH-Anisotropie-Werte von Cholesterol-depletierten SPM sind im Vergleich zu Kontrollmembranen in den verschiedenen Altersgruppen erniedrigt, die von beladenen SPM signifikant erhöht (Abb. 11B, C). Die DPH-Anisotropie von Kontrollmembranen alter Mäuse ist im Vergleich zur DPH-Anisotropie von SPM mittelalter Mäuse erhöht, bei der TMA-DPH-Anisotropie verhält es sich gerade umgekehrt (Abb. 11 B, C). Grundsätzlich liegen die TMA-DPH-Werte wieder deutlich über den korrespondierenden DPH-Werten.

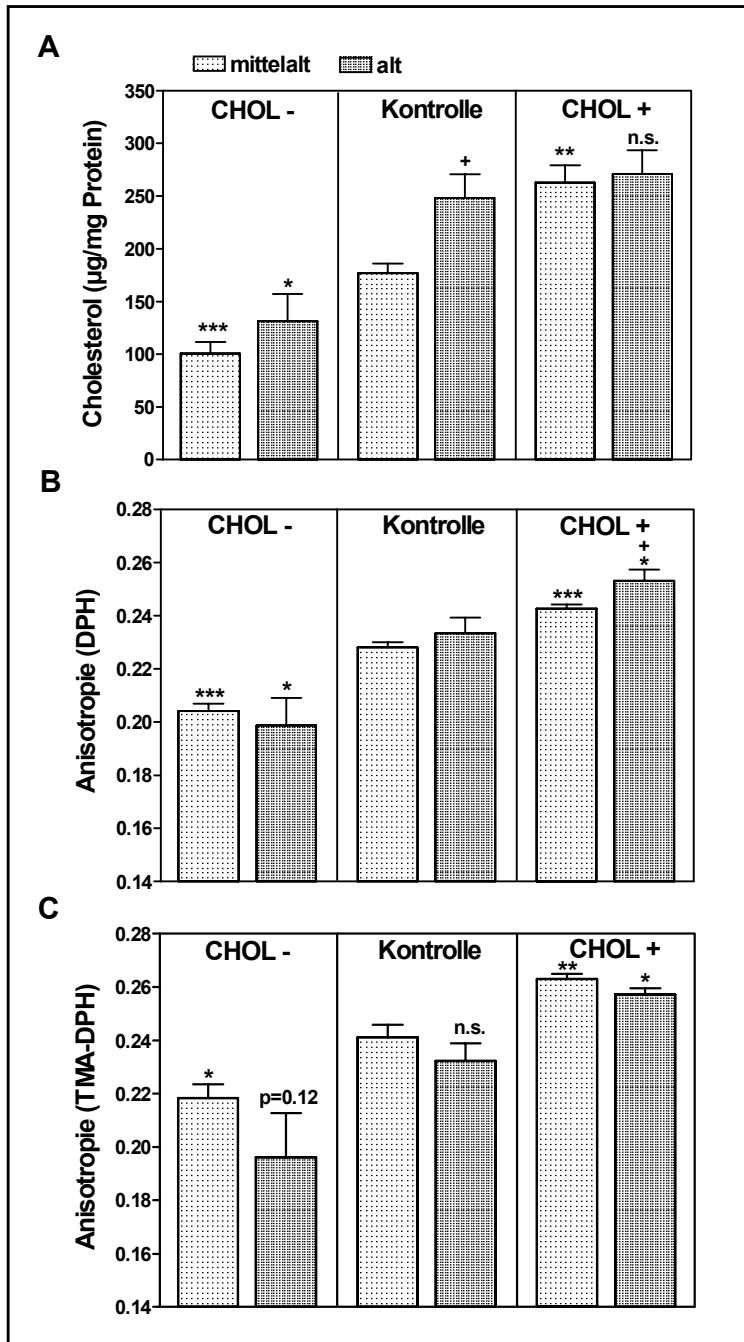
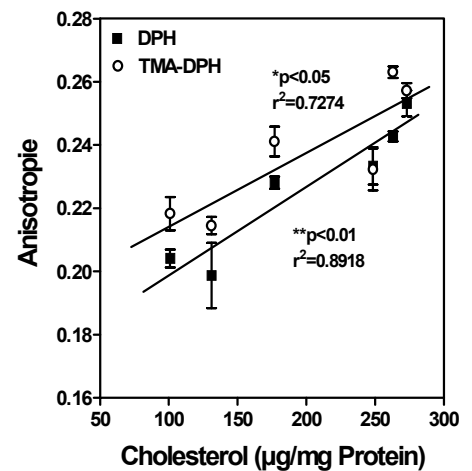


Abb. 11. (links). Cholester-Modulation an SPM mittelalter und alter Mäuse: Einfluß auf den Cholesterolgehalt (A), die DPH- (B) und die TMA-DPH-Anisotropie (C). CHOL- = Depletion, CHOL+ = Beladung; Mittelwerte ± SEM; n = 5 (a 5 Hirne); *p<0.05, ***p<0.001 signifikant vs. Kontrolle der gleichen Altersgruppe; +p<0.05 signifikant vs. Mittelalt in der gleichen Behandlungsgruppe; p = 0.12 nicht signifikant vs. Kontrolle alt.

Abb. 12. (unten). Korrelation von Cholesterolgehalt und DPH- bzw. TMA-DPH-Anisotropie von SPM mittelalter und alter Mäuse. In den Korrelationen sind beide Altersgruppen jeweils zusammengefaßt. Mittelwert ± SEM; n = 4-5 (a 5 Hirne) je Behandlungsgruppe; *p<0.05, **p<0.01 signifikante Korrelation (Pearson).



Die DPH- und TMA-DPH-Anisotropie-Werte der unterschiedlichen Modulationsgruppen korrelieren auch hier für beide Altersgruppen signifikant mit den korrespondierenden SPM-Cholesterolgehalten (Abb. 12).

3.2.2.2.2 Pyren-Fluoreszenz

An Cholesterol-modulierten SPM verhält sich die Pyren-Bulk-Fluoreszenz anders als an den entsprechenden Ganzhirnmembranen (siehe 4.3). Hier bedingt die Cholesterol-Depletion tendentiell eine Abnahme der Excimer-Fluoreszenz, die Beladung eine Zunahme, wobei diese Effekte an SPM alter Mäuse am stärksten ausgeprägt sind und mit den zugehörigen Membran-Cholesterolwerten korrelieren (Abb. 13). Die externe Cholesterol-Anreicherung weist in diesem Fall somit gleichartige Effekte auf die Pyren-Fluoreszenz auf wie der Alterungsprozess *per se*, der an SPM von Mäusen ebenfalls zu erhöhten Excimer/Monomer-Ratios führt (Eckert et al., 2001). Auf Ebene der Pyren-Annular-Fluoreszenz sind die Modulations-Tendenzen an SPM alter Mäuse schwächer ausgeprägt, wengleich auch hier die Cholesterolgehalte mit den Excimer/Monomer-Ratios über die Behandlungsgruppen korrelieren (Abb. 14)

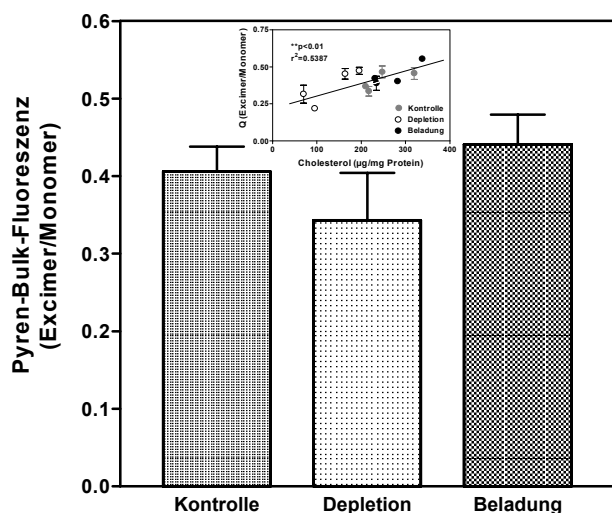


Abb. 13. Pyren-Bulk-Fluoreszenz an Cholesterol-modulierten SPM alter Mäuse. Mittelwert \pm SEM; n = 4-5 (a 5 Hirne); **p<0.01 signifikante Korrelation (Pearson); Q = Ratio.

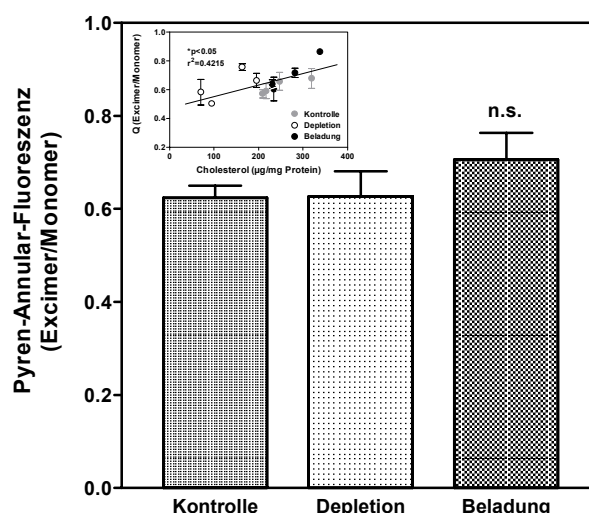


Abb. 14. Pyren-Annular-Fluoreszenz an Cholesterol-modulierten SPM alter Mäuse. Mittelwert \pm SEM; n = 4-5 (a 5 Hirne); *p<0.05 signifikante Korrelation (Pearson); Q = Ratio.

3.2.2.3 Einfluß auf den Membran-Amyloid-Effekt

3.2.2.3.1 DPH- und TMA-DPH-Anisotropie

Der Amyloideffekt auf die DPH- und TMA-DPH-Anisotropie von SPM mittelalter und alter Mäuse läßt sich durch Cholesterol-Depletion verstärken, durch Cholesterol-Beladung

abschwächen, wobei der A β -Effekt auf die TMA-DPH-Anisotropie absolut gesehen deutlich schwächer ausgeprägt ist als der entsprechende Effekt auf die DPH-Anisotropie (Abb. 15 A, B; Tabelle 3). Für beide Anisotropie-Parameter ergeben sich zudem negative Korrelationen von Cholesterolgehalt und A β -Effekt über die einzelnen Modulationsgruppen der beiden Alterskohorten, was auch an dieser Membranpräparation auf einen protektiven Cholesteroleinfluß gegenüber dem membranären Amyloid-Effekt hindeutet (Abb 16 A, B). Signifikante negative Korrelationen ergeben sich auch, wenn man die DPH- und TMA-DPH-Anisotropiewerte mit den zugehörigen Amyloid-Effekten in allen Behandlungsgruppen in Beziehung setzt. Abb. 17 zeigt dies exemplarisch für die DPH- und TMA-DPH-Anisotropie an SPM mittelalter Mäuse.

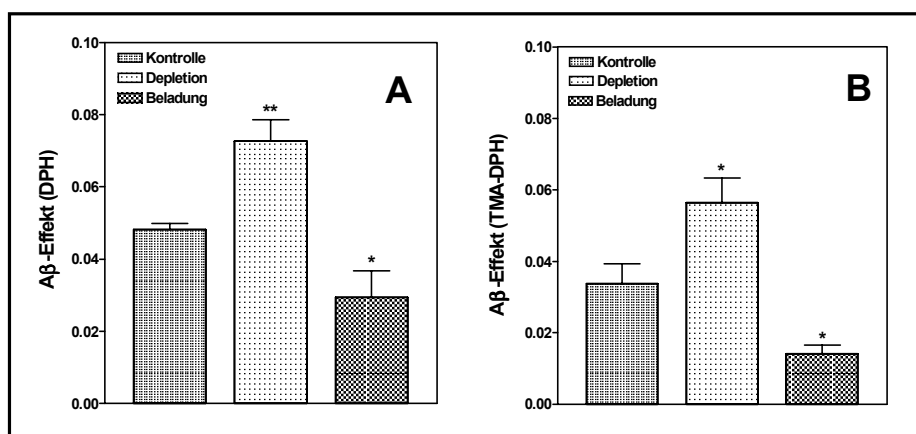


Abb. 15. A β -Effekt auf die DPH- (A) und TMA-DPH-Anisotropie (B) von Cholesterol-modulierten SPM mittelalter Mäuse; Mittelwert \pm SEM; n = 5 (a 5 Hirne); *p<0.05, **p<0.01 signifikant vs. Kontrolle (t-Test); A β_{1-42} 1 μ mol/l.

Tabelle 3. A β -Effekt auf die DPH- und TMA-DPH-Anisotropie von Cholesterol-modulierten SPM mittelalter und alter Mäuse

		A β -Effekt (DPH)	A β -Effekt (TMA-DPH)
mittelalt	K	0.0482 \pm 0.0017	0.0337 \pm 0.0055
	D	0.0726 \pm 0.0060**	0.0564 \pm 0.0070*
	B	0.0294 \pm 0.0074*	0.0141 \pm 0.0025*
alt	K	0.0381 \pm 0.0069	0.0196 \pm 0.0062
	D	0.0569 \pm 0.0089 ⁺	0.0318 \pm 0.0121
	B	0.0307 \pm 0.0033	0.0095 \pm 0.0020

Mittelwert \pm SEM, n = 5; A β_{1-42} 1 μ mol/l; *p<0.05, **p<0.01 signifikant vs. Kontrolle der gleichen Altersgruppe, ⁺p = 0.14 vs. Kontrolle der gleichen Altersgruppe (ANOVA).

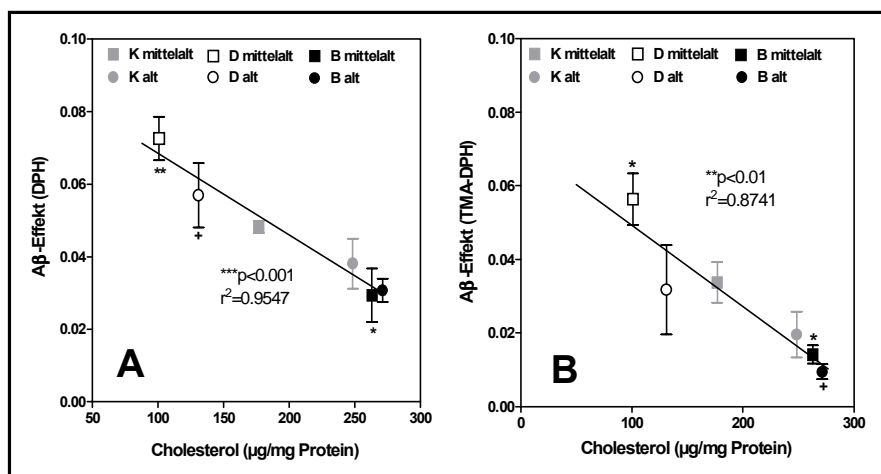


Abb. 16. Korrelation von Cholesterolgehalt und A β -Effekt auf die DPH- (A) und TMA-DPH-Anisotropie (B) von Cholesterolmodulierten SPM mittelalter und alter Mäuse über alle Behandlungsgruppen. Mittelwert \pm SEM; n = 4-5 (a 5 Hirne); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ signifikant vs. Kontrolle mittelalt (t-Test); $^+p = 0.14$ (A) bzw. $^+p = 0.17$ (B) vs. Kontrolle alt; A β_{1-42} 1 $\mu\text{mol/l}$. A, B: Signifikante Korrelationen (Pearson).

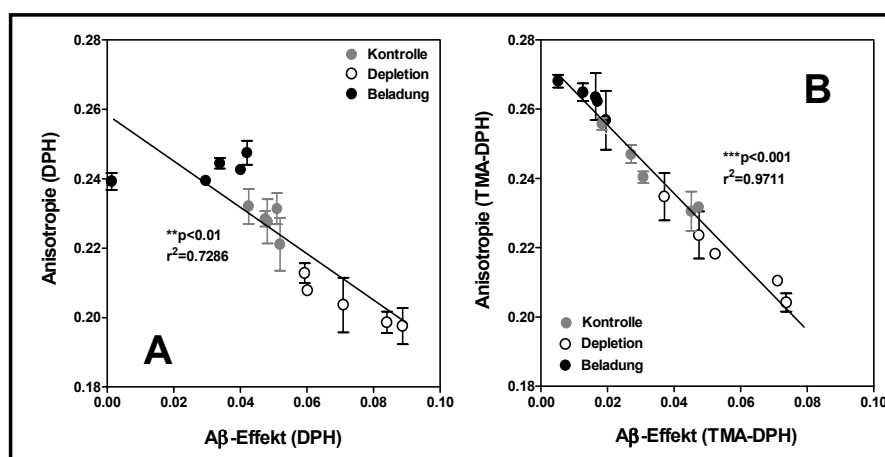


Abb. 17. Korrelation von DPH-Anisotropie und A β -Effekt (DPH) (A) bzw. von TMA-DPH-Anisotropie und A β -Effekt (TMA-DPH) (B) an Cholesterolmodulierten SPM mittelalter Mäuse über alle Behandlungsgruppen. Mittelwert \pm SEM; n = 5 (a 5 Hirne); A β_{1-42} 1 $\mu\text{mol/l}$. A, B: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ signifikante Korrelationen (Pearson).

3.2.2.3.2 Pyren-Fluoreszenz

Auf Ebene der Pyren-Fluoreszenz zeigen sich wiederum nur sehr gering ausgeprägte A β -Effekte, die sich zudem durch die externe Cholesterol-Veränderung nur schwach modulieren lassen (Tabelle 4) und insofern für beide Fluoreszenz-Parameter nicht signifikant mit den zugehörigen Cholesterolverwerten der einzelnen Modulations-Gruppen korreliert sind (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 4. A β -Effekt auf die Pyren-Bulk- und Annular-Fluoreszenz von Cholesterol-modulierten SPM mittelalter und alter Mäuse

		A β -Effekt (Pyren-Bulk-Fluoreszenz)	A β -Effekt (Pyren-Annular-Fluoreszenz)
mittelalt	K	-0.0090 \pm 0.0029	-0.0380 \pm 0.0183
	D	-0.0262 \pm 0.0191	-0.0906 \pm 0.0401
	B	0.0164 \pm 0.0078*	0.0024 \pm 0.0212
alt	K	0.0286 \pm 0.0235	0.0146 \pm 0.0279
	D	-0.0093 \pm 0.0186	-0.0358 \pm 0.0124
	B	-0.0209 \pm 0.0217	-0.0785 \pm 0.0474

Mittelwert \pm SEM, n = 4-5; A β_{1-42} 1 μ mol/l; *p<0.05 signifikant vs. Kontrolle der gleichen Altersgruppe (ANOVA).

3.2.3 Cholesterol-Modulation an Synaptosomen

Bei diesen Versuchen wurde die Cholesterol-Modulation verbunden mit einem TNBS- Labelling bereits auf Stufe der Synaptosomen durchgeführt. Aus den derart vorbehandelten Synaptosomen wurden dann SPM präpariert, um zu untersuchen, welchen Einfluß die Cholesterol-Depletion und -Beladung auf einzelne Membranleaflet-Parameter von SPM nehmen.

3.2.3.1 Einfluß auf den Membrancholesterol-Gehalt und die Leaflet-Cholesterolverteilung

M β CD (1.6 μ mol/mg Protein) depletiert Cholesterol signifikant nur im exofacialen Membranblatt, ohne das cytofaciale Leaflet nennenswert zu beeinflussen (Abb. 18 A). Bei der Cholesterol-Beladung (0.4 μ mol Cholesterol/mg Protein) verhält es sich analog. Hier wird exklusiv das exofaciale Membranblatt mit Cholesterol angereichert, der Cholesterolgehalt im cytofacialen Blatt bleibt unverändert (Abb. 18 C). Tabelle 5 faßt die wesentlichen Cholesterol-Modulationseffekte zusammen.

Die externe Cholesterol-Beladung induziert dabei auf Leaflet-Ebene die gleichen membranären Cholesterol-Verschiebungen wie der physiologische Alterungsprozess. Im Alter lagern Membranen zusätzliches Cholesterol ein. Diese Einlagerung findet im exofacialen Membranblatt statt (Abb. 19 A) (Igbavboa et al., 1996). In diesem Meß-Set lagen die

Gesamtgehalte an freiem SPM-Cholesterol in $\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein für Jungtiere bei 190.70 ± 9.47 und für alte Mäuse bei 238.00 ± 15.04 (* $p < 0.05$ vs. Jung, Mittelwert \pm SEM, $n = 5$).

3.2.3.2 Einfluß auf die Gesamt- und Leaflet-DPH-Anisotropie

Die durch M β CD bedingte Cholesterol-Reduktion im äußeren Membranblatt bedingt eine signifikante Abnahme der DPH-Anisotropie im exofacialen Leaflet, die gleichfalls ursächlich für die Senkung der DPH-Gesamtanisotropie in der Depletionsgruppe im Vergleich zur Kontrolle ist (Abb. 18 B).

An exofacial beladenen SPM weist das äußere Leaflet im Vergleich zum Kontroll-Leaflet unbehandelter SPM eine signifikant erhöhte DPH-Anisotropie auf. Auch die Anisotropie im cytofacialen Blatt nimmt durch die Cholesterol-Beladung leicht zu, so dass wohl beide Effekte an der in Relation zur Kontrolle erhöhten Membran-Gesamtanisotropie beteiligt sind (Abb. 18 D).

Vergleichbare Fluiditäts-Änderungen sind wiederum im Alt-Jung-Vergleich zu beobachten. Sämtliche DPH-Anisotropie-Werte von SPM alter Mäuse sind analog der Beladung gegenüber den entsprechenden Werten von SPM junger Mäuse signifikant erhöht (Abb. 19 B). Dabei weist das cytofaciale Leaflet infolge seines hohen Cholesterolgehalts grundsätzlich signifikant höhere DPH-Anisotropie-Werte im Vergleich zur Gesamtanisotropie und zur Anisotropie des exofacialen Membranblattes auf (Abb. 18, 19).

Tabelle 5. Leaflet-Effekte der Cholesterol-Modulation an SPM mittelalter Mäuse

		% Quenchung (DPH)	% Cholesterol		Ratio (% Cholesterol exofacial/cytofacial)
			cytofacial	exofacial	
Set 1	K	45.49 ± 2.20	72.05 ± 1.34	$27.95 \pm 1.34^{***}$	0.412 ± 0.042
	CHOL -	47.07 ± 1.74	79.42 ± 3.08	$20.58 \pm 3.08^{***+}$	0.267 ± 0.049
Set 2	K	50.15 ± 0.07	76.24 ± 3.81	$23.76 \pm 3.81^{***}$	0.323 ± 0.073
	CHOL+	50.10 ± 0.44	63.61 ± 5.75	$36.39 \pm 5.75^*$	0.608 ± 0.131

Mittelwert \pm SEM, $n = 4-5$ (a 5 Hirne); * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ signifikant vs. Cholesterol cytofacial in der gleichen Behandlungsgruppe; $^+p = 0.06$ vs. Cholesterol exofacial Kontrolle (K) Set 1; CHOL- = Depletion, CHOL+ = Beladung; Gesamtgehalte an freiem SPM-Cholesterol in $\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein (Mittelwert \pm SEM): Set 1: Kontrolle 230.70 ± 9.83 , Depletion 201.10 ± 9.78 (* $p < 0.05$); Set 2: Kontrolle 218.80 ± 6.31 , Beladung 254.10 ± 11.24 (* $p < 0.05$, t-Test).

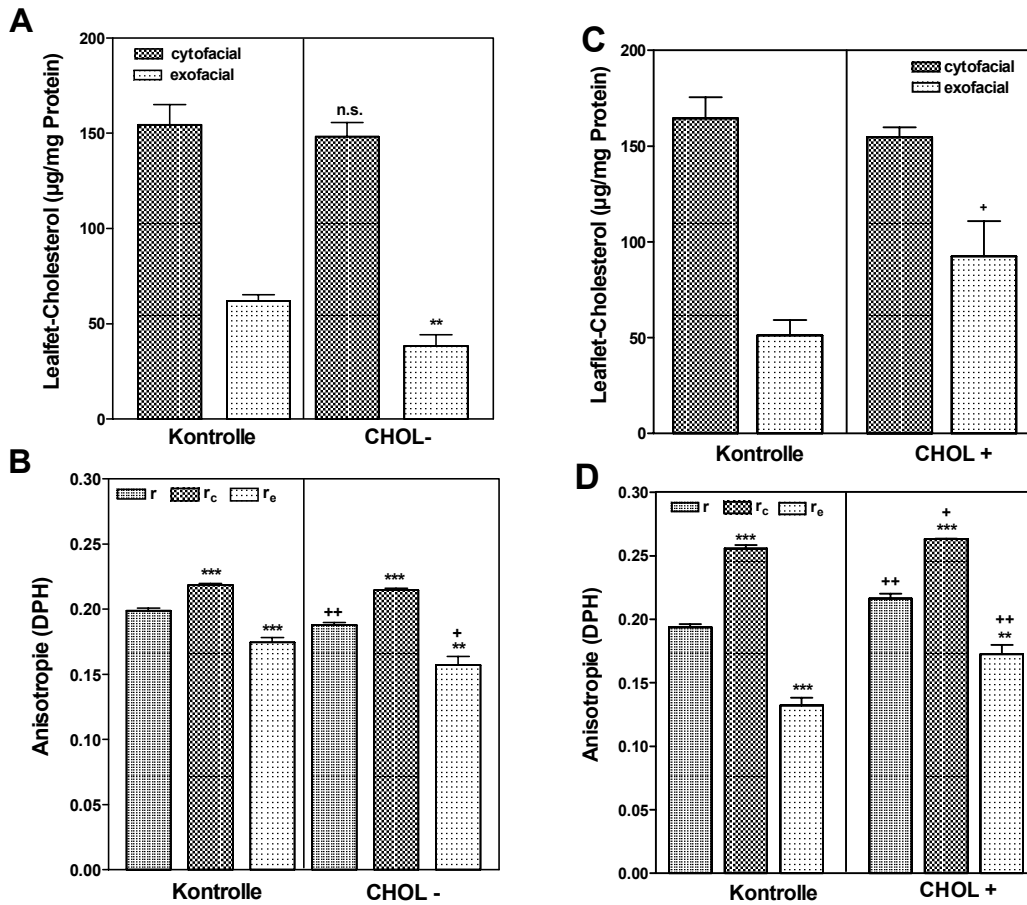


Abb. 18. Leaflet-Parameter Cholesterol-depletierter (CHOL-, A,B) und Cholesterol-beladener (CHOL+, C,D) SPM mittelalter Mäuse. A,C: Leaflet-Cholesterol-Gehalt, B,D: Leaflet-DPH-Anisotropie. Mittelwert ± SEM; n = 5 (a 5 Hirne); A: **p<0.01 signifikant vs. Kontrolle exofacial (t-Test); C: †p = 0.08 vs. Kontrolle exofacial (t-Test); B,D: **p<0.01, ***p<0.001 signifikant vs. r der gleichen Behandlungsgruppe; †p<0.05, ††p<0.01 signifikant vs. gleichem Anisotropie-Wert der Kontrolle (t-Test). r = Gesamtanisotropie, r_c = Anisotropie cytofacial, r_e = Anisotropie exofacial.

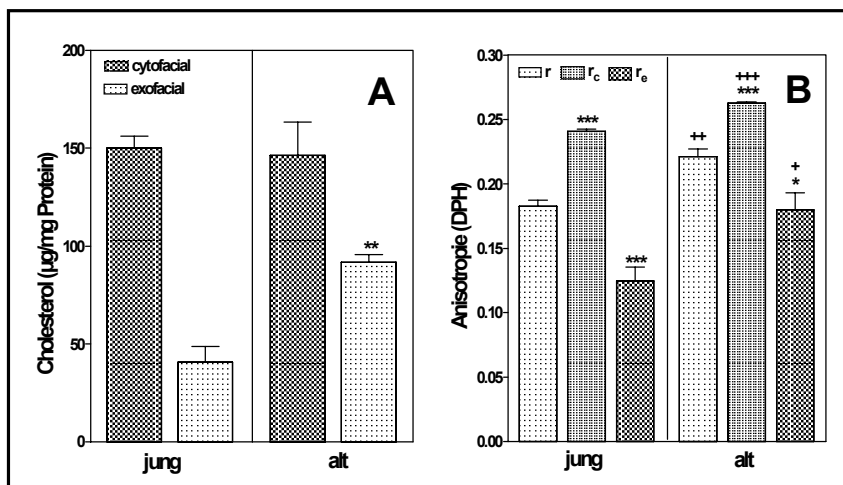


Abb. 19. Leaflet-Cholesterolgehalte (A) und Leaflet-Anisotropien (DPH) (B) von SPM junger und alter Mäuse. Mittelwert ± SEM; n = 4-5 (a 5 Hirne). A: **p<0.05 signifikant vs. Jung exofacial (t-Test); B: *p<0.05, **p<0.01 signifikant vs. r der gleichen Altersgruppe, †p<0.05, ††p<0.01 signifikant vs. gleichem Anisotropiewert bei jungen Mäusen. Es gelten die Abk. aus Abb. 18. Die Quotienten r_e/r_c liegen wie folgt: Jung: 0.5188 ± 0.0478, Alt: 0.6852 ± 0.0506* (*p = 0.05 vs. Jung, t-Test).

3.2.3.3 Einfluß auf den Gesamt- und Leaflet-Amyloid-Effekt (DPH)

Auch der A β -Membraneffekt gliedert sich in eine cytofaciale und eine exofaciale Komponente auf, wobei der Effekt im cholesterolarmen äußeren Blatt am stärksten ausgeprägt ist (Abb. 20). Durch M β CD-Behandlung läßt sich der exofaciale Amyloideffekt weiter erhöhen, wohingegen der cytofaciale Effekt unverändert bleibt (Abb. 20). Umgekehrt senkt eine Cholesterol-Beladung exklusiv den A β -Effekt auf das exofaciale Membranblatt und damit auch den Gesamt-Amyloideffekt (Daten nicht gezeigt). Die absoluten Leaflet-Cholesterolgehalte sind dabei über die einzelnen Behandlungsgruppen zum einen positiv mit den zugehörigen DPH-Leaflet-Anisotropie-Werten korreliert (** $p < 0.001$, Daten nicht gezeigt), zum anderen ergibt sich eine signifikante negative Korrelation dieser Cholesterolwerte mit den zugehörigen Leaflet-Amyloid-Effekten (DPH) im jeweiligen Membranblatt. Dies ist in Abb. 21 exemplarisch für Kontroll- und Cholesterol-beladene SPM gezeigt.

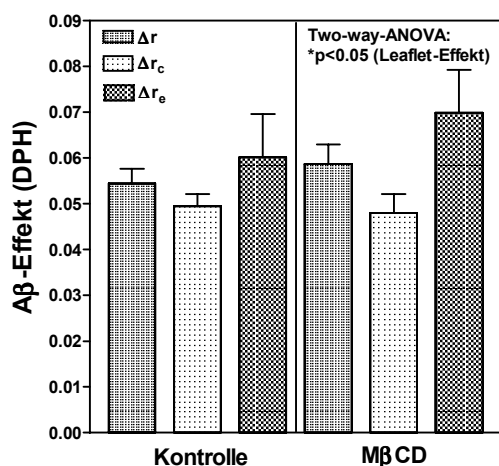


Abb. 20. Leaflet A β -Effekt (DPH) an Kontroll- und Cholesterol-depletierten SPM mittelalter Mäuse. Mittelwert \pm SEM; $n = 4-5$ (a 5 Hirne). Dargestellt sind die Netto-Effekte als delta-Werte (es gelten die Abk. aus Abb. 18). A β_{1-42} 1 $\mu\text{mol/l}$. Two-Way-ANOVA: * $p < 0.05$ (Leaflet-Effekt).

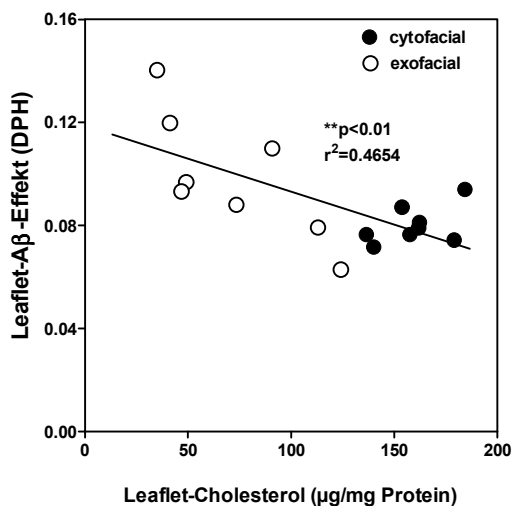


Abb. 21. Korrelation des Leaflet-A β -Effekts (DPH) mit den zugehörigen absoluten Leaflet-Cholesterolwerten in Kontroll- und Cholesterol-beladenen SPM mittelalter Mäuse. Mittelwertpunkte ohne SEM, $n = 4-5$ (a 5 Hirne). A β_{1-42} 1 $\mu\text{mol/l}$; ** $p < 0.01$ signifikante Korrelation (Pearson).

Im Alt-Jung-Vergleich sind die Gesamt- und Leaflet-Amyloideffekte zwar absolut gesehen an SPM alter Mäuse gegenüber Jungtieren signifikant erniedrigt, jedoch bleibt die Relation der Leaflet-Effekte zueinander unverändert (Tabelle 6). Auch im Alt-Jung-Vergleich zeigt sich die oben erwähnte positive Korrelation zwischen Leaflet-Cholesterolgehalten und DPH-Leaflet-Anisotropie-Werten (**p<0.001, $r^2 = 0.7283$, n = 4-5, Daten nicht gezeigt).

Tabelle 6. A β -Leaflet-Effekte (DPH) an SPM junger und alter Mäuse

		A β -Effekt (DPH)
jung	r	0.0679 \pm 0.0040
	r _c	0.0615 \pm 0.0046
	r _e	0.0740 \pm 0.0033
alt	r	0.0486 \pm 0.0056*
	r _c	0.0384 \pm 0.0050*
	r _e	0.0588 \pm 0.0108

Mittelwert \pm SEM; n = 4-5 (a 5 Hirne); A β ₁₋₄₂ 1 μ mol/l; *p<0.05 signifikant vs. gleichem Anisotropiewert von SPM junger Mäuse; r = DPH-Gesamt-Anisotropie, r_c = cytofaciale DPH-Anisotropie, r_e = exofaciale DPH-Anisotropie.

3.2.4 Sphingomyelin-Modulation an Synaptosomen

Die Sphingomyelin-Degradation und das TNBS-Labeling wurden auch hier an Synaptosomen durchgeführt, aus denen im folgenden SPM präpariert wurden.

3.2.4.1 Einfluß auf den Membrancholesterol-Gehalt und die Leaflet-Cholesterolverteilung

In diesem Versuchs-Set nahm die Sphingomyelinase-Behandlung keinen signifikanten Einfluß auf den Gesamtgehalt an freiem Cholesterol in den SPM, induzierte aber Veränderungen in der Membran-Cholesterolverteilung (Tabelle 7).

3.2.4.2 Einfluß auf die Gesamt- und Leaflet-DPH-Anisotropie

Die Sphingomyelin-Degradation führt tendentiell zu einem Anstieg der einzelnen DPH-Anisotropie-Parameter im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen, ohne daß diese Effekte jedoch statistische Signifikanz erlangen (Tabelle 7).

Tabelle 7. Einfluß der Sphingomyelin-Degradation auf einzelne Leaflet-Parameter von SPM mittelalter Mäuse

	Cholesterol ($\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein)	% Cholesterol		Anisotropie (DPH)		
		cytofacial	exofacial	r	r_c	r_e
Kontrolle	177.90 \pm 2.16	70.54 \pm 3.06	29.46 \pm 3.06 ⁺⁺⁺	0.1891 \pm 0.0060	0.2205 \pm 0.0324	0.1221 \pm 0.0129 ^{**}
SMase	193.80 \pm 13.58	78.73 \pm 2.12	21.27 \pm 2.12 ⁺⁺⁺	0.1911 \pm 0.0031	0.2496 \pm 0.0062 ^{**}	0.1340 \pm 0.0025 ^{***}

Mittelwert \pm SEM, n = 4 (a 5 Mäuse); ⁺⁺⁺p<0.001 signifikant vs. Cholesterol cytofacial (t-Test); ^{**}p<0.01, ^{***}p<0.001 signifikant vs. r in der gleichen Behandlungsgruppe (t-Test), SMase = Sphingomyelinase 50 mU/mg Protein; r = DPH-Gesamt-Anisotropie, r_c = cytofaciale DPH-Anisotropie, r_e = exofaciale DPH-Anisotropie.

3.2.4.3 Einfluß auf den Gesamt- und Leaflet-Amyloid-Effekt (DPH)

Durch die Sphingomyelinase-Behandlung werden die Unterschiede zwischen exofaciale und cytofaciale Amyloid-Effekt tendentiell nivelliert (Abb. 22). Auf den A β -Gesamteffekt und die A β -Leaflet-Effekte bezogen zeigt sich kein signifikanter Behandlungseffekt (Abb. 22).

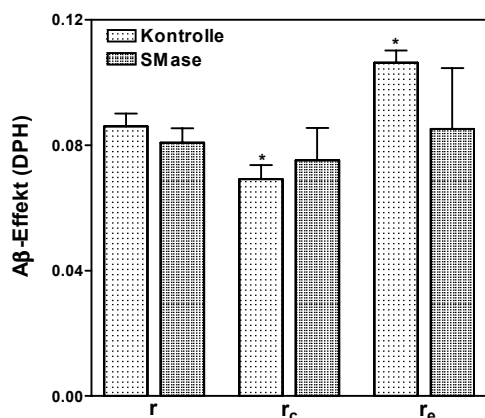


Abb. 22. Einfluß der Sphingomyelinase- (SMase) Behandlung auf den membranären Amyloid-Effekt (DPH) an SPM mittelalter Mäuse. Mittelwert \pm SEM; n = 4 (a 5 Hirne); A β_{1-42} 1 $\mu\text{mol}/\text{l}$; *p<0.05 signifikant vs. r der Kontrolle. Es gelten die Abk. aus Abb. 18.

3.3 *In vitro* Cholesterol-Modulation an Gesamtmembran-Fractionen von PC12-Zellen

Im Rahmen von Cytotoxizitäts-Untersuchungen an PC12-Zellen mit Hilfe des MTT- und LDH-Assays wurden die Zellen mit verschiedenen Cholesterol- und M β CD-Konzentrationen über 24 Stunden inkubiert (Leutz, 2001) und anschließend in den beiden Zell-Assays

untersucht. Gleichfalls wurden die Cholesterolgehalte der behandelten Zellen quantifiziert und Membranfluiditäts-Messungen mit den Fluoreszenzsonden DPH und Pyren durchgeführt.

3.3.1 Einfluß auf den Membrancholesterol-Gehalt

In Analogie zu den Versuchen an Maushirn-Membran-Präparationen läßt sich auch der Gesamtmembran-Cholesterolgehalt von PC12-Zellen durch externe Cholesterol-Modulation konzentrationsabhängig variieren, wobei die Beladungseffekte hier wesentlich deutlicher ausgeprägt sind als die Depletionseffekte (Abb. 23 A). Signifikante Cholesterol-Reduktionen wurden nur für die höchste eingesetzte M β CD-Konzentration beobachtet (Abb. 23 A).

3.3.2 Einfluß auf verschiedene Membranfluiditäts-Parameter

Die Änderungen im membranären Gehalt an freiem Cholesterol sind wiederum assoziiert mit Veränderungen der physikochemischen Membraneigenschaften (Abb. 23 B). Mit steigendem Cholesterolgehalt nimmt die DPH-Anisotropie zu, mit fallendem nimmt sie ab. Die DPH-Anisotropiewerte für die jeweils höchste Cholesterol- und M β CD-Konzentration deuten allerdings darauf hin, daß unter diesen Inkubationsbedingungen die Membran in ihrer funktionalen Integrität bereits nachhaltig gestört zu sein scheint (Abb. 23 B, Pfeilmarkierung). Insgesamt zeigt sich eine hoch signifikante positive Korrelation zwischen Cholesterolgehalten und zugehörigen Anisotropie-Werten über die beiden Behandlungsgruppen (***) $p < 0.001$, $r^2 = 0.7546$, $n = 3$; Daten nicht gezeigt).

Ein äquivalente Korrelation war für die beiden Fluoreszenz-Parameter der Pyren-Fluoreszenz nicht evident.

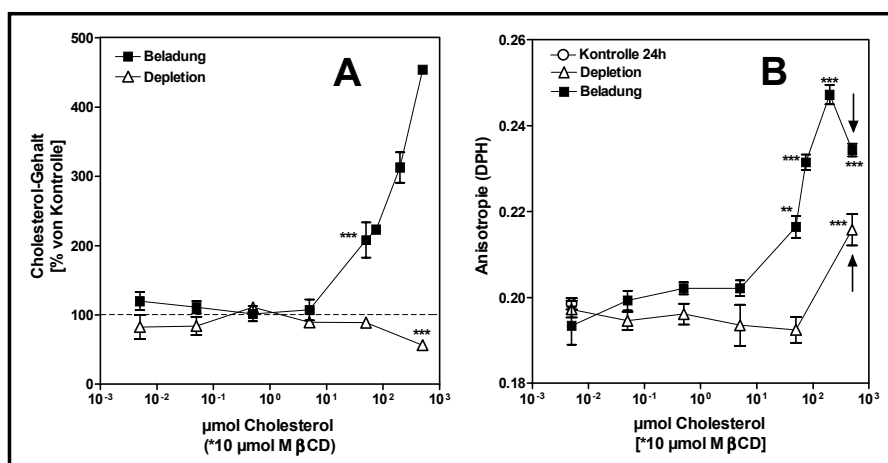


Abb. 23. Einfluß der Cholesterol-Modulation (24 h Inkubation) auf den Cholesterolgehalt (A) und die DPH-Anisotropie (B) von Gesamtmembranen von PC12-Zellen. Mittelwert \pm SEM, $n = 3$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ signifikant vs. Kontrolle (t-Test). Diese Ergebnisse sind Teil einer Kooperation mit S. Leutz und G.P. Eckert.

3.3.3 Einfluß auf den MTT- und LDH-Assay

Der LDH-Assay gehört neben dem MTT-Assay zu den klassischen Zytotoxizitätsassays, wobei sich zuletzt Hinweise häufen, dass man mit dem MTT-Assay *keinen* Zelltod, sondern vielmehr eine definierte metabolische Zell- bzw. Transport-Aktivität erfaßt (Abe, Saito 1998, 1999a; Leutz, 2001). Zur näheren Charakterisierung beider Methoden siehe Leutz (2001). Interessanterweise treten signifikante Behandlungseffekte im LDH und MTT-Assay genau in dem Konzentrationsbereich von Cholesterol und seiner M β CD-Kontrolle auf (50 μ mol/l bzw. 500 μ mol/l; siehe Leutz, 2001), in dem auch erste signifikante Einflüsse auf den Cholesterolgehalt und die DPH-Anisotropie der behandelten Zellen manifest werden (Abb. 23 A,B). Dementsprechend läßt sich eine signifikante negative Korrelation sowohl zwischen Cholesterolgehalt und MTT-Reduktion (Abb. 24 A) als auch zwischen DPH-Anisotropie und MTT-Reduktion (Abb. 24 B) über die Behandlungsgruppen zeigen, was auf eine ursächliche Beteiligung veränderter physikochemischer Membranparameter an den beobachteten MTT-Effekten schließen läßt (Abb. 24 A, B).

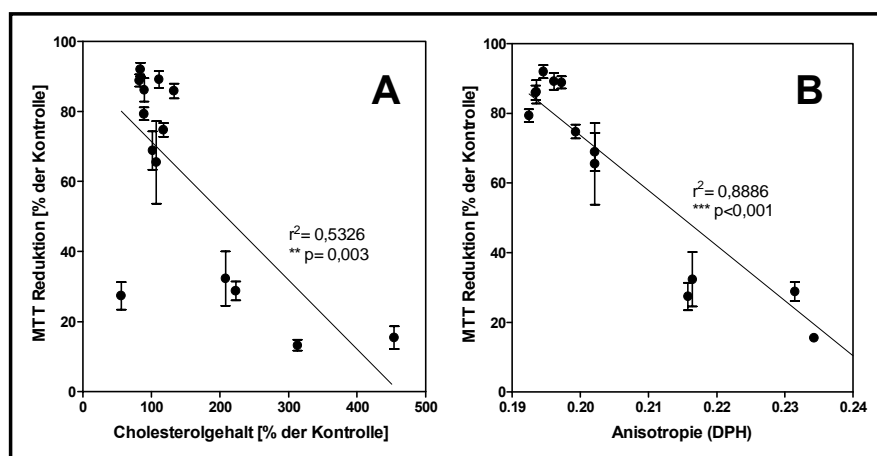


Abb. 24. Korrelation der MTT-Daten mit dem Membran-Cholesterolgehalt (A) und der DPH-Anisotropie (B) von Cholesterol-modulierten (Depletion und Beladung) Gesamtmembranen von PC12-Zellen. Mittelwert \pm SEM, n = 4-8; **p<0.01, ***p<0.001 signifikante Korrelationen (Pearson). Diese Ergebnisse sind Teil einer Kooperation mit S. Leutz und G.P. Eckert.

3.3.4 Einfluß auf den Amyloid-Effekt im MTT-Assay

Die im MTT-Assay beobachtete A β -induzierte Abnahme der MTT-Reduktion (Leutz, 2001) läßt sich in einem bestimmten Konzentrationsbereich durch Cholesterol abschwächen, d.h. die externe Cholesterol-Beladung in Form der Komplex-Verbindung mit M β CD schützt die Zelle vor den im MTT-Assay auftretenden Amyloid-Effekten (Abb. 25). Hierbei handelt es sich um einen reinen Cholesterol-Effekt, da die entsprechende M β CD-Kontrolle keinen signifikanten Einfluß im Meßsystem ausübt (Abb. 25).

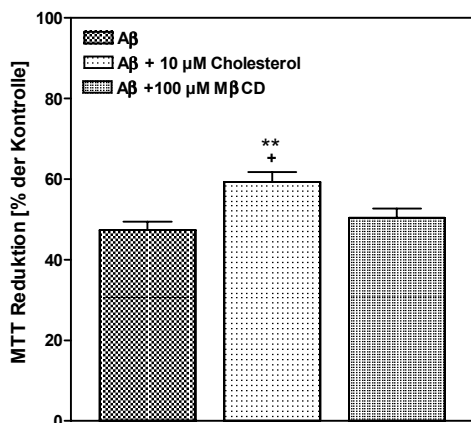


Abb. 25. Einfluß der Cholesterol-Beladung auf die A β -induzierte MTT-Reduktion. Mittelwert \pm SEM; n = 8-9; A β_{25-35} 0.1 μ mol/l (24 h Inkubation). **p<0.01 signifikant vs. A β , +p<0.05 signifikant vs. A β /M β CD (ANOVA). Cholesterol 10 μ mol/l, M β CD 100 μ mol/l (Kontrolle). Diese Ergebnisse sind Teil einer Kooperation mit S. Leutz und G.P. Eckert.

3.4 *In vivo* Behandlungsstudien mit Statinen an verschiedenen C57BL/6J-Mausstämmen

3.4.1 Einfluß von Statinen auf den Cholesterolgehalt von Leber und Serum

3.4.1.1 C57BL/6J-Mäuse

Der Statin-Einfluß auf die peripheren Cholesterolspiegel wurde in zwei unabhängigen Studien für Lovastatin, Simvastatin und Pravastatin bestimmt. Überraschenderweise senkt die subchronische Lovastatin-Behandlung den Serum-Gesamtcholesterolspiegel in jungen und mittelalten C57BL/6J-apoE^{+/+}-Mäusen *nicht* und führt in mittelalten Tieren sogar zu einem signifikanten Anstieg der Leber-Cholesterolspiegel (Tabelle 8). Dies läßt sich womöglich mit einer gegenregulatorischen Up-Regulation der HMG-CoA-Reduktase unter Statingabe erklären (Krause, Princen, 1998). Mittelalte Tiere weisen im Vergleich zu Jungtieren erhöhte Serum-Cholesterolspiegel auf (Tabelle 8). Ein leichter Anstieg des Serum-Cholesterols war an Statin-gefütterten Jungtieren im Vergleich zu Kontrollen auch für Simvastatin und Pravastatin nachweisbar. Die entsprechenden Serum-Cholesterolwerte in mg/dl lagen in dieser Studie wie folgt (Mittelwert \pm SEM, n = 4-6): Kontrolle: 43.96 \pm 1.63; Lovastatin: 49.46 \pm 2.73; Simvastatin: 49.34 \pm 3.45; Pravastatin: 52.76 \pm 5.07.

3.4.1.2 C57BL/6J-apoE-knockout-Mäuse

apoE-knockout Tiere weisen hoch signifikant erhöhte Serum- und Leber-Cholesterolspiegel im Vergleich zu gleichaltrigen apoE^{+/+}-Tieren auf (Tabelle 8). Auch an apoE-knockout-Tieren

zeigt die Lovastatin-Gabe keinen nennenswerten Effekt auf die gemessenen peripheren Cholesterolspiegel (Tabelle 8).

Tabelle 8. Effekte von Lovastatin auf den Gesamtcholesterol-Gehalt in peripheren Geweben von C57BL/6J-apoE^{+/+}-und apoE^{-/-}-Mäusen

C57BL/6J (Alter)	Gesamtcholesterol			
	Serum [mg/ dl]		Leber [μ g/mg Protein]	
	Kontrolle	Lovastatin	Kontrolle	Lovastatin
apoE ^{+/+} (1 Monat)	51.63 \pm 10.23	47.46 \pm 11.18	13.87 \pm 8.31	11.27 \pm 1.78
apoE ^{+/+} (12 Monate)	71.50 \pm 26.44	58.49 \pm 20.85	13.15 \pm 3.89	15.46 \pm 2.32**
apo E ^{-/-} (12 Monate)	363.70 \pm 67.84 ⁺⁺⁺	408.40 \pm 64.41 ⁺⁺⁺	39.23 \pm 7.33 ⁺⁺⁺	36.08 \pm 3.67 ⁺⁺⁺

Mittelwert \pm SEM; n = 5-8; **p<0.01 signifikant vs. Kontrolle der gleichen Altersgruppe, ⁺⁺⁺p<0.001 signifikant vs. mittelalten apoE^{+/+}-Mäusen in der gleichen Behandlungsgruppe (t-Test).

3.4.2 Einfluß von Statinen auf den Cholesterolgehalt und verschiedene Membranfluiditäts-Parameter von Gesamtmembranen des Cerebellums von C57BL/6J-Mäusen

3.4.2.1 Membrancholesterol

Lovastatin, Simvastatin und Pravastatin induzieren im getesteten Versuchsdesign keine signifikanten Veränderungen im Gehalt an freiem Membrancholesterol von Gesamtmembranen des Cerebellums von Jungtieren. In der Behandlungsstudie mit diesen drei Wirksubstanzen lagen die entsprechenden Membrancholesterol-Werte in μ g/mg Protein wie folgt (Mittelwert \pm SEM, n = 4-6): Kontrolle: 116.60 \pm 11.11; Lovastatin: 108.30 \pm 7.95; Simvastatin: 104.80 \pm 12.33; Pravastatin: 95.98 \pm 6.19. Für Lovastatin wurden diese Befunde in einer weiteren Studie an jungen und mittelalten C57BL/6J-Mäusen bestätigt (Tabelle 9). In Jungtieren zeigte Lovastatin keinen Einfluß auf den Cholesterolgehalt von Gesamtmembranen des Cerebellums, in Cerebelli-Membranen mittelalter Mäuse induzierte Lovastatin eine tendentielle Cholesterolsenkung (Tabelle 9). Cerebelli mittelalter Tiere weisen dabei einen signifikant erhöhten Gehalt an freiem Cholesterol im Vergleich zu Jungtieren auf (Tabelle 9).

3.4.2.2 DPH-Anisotropie

Der erhöhte Cholesterolgehalt in Gesamtmembranen von Cerebelli mittelalter Tiere äußert sich in signifikant erhöhten DPH-Anisotropie-Werten gegenüber Jungtieren (Tabelle 9). Lovastatin zeigt keinen Einfluß auf die DPH-Anisotropie von Cerebelli-Membranen junger Mäuse, erniedrigt hingegen die DPH-Anisotropie von Membranen mittelalter Tiere signifikant gegenüber Kontrollen, was sich kausal anhand der Statin-Effekte auf den Membrancholesterolgehalt in beiden Altersgruppen erklären läßt (Tabelle 9).

3.4.2.3 Pyren-Fluoreszenz

Auch die Pyren-Bulk-Fluoreszenz-Werte der Kleinhirn-Membranpräparation sind in mittelalten Mäusen gegenüber Jungtieren signifikant erhöht, wohingegen die Pyren-Annular-Fluoreszenz keinen Alters-Effekt zeigt (Tabelle 9). Auf beide Fluoreszenz-Parameter nimmt die Lovastatin-Behandlung in beiden Alterskohorten keinen signifikanten Einfluß (Tabelle 9).

Tabelle 9. Lovastatin-Einfluß auf den Cholesterolgehalt und verschiedene Fluiditäts-Parameter von Gesamtmembranen des Cerebellums junger und mittelalter Mäuse

		Cholesterol ($\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein)	DPH Anisotropie	Pyren-Fluoreszenz	
				Bulk	Annular
jung	K	87.34 ± 2.14	0.2475 ± 0.0011	0.3987 ± 0.0250	0.8761 ± 0.0349
	LOV	89.78 ± 3.56	0.2456 ± 0.0007	0.4220 ± 0.0217	0.8107 ± 0.0273
mittelalt	K	$103.10 \pm 1.48^{***}$	$0.2520 \pm 0.0004^{**}$	$0.4884 \pm 0.0184^*$	0.8713 ± 0.0399
	LOV	90.05 ± 5.68	$0.2501 \pm 0.0006^{***+}$	0.4539 ± 0.0331	0.8671 ± 0.0369

Mittelwert \pm SEM, n = 5-9; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 signifikant vs. Jung in der gleichen Behandlungsgruppe, +p<0.05 signifikant vs. mittelalt Kontrolle (K) (t-Test); LOV = Lovastatin.

3.4.3 Einfluß von Statinen auf den Cholesterolgehalt und verschiedene Membranfluiditäts-Parameter von Gesamtmembranen des Großhirns verschiedener Mäusestämme

3.4.3.1 C57BL/6J-Mäuse

3.4.3.1.1 Membrancholesterol

Lovastatin reduziert den Gehalt an freiem Membrancholesterol signifikant in Gesamtmembranen des Großhirns von jungen und mittelalten C57BL/6J-Mäusen, wobei der Absolut-Effekt in beiden Altersgruppen vergleichbar ist (Abb. 26 A). Diese Cholesterol-Reduktion wurde in zwei weiteren unabhängigen Behandlungsstudien an jungen und mittelalten Tieren reproduziert (siehe Tabelle 10). In der letzten Studie kamen dabei wie oben beschrieben drei verschiedene Statine zum Einsatz. Die entsprechenden Membran-Cholesterolwerte von Gesamtmembranen des Großhirns in $\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein lauteten in dieser Studie wie folgt (Mittelwert \pm SEM, n = 4-6): Kontrolle: 66.91 ± 3.14 ; Lovastatin: $54.52 \pm 2.82^*$; Simvastatin: $55.49 \pm 3.60^*$; Pravastatin: 65.07 ± 3.20 ; *p<0.05 signifikant vs. Kontrolle (t-Test).

Tabelle 10. Lovastatin-Effekt auf die Cholesterolgehalte und verschiedene Fluoreszenz-Parameter von Gesamtmembranen des Großhirns von mittelalten C57BL/6J-apoE^{+/+}- und apoE^{-/-}-Mäusen

mittelalt		Cholesterol ($\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein)	DPH Anisotropie	Pyren-Bulk- Fluoreszenz
apoE ^{+/+}	K	82.74 ± 2.57	0.2299 ± 0.0019	0.4281 ± 0.0311
	LOV	$73.35 \pm 2.96^*$	0.2316 ± 0.0017	$0.3009 \pm 0.0396^*$
apoE ^{-/-}	K	87.01 ± 2.13	0.2313 ± 0.0024	0.4469 ± 0.0133
	LOV	$84.67 \pm 3.18^+$	0.2303 ± 0.0021	0.4399 ± 0.0055

Mittelwert \pm SEM, n = 7-8; *p<0.05 signifikant vs. apoE^{+/+}-Kontrolle (K), ⁺p<0.05 signifikant vs. apoE^{+/+}-LOV (t-Test); LOV = Lovastatin.

3.4.3.1.2 DPH- und TMA-DPH-Anisotropie

Trotz der manifesten Cholesterol-Senkung zeigt Lovastatin in Gesamtmembranen des Großhirns von jungen und mittelalten C57BL/6J-Mäusen keinen signifikanten Effekt auf die DPH- und TMA-DPH-Anisotropie (Tabelle 10, Abb. 26 B, C). Dabei liegen die TMA-DPH-Werte in beiden Altersgruppen wieder deutlich über den entsprechenden DPH-Werten. Gesamtmembranen mittelalter Kontrolltiere weisen zudem signifikant höhere DPH-Anisotropie-Werte auf als Membranen junger Kontrollen (Abb. 26 B).

Tabelle 11. Lovastatin-Effekt auf die Pyren-Fluoreszenz von Gesamtmembranen des Großhirns von jungen C57BL/6J-Mäusen

apoE +/-	Pyren-Bulk-Fluoreszenz	Pyren-Annular-Fluoreszenz
Kontrolle	0.7606 ± 0.0119	1.0120 ± 0.0118
Lovastatin	0.7044 ± 0.0257 ⁺	0.9588 ± 0.0156*
Simvastatin	0.6895 ± 0.0163**	0.9711 ± 0.0180 ⁺
Pravastatin	0.7113 ± 0.0129*	0.9555 ± 0.0195*

Mittelwert ± SEM, n = 4-6; *p<0.05, **p<0.01 signifikant vs. Kontrolle (K); ⁺p=0.07 vs. Kontrolle (ANOVA).

3.4.3.1.3 Pyren-Fluoreszenz

Im Gegensatz zu DPH und TMA-DPH reagiert die Fluoreszenz-Sonde Pyren auf Statin-induzierte Membranveränderungen wesentlich sensibler. Deutliche Behandlungseffekte sind dabei vor allem auf Ebene der Pyren-Bulk-Fluoreszenz zu beobachten. So senkt Lovastatin die Pyren-Bulk-Fluoreszenz in Gesamtmembranen des Großhirns von jungen und mittelalten apoE^{+/+}-Tieren signifikant (Tabelle 10, Tabelle 11, Abb. 27 A). Dabei korrelieren die einzelnen Membrancholesterol-Werte (freies Cholesterol) über die Behandlungsgruppen signifikant mit den korrespondierenden Bulk-Fluoreszenz-Werten, d.h. die Lovastatin-induzierte Cholesterol-Reduktion ist assoziiert mit einer Senkung der Pyren-Bulk-Fluoreszenz (Abb. 27 B). Auch Simvastatin und Pravastatin erniedrigen in der Gesamtmembran-Präparation die Bulk-Fluoreszenz-Werte signifikant (Tabelle 11).

Vergleichbare Effekte, wenngleich nicht so stark ausgeprägt, sind an diesen Membranen auch für den Parameter der Annular-Fluoreszenz zu beobachten (Tabelle 11). Die Werte für die

Pyren-Annular-Fluoreszenz liegen dabei grundsätzlich höher als die entsprechenden Bulk-Fluoreszenz-Werte (Tabelle 11).

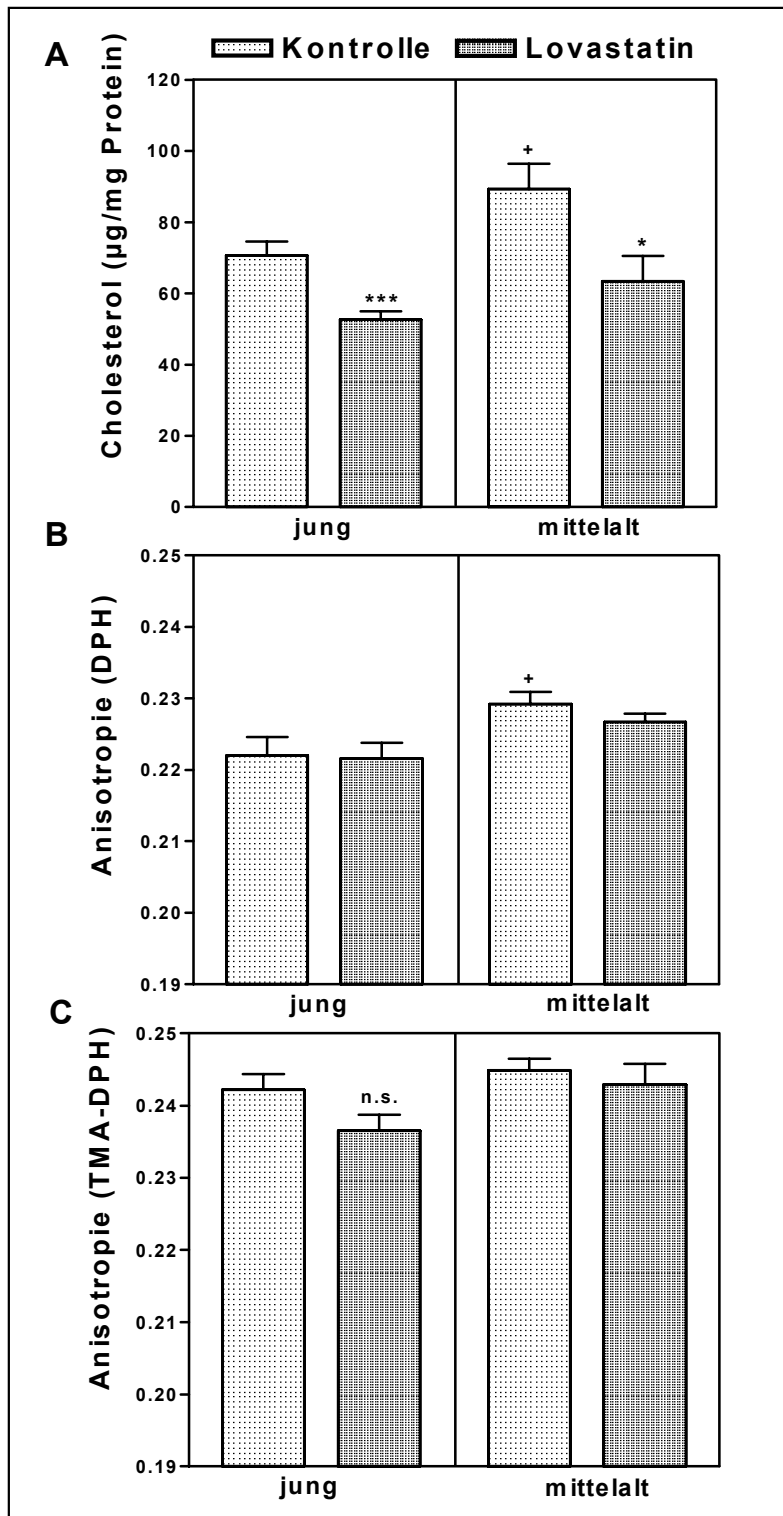


Abb. 26. Einfluß von Lovastatin auf den Gehalt an freiem Membrancholesterol (A), die DPH- (B) und TMA- DPH- Anisotropie (C) von Gesamtmembranen des Großhirns von jungen und mittelalten C57BL/6J-Mäusen. Mittelwert \pm SEM; n = 5-9. A: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ signifikant vs. Kontrolle der gleichen Altersgruppe (t-Test). A,B: + $p < 0.05$ signifikant vs. Kontrolle jung (t-Test).

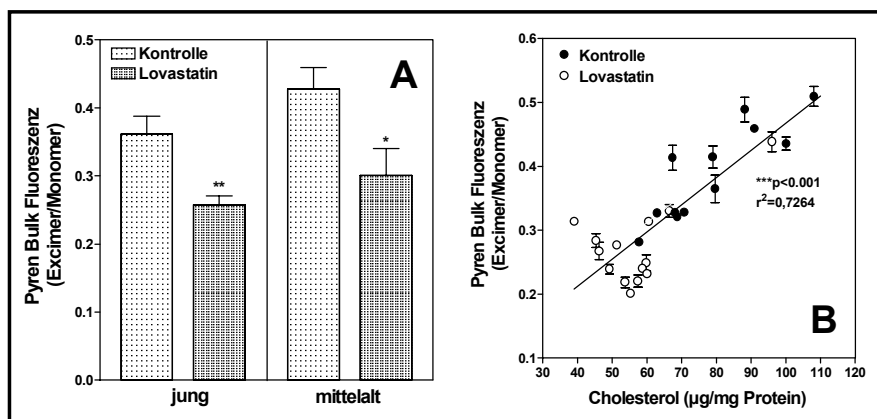


Abb. 27. Lovastatin-Effekt auf die Pyren-Bulk-Fluoreszenz von Gesamtmembranen des Großhirns von jungen und mittelalten C57BL/6J-Mäusen. Mittelwert \pm SEM; n = 5-9. A: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ signifikant vs. Kontrolle der gleichen Altersgruppe (t-Test). B: *** $p < 0.001$ signifikante Korrelation (Pearson).

3.4.3.2 C57BL/6J-apoE-knockout-Mäuse

3.4.3.2.1 Membrancholesterol

apoE-knockout Mäuse weisen zwar im Vergleich zu gleichaltrigen apoE^{+/+}-Tieren signifikant erhöhte Leber- und Serumcholesterol-Spiegel auf (siehe Tabelle 8), jedoch sind die Spiegel an freiem Membrancholesterol in Gesamtmembranen des Großhirns unverändert (Tabelle 10). Das deutet auf eine unabhängige Regulation von peripherer und zentraler Cholesterol-Homöostase hin, wobei im ZNS womöglich andere Lipoproteine den ApoE-Defekt kompensieren (Dietschy, Turley, 2001). Auch sieht man an apoE-knockout-Tieren nicht den bei apoE^{+/+}-Tieren beobachteten Lovastatin-Effekt auf den Membrancholesterol-Spiegel, was auf eine Rolle von ApoE bei der Vermittlung dieser Lovastatin-Wirkung hindeutet (Tabelle 10) (siehe 4.6).

3.4.3.2.2 DPH-Anisotropie

Die DPH-Anisotropie von Gesamtmembranen des Kortex von apoE-knockout-Tieren ist gegenüber Membranen gleichaltriger apoE^{+/+}-Tiere nicht verändert. Lovastatin nimmt keinen Einfluß auf diesen Parameter (Tabelle 10).

3.4.3.2.3 Pyren-Fluoreszenz

Auch die Pyren-Bulk-Fluoreszenz von Gesamtmembranen des Kortex von apoE-knockout-Tieren ist im Vergleich zu Membranen gleichaltriger apoE^{+/+}-Tiere unverändert. Im

Gegensatz zu apoE^{+/+}-Tieren nimmt Lovastatin in apoE-knockout-Mäusen allerdings keinen Einfluß auf diesen Fluoreszenz-Parameter, was die Bedeutung des ApoE-Proteins im Rahmen der Vermittlung membranärer Lovastatin-Effekte zusätzlich unterstreicht (Tabelle 10) (siehe 4.6).

3.4.4 Einfluß von Statinen auf den Membran-Amyloid-Effekt an Ganzhirnmembranen des Großhirns von C57BL/6J-Mäusen

3.4.4.1 DPH- und TMA-DPH-Anisotropie

Der membranäre Amyloid-Effekt auf die DPH- und TMA-DPH-Anisotropie wird durch Lovastatin in Gesamtmembranen des Cortex von jungen und mittelalten C57BL/6J-Mäusen nicht beeinflusst (Abb. 28 A, B). Dabei liegen die Netto-Effekte auf die DPH-Anisotropie wie bereits in Kapitel 3.2 beschrieben bei mittelalten Tieren deutlich niedriger als bei Jungtieren (Abb. 28 A). Eine ähnliche Tendenz zeichnet sich auch bei den wesentlich geringer ausgeprägten Amyloid-Effekten auf die TMA-DPH-Anisotropie ab (Abb. 28 B).

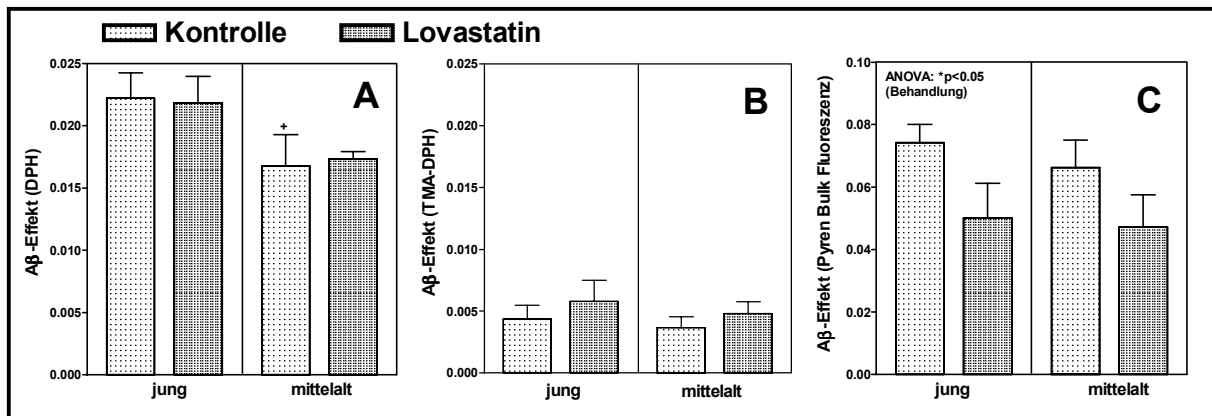


Abb. 28. Lovastatin-Einfluß auf den Aβ-Membraneffekt auf die DPH- (A) und TMA-DPH-Anisotropie (B) sowie auf die Pyren-Bulk-Fluoreszenz (C) von Ganzhirnmembranen des Kortex junger und mittelalter C57BL/6J-Mäuse (Behandlungsstudie 1). Mittelwert \pm SEM; n = 5-9; A β_{25-35} 5 μ mol/l. A: [†]p = 0.11 vs. Kontrolle jung (t-Test); C: Two-Way-ANOVA: *p < 0.05 signifikanter Behandlungs-Effekt (Werte als Betrag).

3.4.4.2 Pyren-Fluoreszenz

An Ganzhirnmembranen junger und mittelalter Mäuse wird der A β -Effekt auf die Pyren-Bulk-Fluoreszenz durch Lovastatin nachhaltig gesenkt, so dass sich in der ANOVA über beide Alterskohorten ein signifikanter Behandlungseffekt zeigt (Abb. 28 C; die Netto-Effekte sind hier als Betrag dargestellt). Dieser konnte in der Kombinations-Studie mit Lovastatin, Simvastatin und Pravastatin an Ganzhirnmembranen junger Mäusen bestätigt werden, wobei auch Simvastatin und Pravastatin in der Gesamtmembran-Präparation den Amyloid-Effekt auf die Bulk-Fluoreszenz deutlich senkten (Tabelle 14). Der A β -Effekt auf den Parameter der Pyren-Annular-Fluoreszenz hingegen wurde durch die Statingabe nicht wesentlich tangiert (Tabelle 14).

3.4.5 Einfluß von Statinen auf die Lipid-Homöostase von SPM junger C57BL/6J-Mäuse

3.4.5.1 Membrancholesterol-Gehalt und Leaflet-Cholesterolverteilung

In Analogie zur Ganzhirnmembran-Präparation senken Lovastatin und Simvastatin auch an SPM von jungen C57BL/6J-Mäusen den Gehalt an freiem Membrancholesterol signifikant ab, wohingegen Pravastatin als hydrophiles Derivat hier keinen Effekt zeigt (Abb. 29 A). Alle drei Statine induzieren geringfügige Senkungen im SPM-Gesamtcholesterol-Gehalt (freies Cholesterol + Cholesterolester), wobei dieser Effekt keine statistische Signifikanz erlangt (Tabelle 12). Dementsprechend sind die Membran-Cholesterolester in der Lovastatin- und Simvastatin-Gruppe leicht erhöht (Tabelle 12). Die Statin-Derivate induzieren weiterhin Veränderungen in der membranären Cholesterolverteilung (Abb, 29 B). Membrancholesterol-Senkungen durch Lovastatin betreffen beide SPM-Leaflets, wohingegen die Simvastatin-Behandlung exklusiv zu Cholesterol-Reduktionen im cytofacialen Membran-Blatt führt (Abb. 29 B). Pravastatin bedingt Cholesterol-Verschiebungen vom exofacialen ins cytofaciale Leaflet (Abb. 29 B). Entsprechend ändern sich in den einzelnen Statin-Gruppen die Verteilungskoeffizienten *Cholesterol exofacial/cytofacial* in Relation zur Kontrolle (Tabelle 12).

Tabelle 12. Gesamtcholesterol, Cholesterolester und Cholesterolverteilung in SPM von jungen Kontroll- und Statin-behandelten C57BL/6J-Mäusen.

	Ratio (Cholesterol exofacial/cytofacial)	Gesamtcholesterol (µg/mg Protein)	Cholesterolester (µg/mg Protein)
Kontrolle	0.201 ± 0.030	204.30 ± 9.09	25.95 ± 11.78
Lovastatin	0.114 ± 0.044 ⁺	184.50 ± 10.29	42.12 ± 10.25
Simvastatin	0.253 ± 0.055	181.90 ± 6.41	45.31 ± 13.88
Pravastatin	0.075 ± 0.037*	178.50 ± 8.16	24.01 ± 14.87

Mittelwert ± SEM, n = 4-6 (a 5 Hirne); *p<0.05 signifikant vs. Kontrolle, ⁺p = 0.13 vs. Kontrolle (t-Test). In den Ratio-Wert geht *freies* Membrancholesterol ein.

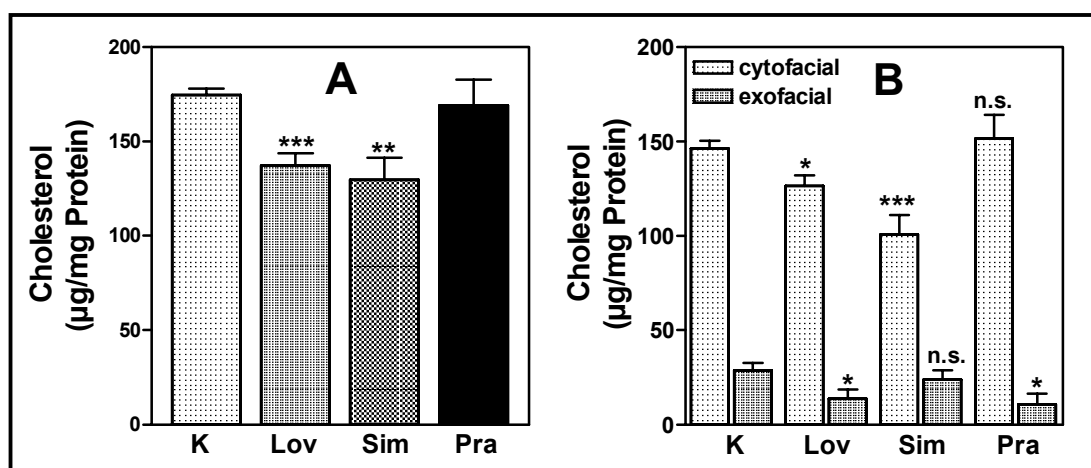


Abb. 29. Einfluß von Lovastatin (Lov), Simvastatin (Sim) und Pravastatin (Pra) auf den Gehalt an freiem Membrancholesterol (A) sowie die Leaflet-Cholesterolverteilung (B) in SPM junger C57BL/6J-Mäuse. Mittelwert ± SEM; n = 4-6 (a 5 Hirne); A: **p<0.01, ***p<0.001 signifikant vs. Kontrolle (ANOVA). B: *p<0.05, ***p<0.001 signifikant vs. gleichem Leaflet der Kontrolle (K) (t-Test).

3.4.5.2 Membranphospholipid-Gehalt

Der Gesamtphospholipid-Gehalt ist in SPM von Lovastatin-, Simvastatin- und Pravastatin-behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant verändert, was sich auch in der entsprechenden molaren Ratio Cholesterol/Phospholipid äußert (Tabelle 13).

Tabelle 13. Phospholipid-Gehalte in SPM von Kontroll- und Statin-behandelten jungen C57BL6/J-Mäusen

	Phospholipide ($\mu\text{mol Phosphor/mg Protein}$)	Cholesterol/Phospholipid (molare Ratio)
Kontrolle	0.7389 ± 0.0572	0.6299 ± 0.0503
Lovastatin	0.6021 ± 0.0453	0.6074 ± 0.0579
Simvastatin	0.6831 ± 0.0698	0.5146 ± 0.0878
Pravastatin	0.7325 ± 0.0564	0.6168 ± 0.0723

Mittelwert \pm SEM, n = 4-6 (a 5 Hirne); Cholesterolwerte in der molaren Ratio sind Gehalte an *freiem* Cholesterol.

3.4.6 Einfluß von Statinen auf verschiedene Membranfluiditäts-Parameter von SPM junger C57BL/6J-Mäuse

3.4.6.1 DPH- und TMA-DPH-Anisotropie

Auch an SPM bedingen die Statin-induzierten Veränderungen der membranären Cholesterol-Homöostase keine Änderungen der DPH-Anisotropie. Sowohl die Gesamt-Anisotropie als auch die individuellen DPH-Leaflet-Anisotropien sind im Vergleich zur Kontrolle in der Lovastatin-, Simvastatin- und Pravastatin-Gruppe unverändert, was sich in den Quotienten *cytofaciale Anisotropie* r_c / *exofaciale Anisotropie* r_e widerspiegelt (Abb. 30). Die Gesamt-DPH-Anisotropie-Werte in den einzelnen Behandlungsgruppen sind gegeben als (Mittelwert \pm SEM, n = 4-6): Kontrolle: 0.2142 ± 0.0028 ; Lovastatin: 0.2100 ± 0.0032 ; Simvastatin: 0.2153 ± 0.0022 ; Pravastatin: 0.2152 ± 0.0034 .

Die TMA-DPH-Anisotropie der SPM ändert sich ebenfalls nicht unter Statintherapie. Hier liegen die entsprechenden Anisotropie-Werte wie folgt (Mittelwert \pm SEM, n = 4-5): Kontrolle: 0.2308 ± 0.0026 ; Lovastatin: 0.2256 ± 0.0050 ; Simvastatin: 0.2282 ± 0.0028 ; Pravastatin: 0.2230 ± 0.0043 .

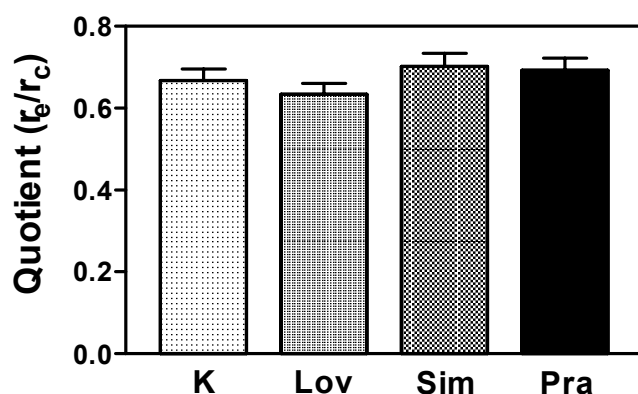


Abb. 30. Quotient aus den DPH-Anisotropie-Werten des cytofacialen Leaflets r_c und des exofacialen Leaflets r_e von SPM von Kontroll (K)- und Statin-behandelten jungen C57BL/6J-Mäusen. Mittelwert \pm SEM; n = 4-6 (a 5 Hirne); Lov = Lovastatin, Sim = Simvastatin, Pra = Pravastatin.

3.4.6.2 Pyren-Fluoreszenz

An SPM junger C57BL/6J-Mäuse induzieren Lovastatin und Pravastatin eine signifikante Reduktion der Pyren-Bulk-Fluoreszenz, wohingegen Simvastatin keinen Effekt auf diesen Fluoreszenz-Parameter zeigt (Abb. 31 A, B). Unter Lovastatin- und Pravastatin-Gabe ist wie in Kapitel 3.4.5.1 beschrieben auch eine signifikante Reduktion von exofacialem Membran-Cholesterol zu beobachten, die sich in der Simvastatin-Gruppe nicht zeigt. Korreliert man die exofacialen Cholesterolgehalte mit den zugehörigen Pyren-Bulk-Fluoreszenzwerten, so ergibt sich über alle Behandlungsgruppen eine signifikante positive Korrelation (Inlet Abb. 31 B), die analog für cytofaciale Cholesterolwerte nicht evident ist (Daten nicht gezeigt). Womöglich stellt die Pyren-Bulk-Fluoreszenz somit einen sensiblen Indikator für den Gehalt an exofacialem Cholesterol dar.

Auf Ebene der Pyren-Annular-Fluoreszenz zeigen sich keine signifikanten Behandlungseffekte an SPM. Hier liegen die entsprechenden Excimer/Monomer-Ratios wie folgt (Mittelwert \pm SEM, n = 4-6): Kontrolle: 1.044 ± 0.048 ; Lovastatin: 1.040 ± 0.013 ; Simvastatin: 1.121 ± 0.017 ; Pravastatin: 0.984 ± 0.054 .

Korrelationen der Pyren-Annular-Fluoreszenz mit den entsprechenden SPM-Leaflet-Cholesterolgehalten zeigten keinen statistisch signifikanten Verlauf (Daten nicht gezeigt).

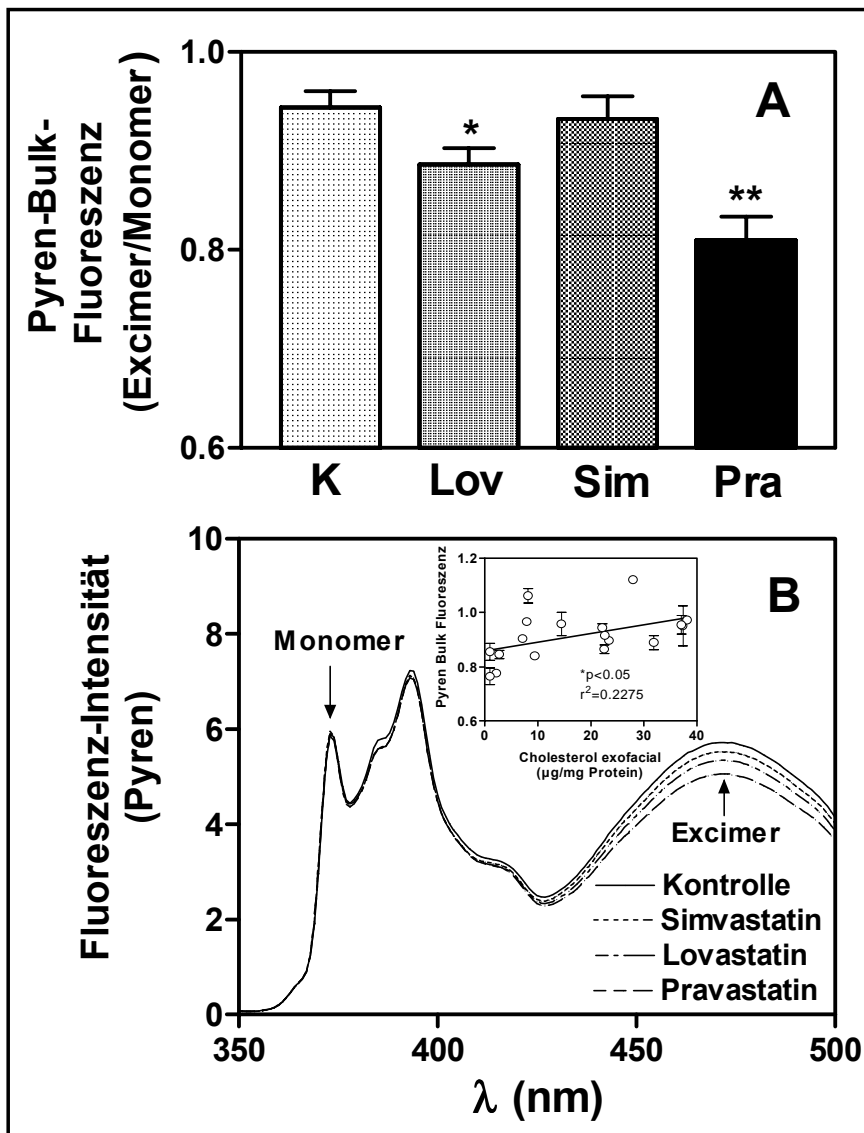


Abb. 31. Einfluß von Lovastatin (Lov), Simvastatin (Sim) und Pravastatin (Pra) auf die Pyren-Bulk-Fluoreszenz von SPM junger C57BL/6J-Mäuse (A, B). Inlet B: Korrelation der exofacialen Cholesterolwerte mit den korrespondierenden Bulk-Fluoreszenz-werten über alle Behandlungs-Gruppen. n = 4-6 (a 5 Hirne). A: Mittelwert \pm SEM; *p<0.05, **p<0.01 signifikant vs. Kontrolle (K) (ANOVA); B: Mittelwertspektren ohne SEM bzw. Mittelwert \pm SEM (Inlet); *p<0.05 signifikante Korrelation (Pearson).

3.4.7 Einfluß von Statinen auf den Membran-Amyloideffekt an SPM junger C57BL/6J-Mäuse

3.4.7.1 DPH- und TMA-DPH-Anisotropie

Der membranäre A β -Effekt auf die DPH-Gesamtanisotropie von SPM wird durch Statine in Analogie zur Gesamtmembran-Präparation nicht signifikant beeinflusst (Abb. 32). Auch die Netto-Leaflet-Effekte von A β werden durch Lovastatin, Simvastatin und Pravastatin nicht signifikant verändert, wengleich sich in der Lovastatin-Gruppe das Verhältnis der

exofacialen Anisotropie r_e zur cytofacialen Anisotropie r_c im Vergleich zur Kontrolle deutlich ändert (Abb. 32).

Auch auf Ebene der TMA-DPH-Anisotropie zeigten sich an den SPM keine Statin-Effekte auf den membranären Amyloid-Effekt (Daten nicht gezeigt).

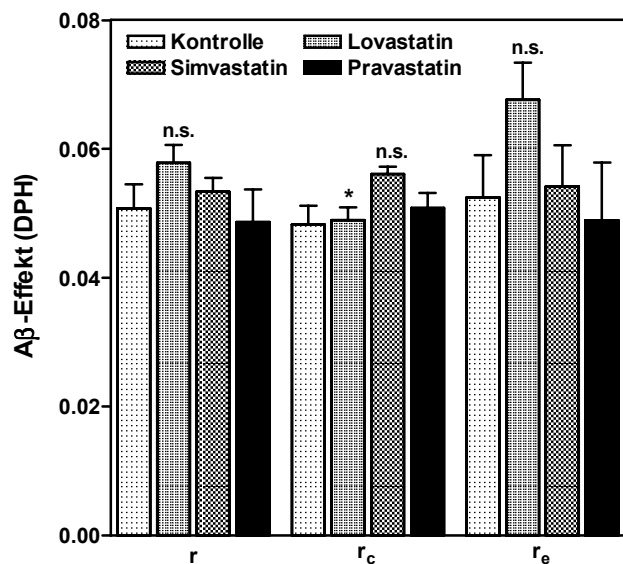


Abb. 32. Einfluß von Lovastatin, Simvastatin und Pravastatin auf den membranären Gesamt- und Leaflet-Amyloid-Effekt (DPH) in SPM junger C57BL/6J-Mäuse. Mittelwert \pm SEM; n = 4-6 (a 5 Hirne); $A\beta_{1-42}$ 1 $\mu\text{mol/l}$; r = DPH-Gesamt-Anisotropie, r_c = Anisotropie cytofacial, r_e = Anisotropie exofacial; n.s. = nicht signifikant vs. Kontrolle der gleichen Meßgruppe, * $p < 0.05$ signifikant vs. r der Lovastatin-Gruppe (t-Test).

3.4.7.2 Pyren-Fluoreszenz

Bezüglich der Statin-induzierten Modulation des membranären Amyloid-Effekts auf die Pyren-Fluoreszenz-Parameter bestehen Unterschiede zwischen der Gesamtmembran-Präparation und den SPM.

In SPM ist in der Pravastatin-Gruppe keine Reduktion des $A\beta$ -Effekts auf die Bulk-Fluoreszenz zu sehen, der in der Gesamtmembran-Präparation jedoch evident war (Tabelle 14). Lovastatin- und Simvastatin induzieren demgegenüber auch in SPM eine Senkung des Amyloid-Effekts auf die Bulk-Fluoreszenz, wohingegen beim Parameter der Pyren-Annular-Fluoreszenz infolge der hohen Standardabweichungen keine deutlichen Tendenzen festzustellen sind (Tabelle 14).

Tabelle 14. Statin-Einfluß auf den A β -Effekt (Pyren-Fluoreszenz) in Ganzhirnmembranen und SPM von jungen C57BL/6J-Mäusen

	SPM		Ganzhirnmembran	
	A β -Effekt (Bulk)	A β -Effekt (Annular)	A β -Effekt (Bulk)	A β -Effekt (Annular)
K	0.0344 \pm 0.0203	0.0750 \pm 0.0490	0.0278 \pm 0.0109	0.0460 \pm 0.0207
Lov	0.0102 \pm 0.0057	0.0270 \pm 0.0188	0.0175 \pm 0.0059	0.0287 \pm 0.0123
Sim	0.0180 \pm 0.0113	0.0565 \pm 0.0300	0.0160 \pm 0.0150	0.0580 \pm 0.0285
Pra	0.0412 \pm 0.0195	0.0848 \pm 0.0398	0.0035 \pm 0.0086 ⁺	0.0233 \pm 0.0193

Mittelwert \pm SEM, n = 4-6 (a 5 Hirne); A β ₁₋₄₂ 1 μ mol/l; ⁺p = 0.10 vs. Kontrolle (K) (t-Test); Lov = Lovastatin, Sim = Simvastatin, Pra = Pravastatin.

3.4.8 Einfluß von Statinen auf spezifische mRNA- und Protein-Expressionen

3.4.8.1 Einfluß auf die Flotillin-Expression in SPM von jungen C57BL/6J-Mäusen

Flotillin ist mit Raft-Domänen assoziiert und dient insofern als Raft-Marker-Protein (Eckert et al., 2003a). Lovastatin, Simvastatin und Pravastatin senken in SPM von jungen C57BL/6J-Mäusen die Flotillin-Expression signifikant gegenüber Kontrollen ab (Abb. 33A, B). Als Auswertungs-Kriterium diente dabei der Parameter *Pixel / Flächeneinheit* bezogen auf den jeweiligen Blot (Abb. 33 A).

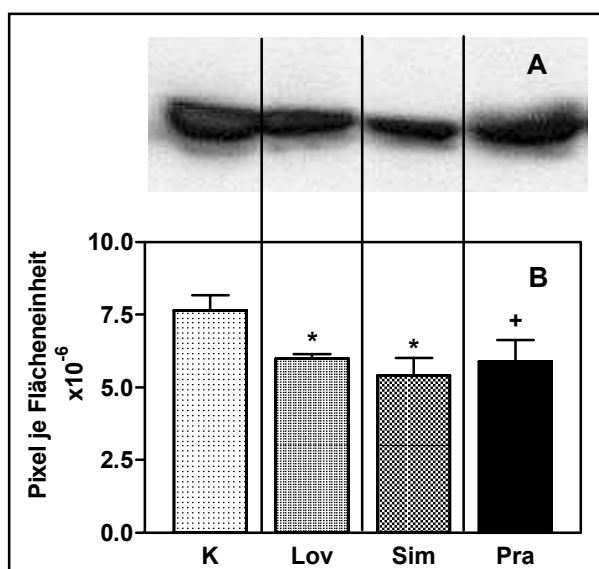


Abb. 33. Einfluß von Lovastatin (Lov), Simvastatin (Sim) und Pravastatin (Pra) auf die Flotillin-Expression in SPM von jungen C57BL/6J-Mäusen. A zeigt einen repräsentativen Western-Blot, B die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung. Mittelwert \pm SEM; n = 4-6 (a 5 Hirne); B: *p<0.05 signifikant vs. Kontrolle (K), ⁺p = 0.07 vs. Kontrolle (t-Test).

3.5 *In vivo* Cholesterol-Fütterungsstudie an Ratten

Die Fütterung wurde im Labor von Dr. A. Koudinov, Rehovot, Israel, durchgeführt und das Gewebe der Tiere in einer Kooperationsarbeit untersucht (siehe 2.2.3).

3.5.1 Einfluß der Cholesterol-Fütterung auf den Cholesterolgehalt von Leber und Serum

Die 6-monatige Cholesterol-Fütterung (2% Cholesterol) führte zu nachhaltigen Veränderungen der peripheren Cholesterolspiegel in Leber und Serum der betreffenden Tiere. Beide Parameter sind in den Cholesterol-gefütterten Tieren im Vergleich zu Kontrollen hochsignifikant erhöht (Abb. 34 A, B).

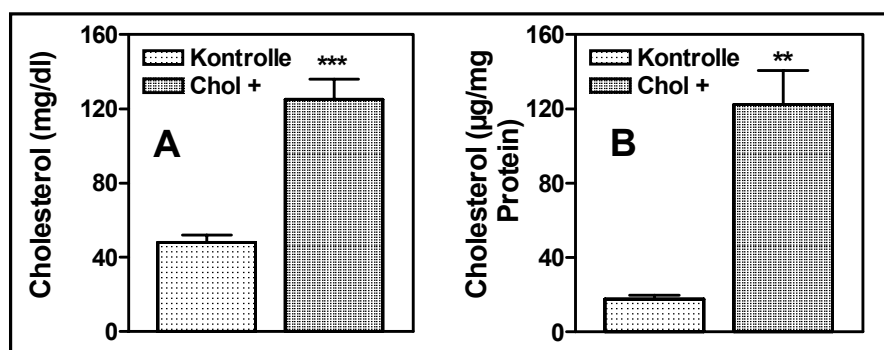


Abb. 34. Einfluß der Cholesterol-Fütterung (Chol+) auf den Serum- (A) und Leber-Gesamtcholesterol-Spiegel (B) von jungen Ratten. Mittelwert \pm SEM; n = 4. **p<0.01, ***p<0.001 signifikant vs. Kontrolle (t-Test).

3.5.2 Einfluß der Cholesterol-Fütterung auf die Lipid-Homöostase von Ganzhirnmembranen verschiedener Hirnareale

Die profunden Cholesterol-Effekte in peripheren Geweben sind in den Gesamtmembran-Präparationen der untersuchten Hirnareale nicht evident, was erneut die unabhängige Lipid-Regulation von peripherem und zentralem Kompartiment untermauert (Dietschy, Turley, 2001). Lipid-Bestimmungen wurden an Membranen der folgenden Areale durchgeführt.

Kortex: Die Cholesterol-Fütterung zeigt keinen Einfluß auf den Gehalt an freiem Membran-Cholesterol sowie an Gesamtlipidphospholipiden in der Gesamtmembran-Präparation (Tabelle 15).

Cerebellum: Im Cerebellum sind keine Cholesterol-Effekte evident, jedoch zeigt sich in der Cholesterol-Fütterungsgruppe eine signifikant erhöhte Cholesterol/Phospholipid-Ratio (C/P-Ratio) im Vergleich zu Kontroll-Tieren, die durch eine Abnahme im Phospholipid-Gehalt verursacht wird (Tabelle 15). In Relation zum Kortex ist die C/P-Ratio in den Cerebellum-Membranen erhöht (Tabelle 15).

Thalamus / Hypothalamus: Es zeigen sich für alle untersuchten Parameter keine signifikanten Behandlungs-Effekte. Die Cholesterol- und C/P-Ratio-Werte liegen tendentiell höher als in den untersuchten Kortex-Gesamtmembranen (Tabelle 15).

Pons: Die Pons weist von allen vermessenen Hirnarealen den höchsten Membrancholesterol- und Phospholipid-Gehalt auf, jedoch sind auch in dieser Präparation keine Cholesterol-Effekte auf diese beiden Parameter evident (Tabelle 15).

Tabelle 15. Einzelne Lipidparameter von Gesamtmembranen verschiedener Hirnareale von Kontroll- und Cholesterol-gefütterten Ratten

		Cholesterol ($\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein)		Phospholipide (μmol Phosphor/ mg Protein)		Cholesterol/ Phospholipid (molare Ratio)	
		Kontrolle	CHOL +	Kontrolle	CHOL +	Kontrolle	CHOL +
Kortex	SPM	193.40 \pm 13.49	197.40 \pm 15.45	0.9168 \pm 0.0247	0.9207 \pm 0.0579	0.5424 \pm 0.0287	0.5525 \pm 0.0232
	crude	136.40 \pm 18.09	144.00 \pm 17.56	0.8023 \pm 0.0144	0.8114 \pm 0.0343	0.4511 \pm 0.0601	0.4703 \pm 0.0542
Cerebellum		162.30 \pm 19.48	147.60 \pm 19.69	0.7620 \pm 0.0416	0.5413 \pm 0.0844 ⁺	0.5478 \pm 0.0509	0.7148 \pm 0.0334*
Thalamus/ Hypothalamus		157.70 \pm 23.55	187.50 \pm 30.91	0.7569 \pm 0.0776	0.8422 \pm 0.1299	0.5777 \pm 0.1416	0.5796 \pm 0.0548
Pons		189.70 \pm 16.42	190.50 \pm 29.90	1.2470 \pm 0.0916	1.1520 \pm 0.0502	0.4053 \pm 0.0566	0.4380 \pm 0.0812

Mittelwert \pm SEM, n = 4; crude = Gesamtmembran-Präparation; *p<0.05 signifikant vs. Kontrolle, ⁺p = 0.06 vs. Kontrolle (t-Test); CHOL+ = Cholesterol-gefütterter.

3.5.3 Einfluß der Cholesterol-Fütterung auf die Lipid-Homöostase von SPM des Kortex

3.5.3.1 Membrancholesterol-Gehalt und Leaflet-Cholesterolverteilung

SPM sind im Vergleich zur Ganzhirnmembran-Präparation bezogen auf den Protein-Gehalt an freiem Cholesterol als auch an Phospholipiden angereichert. Auch an SPM des Kortex bedingt die Cholesterol-Fütterung keine Veränderung dieser beiden Lipid-Parameter (Tabelle 15) und induziert gleichfalls keine signifikanten Verschiebungen in der Leaflet-Cholesterolverteilung (Abb. 35).

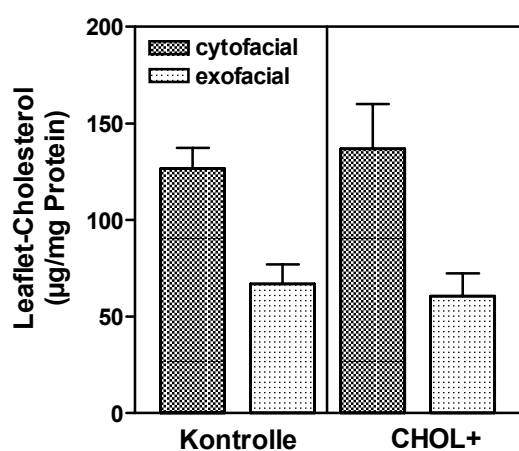


Abb. 35. Leaflet-Cholesterolverteilung in SPM des Kortex von Kontroll- und Cholesterol-gefütterten (CHOL+) Ratten. Mittelwert \pm SEM, n = 3-4. Gezeigt sind die Absolut-Cholesterolverte für beide Leaflets.

3.5.3.2 Membranphospholipid-Gehalt

Der Membranphospholipid-Gehalt von SPM des Kortex ändert sich durch die Cholesterol-Behandlung nicht. Die entsprechenden Werte in $\mu\text{Mol Phosphor/mg Protein}$ (Mittelwert \pm SEM, n = 4) lagen dabei wie folgt: Kontrolle (CHOL-): 0.9168 ± 0.0247 ; CHOL+: 0.9207 ± 0.0579 (Tabelle 17). Dementsprechend sind auch die Cholesterol/Phospholipid-Ratio-Werte in beiden Gruppen nahezu identisch (Abb. 36) (Tabelle 17).

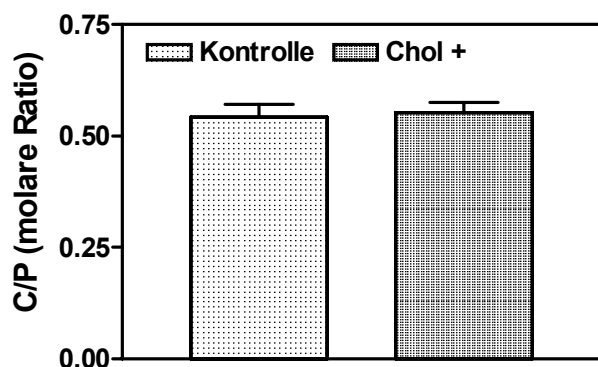


Abb. 36. Molare Ratio-Werte aus freiem Cholesterol / Gesamtphospholipid für SPM des Kortex von Kontroll- und Cholesterol-gefütterten (Chol+) Ratten. Mittelwert \pm SEM; n = 4.

3.6 Humane Hirnproben: *In vitro* Untersuchung krankheitsbedingter Veränderungen der zentralen Membranlipid-Homöostase im Laufe der Alzheimer Krankheit

3.6.1 Untersuchung der Lipid-Homöostase von Gesamtmembranen des frontalen Kortex von Kontroll- und Alzheimer-Patienten

Die einzelnen Untersuchungen wurden an jeweils 16-24 tiefgefrorenen Kortex-Proben von Kontroll- und Alzheimer-Patienten mit heterogenem apoE-Status durchgeführt (siehe 2.2.4). Von besonderem Interesse waren dabei in der Alzheimer-Gruppe die Träger des $\epsilon 4/4$ -Genotyps.

3.6.1.1 Membrancholesterol-Gehalt

Gesamtmembranen des frontalen Kortex von Alzheimer-Patienten weisen tendentiell einen niedrigeren Gehalt an freiem Cholesterol als auch an Gesamtcholesterol im Vergleich zu gleichaltrigen nicht-dementen Kontrollen auf, wenngleich dieser Unterschied nicht statistisch signifikant ist (Tabelle 16).

3.6.1.2 Membranphospholipid-Gehalt

Der Gehalt an Gesamtphospholipid ist in der Gesamtmembran-Präparation des frontalen Kortex bei Alzheimer-Patienten und Kontrollen gleich. Infolge des erniedrigten Cholesterolgehalts weisen Membranen von Alzheimer-Patienten eine verminderte Cholesterol/Phospholipid-Ratio auf (Tabelle 16).

3.6.2 Untersuchung der Lipid-Homöostase von SPM des frontalen Kortex von Kontroll- und Alzheimer-Patienten

3.6.2.1 Membrancholesterol-Gehalt und Leaflet-Cholesterolverteilung

Freies und Gesamtmembran-Cholesterol sind in SPM des frontalen Kortex von Alzheimer-Patienten gegenüber Kontrollen nicht signifikant verändert. Bezogen auf Protein liegen die Werte wie erwartet deutlich höher als in der Gesamtmembran-Präparation (Tabelle 16). Zwischen AD-Patienten mit apoE $\epsilon 4/4$ -Genotyp und $\epsilon 3/4$ -Genotyp zeigen sich an SPM

hinsichtlich des Cholesterolgehalts keine Unterschiede (Daten nicht gezeigt). Betrachtet man gruppenübergreifend den krankheitsunabhängigen Risikofaktor „apoE4-Genotyp“ und vergleicht die SPM-Cholesterolgehalte von Probanden *ohne* ε4-Allel (Kontroll- und AD-Patienten) mit denen von Probanden *mit* einem (heterozygot) oder zwei (homozygot) ε4-Allelen (Kontroll- und AD-Patienten), so ist in SPM der ε4-Kohorte ein deutlicher Anstieg des Membrancholesterol-Gehalts festzustellen. Die entsprechenden Werte (Mittelwert \pm SEM, n = 10-27) liegen wie folgt: Freies Cholesterol: 217.10 \pm 13.75 (ohne ε4-Allel), 249.70 \pm 9.70⁺ (mit ε4-Allel), ⁺p = 0.059 (t-Test); Gesamtcholesterol: 235.70 \pm 9.32 (ohne ε4-Allel), 271.70 \pm 11.47⁺ (mit ε4-Allel), ⁺p = 0.058 (t-Test).

Tabelle 16. Einzelne Lipidparameter von Membranpräparationen des frontalen Kortex von Kontroll- und Alzheimer-Patienten

Kortex frontal	Freies Cholesterol (μg/mg Protein)		Gesamtcholesterol (μg/mg Protein)		Phospholipide (μmol Phosphor/mg Protein)		Cholesterol/Phospholipid (molare Ratio)	
	K	AD	K	AD	K	AD	K	AD
SPM	233.60 \pm 13.01	253.00 \pm 9.45	260.30 \pm 9.62	266.90 \pm 12.80	1.0710 \pm 0.0406	0.9668 \pm 0.0468	0.5452 \pm 0.0320	0.6742 \pm 0.0456*
crude	152.00 \pm 12.82	130.90 \pm 8.24	176.20 \pm 8.27	167.30 \pm 6.04	0.7597 \pm 0.0466	0.7825 \pm 0.0428	0.6078 \pm 0.0559	0.5008 \pm 0.0363

Mittelwert \pm SEM, n = 16-24; crude = Gesamtmembran; K = nicht-demente Kontrolle, AD = Alzheimer-Patient; *p<0.05 signifikant vs. Kontrolle (t-Test).

In der Gesamtauswertung aller Proben zeigen sich an SPM von Kontroll- und Alzheimer-Patienten keine signifikanten Unterschiede in der prozentualen als auch in der absoluten Leaflet-Cholesterolverteilung (Abb. 37; Tabelle 17). Die Quotienten *Cholesterol exofacial / Cholesterol cytofacial* liegen wie folgt (Mittelwert \pm SEM, n = 19): Kontrolle: 0.2946 \pm 0.0466; Alzheimer: 0.3305 \pm 0.0407 (Tabelle 17).

Sowohl in der Kontroll- als auch in der Alzheimer-Kohorte war kein Einfluß des Alters, des Geschlechts oder der *post-mortem* Zeit auf die SPM-Cholesterolverteilung nachweisbar.

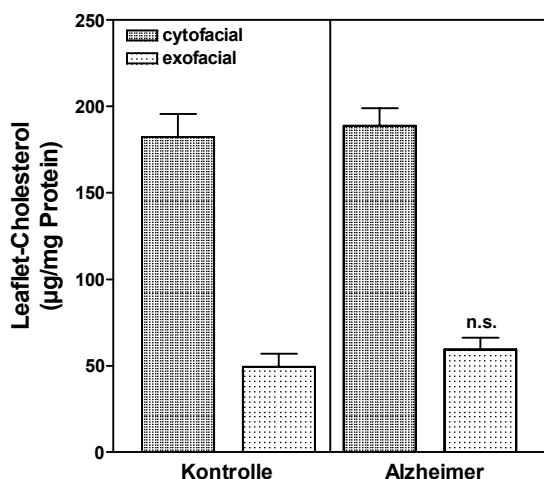


Abb. 37. Absolute Leaflet-Cholesterolverteilung in SPM des frontalen Kortex von Kontroll- und Alzheimer-Patienten (Gesamtkohorte). Mittelwert \pm SEM, n = 19.

Um einen möglichen Einfluß des Risikofaktors „apoE4-Genotyp“ auf die SPM-Cholesterolverteilung herauszufiltern, wurde auch für diesen Meßparameter ein Vergleich von Probanden ohne ϵ 4-Allel aus beiden Gruppen (Kontrolle und AD) mit Trägern von mindestens einem ϵ 4-Allel (Kontrolle und AD) durchgeführt. In diesem Vergleich zeigen ϵ 4-Träger in Relation zu Probanden ohne apoE4-Genotyp einen signifikanten Anstieg im Gehalt an exofacialem Cholesterol (Abb. 38) und damit eine deutliche Zunahme im Quotienten *Cholesterol exofacial / Cholesterol cytofacial* (Inlet Abb. 38; Tabelle 17).

Auch in der Kontrollgruppe weisen SPM von Trägern eines ϵ 4-Allels (n = 3) im Vergleich zu Personen ohne ϵ 4-Allel (n = 11) erhöhte exofaciale Cholesterolwerte auf (Daten nicht gezeigt). In der Alzheimer-Gruppe waren keine Probanden ohne ϵ 4-Allel vertreten. Zwischen apoE4/4-Trägern und apoE3/4-Trägern ergaben sich hinsichtlich der SPM-Leaflet-Cholesterolverteilung in der AD-Gruppe keine Unterschiede (Daten nicht gezeigt).

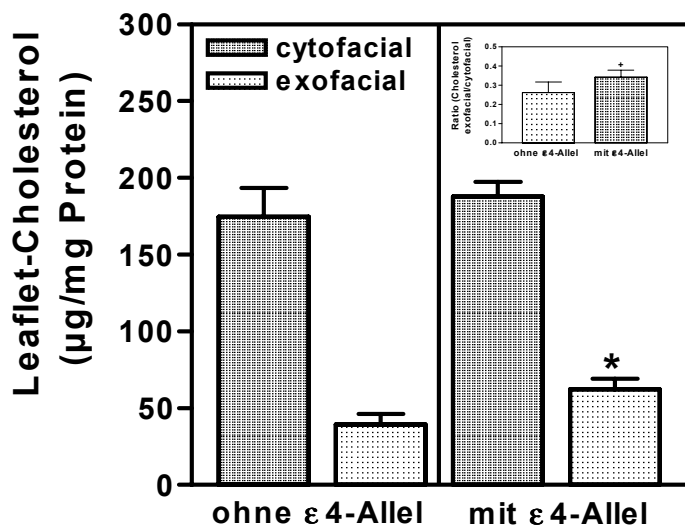


Abb. 38. Vergleich der Leaflet-Cholesterolverteilung in SPM des frontalen Kortex von apoE ϵ 4-Trägern (Kontroll- und Alzheimer-Patienten) und Probanden ohne apoE ϵ 4-Allel (Kontroll- und Alzheimer-Patienten); *p<0.05 signifikant vs. Cholesterol exofacial in der Gruppe ohne apoE ϵ 4-Allel. Inlet: Quotient Cholesterol exofacial / Cholesterol cytofacial für beide Gruppen. Mittelwert \pm SEM; n = 11-22; +p = 0.2178 vs. Ratio-Wert in der Gruppe ohne apoE ϵ 4-Allel.

Tabelle 17. Leaflet-Cholesterolgehalte in SPM des frontalen Kortex von Kontroll- und Alzheimer-Patienten

	Cholesterol ($\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein)		Quotient (Cholesterol exofacial/cytofacial)
	cytofacial	exofacial	
Kontrolle	182.30 ± 13.17	49.26 ± 7.70	0.2946 ± 0.0466
AD	188.70 ± 10.21	59.21 ± 6.79	0.3305 ± 0.0407
ohne $\epsilon 4$ -Allel (K+AD)	174.60 ± 18.93	39.21 ± 6.88	0.2607 ± 0.0566
mit $\epsilon 4$ -Allel (K+AD)	187.70 ± 9.48	62.15 ± 6.84	0.3429 ± 0.0366

Mittelwert \pm SEM; n = 11-22; K = nicht-demente Kontrolle, AD = Alzheimer Patient; in der Kohorte mit $\epsilon 4$ -Allel sind sowohl homozygote als auch heterozygote apoE4-Träger enthalten.

3.6.2.2 Membranphospholipid-Gehalt

Der Gesamtphospholipid-Gehalt in SPM des frontalen Kortex von Alzheimer-Patienten ist im Vergleich zu Kontrollen leicht erniedrigt. Infolge geringfügig erhöhter SPM-Cholesterolwerte in der Alzheimer-Gruppe ergibt sich ein signifikanter Anstieg der Cholesterol/Phospholipid-Ratio für SPM von Alzheimer-Patienten in Relation zu SPM von nicht-dementen Kontrollen (Tabelle 16).

Der SPM-Phospholipidgehalt von apoE4-Trägern ist gegenüber Probanden ohne $\epsilon 4$ -Allel unverändert (Daten nicht gezeigt).

3.6.3 Untersuchung verschiedener Membranfluiditäts-Parameter von SPM des frontalen Kortex von Kontroll- und Alzheimer-Patienten

3.6.3.1 Gesamt- und Leaflet-DPH-Anisotropie

Bezüglich der DPH-Gesamt- und Leaflet-Anisotropie in SPM des Kortex zeigt sich in der Gesamtauswertung ein tendentieller Anstieg der einzelnen Parameter in der Alzheimer-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe (Tabelle 18). Die Quotienten aus exofacialer Anisotropie r_e und cytofacialer Anisotropie r_c sind in beiden Gruppen gleich (Tabelle 18).

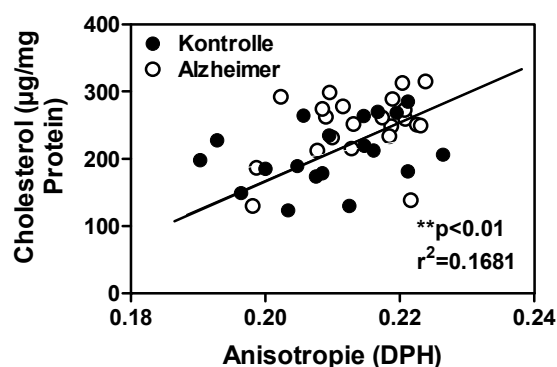
Tabelle 18. DPH-Anisotropie-Parameter in SPM des frontalen Kortex von Kontroll- und Alzheimer-Patienten

SPM	% -Quenching (DPH)	DPH-Anisotropie			Quotient r_e / r_c
		r	r_c	r_e	
K	46.53 ± 0.82	0.2105 ± 0.0023	$0.2406 \pm 0.0020^{***}$	$0.1755 \pm 0.0045^{***}$	0.7297 ± 0.0186
AD	46.02 ± 0.56	0.2142 ± 0.0016	$0.2456 \pm 0.0016^{***}$	$0.1772 \pm 0.0034^{***}$	0.7228 ± 0.0158

Mittelwert \pm SEM; n = 22-23 (gezeigt sind die Gesamtgruppen); r = DPH-Gesamt-Anisotropie, r_c = cytofaciale Anisotropie, r_e = exofaciale Anisotropie; ***p<0.001 signifikant vs. r der gleichen Gruppe (t-Test).

Über beide Patienten-Kollektive ergibt sich eine signifikante Korrelation zwischen der DPH-Gesamt-Anisotropie und den korrespondierenden SPM-Cholesterolgehalten (Abb. 39) sowie zwischen der jeweiligen DPH-Leaflet-Anisotropie und den zugehörigen Leaflet-Cholesterolwerten (***p<0.001, $r^2 = 0.6320$, n = 20-22; Daten nicht gezeigt).

Abb. 39. Korrelation der DPH-Gesamt-Anisotropie mit den zugehörigen Gehalten an freiem Membrancholesterol in SPM des frontalen Kortex von nicht-dementen Kontroll- und Alzheimer-Patienten. Mittelwert \pm SEM; n = 20-22. **p<0.01 signifikante Korrelation (Pearson).



Im Vergleich zwischen SPM von Kontroll- und Alzheimer-Patienten mit apoE ϵ 4-Genotyp und Probanden ohne ϵ 4-Genotyp ergeben sich demgegenüber signifikante Erhöhungen in den einzelnen DPH-Anisotropie-Parametern in der apoE4-Gruppe, was einen Einfluß des apoE4-Genotyps auf die membranäre Lipid-Homöostase untermauert (Abb. 40). Das Verhältnis der Leaflet-Anisotropien r_e und r_c bleibt dabei unverändert (Quotient r_e / r_c als Mittelwert \pm SEM, n = 13-26: ohne ϵ 4-Allel: 0.7029 ± 0.0270 ; mit ϵ 4-Allel: 0.7274 ± 0.0147).

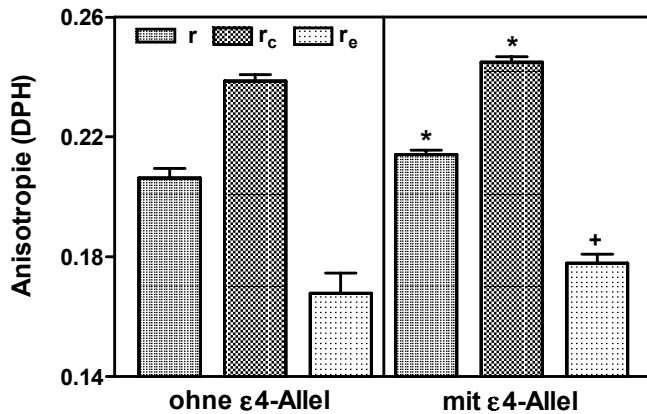


Abb. 40. DPH-Anisotropie-Parameter in SPM des frontalen Kortex von apoE ε4-Trägern (Kontroll- und Alzheimer-Patienten) und Probanden ohne apoE ε4-Allel (Kontroll- und Alzheimer-Patienten). Mittelwert \pm SEM; n = 13-26. *p<0.05 signifikant vs. gleichem SPM-Anisotropiewert von Probanden ohne apoE ε4-Allel; +p = 0.1260 vs. r_c ohne ε4-Allel (t-Test). r = DPH-Gesamt-Anisotropie, r_c = cytofaciale Anisotropie, r_e = exofaciale Anisotropie.

3.6.3.2 Pyren-Fluoreszenz

Die Pyren-Bulk-Fluoreszenz-Werte für SPM des Kortex von Kontroll- und Alzheimer-Patienten unterscheiden sich nicht signifikant (das gilt sowohl für den Gesamtgruppen- als auch für den Kohorten-Vergleich mit und ohne apoE4-Genotyp; Abb. 41).

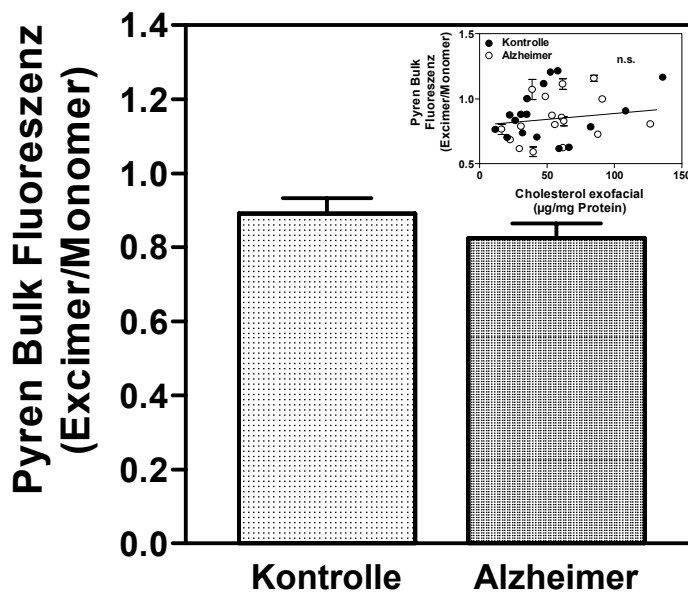


Abb. 41. Pyren-Bulk-Fluoreszenz-Werte von SPM des frontalen Kortex von Kontroll- und Alzheimer-Patienten. Inlet: Korrelation der Bulk-Fluoreszenzwerte mit den korrespondierenden Gehalten an exofacialem SPM-Cholesterol über beide Patienten-Gruppen. Mittelwert \pm SEM; n = 19-22.

Die Korrelation der Bulk-Fluoreszenzwerte mit den korrespondierenden Gehalten an exofacialem SPM-Cholesterol zeigt auch an den Humanproben in Analogie zu den Ergebnissen aus den Statin-Studien (siehe 3.4.6.2) eine positive Tendenz (Inlet Abb. 41), die für die entsprechenden cytofacialen Cholesterolwerte nicht evident ist (Daten nicht gezeigt).

Auch auf Ebene der Pyren-Annular-Fluoreszenz zeigen sich an SPM keine Unterschiede zwischen nichtdementen Kontrollen und Alzheimer-Patienten. Die entsprechenden Excimer/Monomer-Ratios (Mittelwert \pm SEM, n = 19-22) liegen wie folgt: Kontrolle: 0.9806 ± 0.0360 , Alzheimer: 0.9498 ± 0.0241 .

4 Diskussion

4.1 Membran-Präparationen und Meßmethodik

In der vorliegenden Arbeit wurden im wesentlichen Ganzhirnmembranen und synaptosomale Plasmamembranen (SPM) als Membran-Präparationen verwendet. Beide Präparationen unterscheiden sich wesentlich in ihrer Zusammensetzung. Ganzhirnmembranen sind ein Konglomerat aus neuronalen Membranen und Glia-Material. Intrazelluläre Membrankompartimente (Mitochondrien-, ER- oder Kernmembranen) sind genauso vertreten wie Bruchstücke zellulärer Plasmamembranen (Graham, Higgins, 1998). Demgegenüber sind SPM hoch angereichert an Fragmenten synaptischer Membranfortsätze (Graham, Higgins, 1998). Bezogen auf die Proteinmenge weisen SPM einen wesentlich höheren Cholesteroll- bzw. Lipidgehalt auf als Ganzhirnmembranen (Eckert, 2000). Untersuchungen an SPM sind besonders hilfreich, wenn man membranäre Prozesse und Eigenschaften charakterisieren möchte, die *in vivo* für die neuronale Zellhomöostase und synaptische Signaltransduktion relevant sind. Mit Hilfe der Ganzhirnmembran lassen sich hingegen sehr gut generalisierte Effekte eines bestimmten Stimulus (z.B. A β -Peptid) erfassen, ohne dass jedoch spezifische strukturbezogene Aussagen getroffen werden können. Infolge der unterschiedlichen Komposition der verwendeten Präparationen kann ein und derselbe Stimulus am jeweiligen System verschiedenartige Effekte hervorrufen.

Die eingesetzte Meßmethodik umfaßt vorrangig ein Spektrum fluoreszenzspektrometrischer Verfahren, die zur Beschreibung der Fluiditätseigenschaften von Membranen verwendet werden (Schroeder, 1988). Der in der Literatur etablierte Begriff der „Fluidität“ muß dabei differenziert betrachtet werden. Je nach Fluoreszenzsonde erfaßt man das dynamische Bewegungsverhalten eines Fluorophors in seinem membranären Lokalisationsbereich. Dieses Verhalten wird durch die physikochemischen und strukturellen Membraneigenschaften im unmittelbaren Umfeld der Sonde direkt oder indirekt beeinflusst. Somit läßt sich nur eine lokale und keine generalisierte Aussage treffen, die man allerdings häufig mit dem Begriff der Membranfluidität assoziiert. In der korrekten Bezeichnung sollte daher der betroffene Membranbereich näher spezifiziert oder der zugrunde liegende physikalische Prozess (Anisotropie-Änderung, Fluoreszenz-Intensität) genannt werden.

4.2 Beeinflussung von Membranstruktur und Physikochemie: M β CD versus Statine

In der folgenden Diskussion wird vorrangig auf die SPM-Präparation Bezug genommen, da es sich hierbei um ein klar definiertes membranäres Kompartiment handelt, an dem strukturbezogene Aussagen getroffen werden können. Treten in einzelnen Meßsystemen Unterschiede zwischen Ganzhirnmembranen und SPM auf, so werden sie explizit diskutiert.

M β CD und seine Cholesterol-Komplexverbindungen sind valide Instrumente zur Modulation des membranären Cholesterol-Gehalts (Bodovitz, Klein, 1996; Frears et al., 1999; Kojro et al., 2001; Arispe, Doh, 2002). M β CD kann an der Membranoberfläche außer Cholesterol auch andere größenverwandte Membranmoleküle komplexieren, was insbesondere bei Einsatz hoher Konzentrationen die Membranintegrität empfindlich beeinflusst. In der Literatur finden sich unterschiedliche Angaben darüber, in welcher Form M β CD Membrancholesterol-Domänen beeinflusst. Zum einen gibt es Befunde an Jurkat T-Zellen und glattmuskulären Gefäßzellen, die eine M β CD-bedingte Zerstörung membranärer Rafts und Caveolae verbunden mit der Induktion spezieller Signaltransduktions-Kaskaden belegen (Kabouridis et al., 2000; Dreja et al., 2002). Demgegenüber weisen Ergebnisse anderer Zellkultur-Untersuchungen darauf hin, das die M β CD-induzierte Membrancholesterol-Depletion vorrangig im Übergangsbereich zwischen Raft-Domänen und Bulk-Cholesterolphase bzw. in der Bulk-Phase selbst stattfindet (Ilangumaran, Hoessli, 1998), wodurch sich das Koaleszenz-Verhalten und damit der Funktionszustand einzelner Membrandomänen beeinflussen läßt, ohne daß diese zerstört werden (Hao et al., 2001). Die Beurteilung dieser teilweise kontroversen Befunde gestaltet sich insofern schwierig, als es bislang lediglich indirekte Hinweise auf die *in vivo*-Existenz von Raft-Strukturen gibt und strukturelle Aussagen sich fast ausschließlich auf das Extraktionsverhalten spezifischer Membranproteine und Lipide in Detergentien wie Triton X-100 stützen (Eckert et al., 2003a). Unsere Daten zeigen, dass auch die eingesetzte M β CD-Konzentration eine entscheidende Rolle bei der Cholesterol-Depletion von Membrankompartimenten spielt. In hohen Konzentrationen entzieht M β CD der Membran bis zu 90% des freien Cholesterols, was darauf hindeutet, dass hiervon auch der konstitutive Cholesterol-Pool im cytofacialen Membranblatt betroffen ist, der etwa zwei Drittel des Membrancholesterols ausmacht (Abb. D1) (Ilangumaran, Hoessli, 1998). In niedrigeren Konzentrationsbereichen wird durch M β CD explizit freies exofaciales Cholesterol depletiert, so daß sich das Verhältnis von cytofacialem zu exofacialem Cholesterol verändert (Tabelle D1). Der Gesamtphospholipid-Gehalt der Membran bleibt unter M β CD-Behandlung unverändert. In Analogie zur Cholesterol-

Depletion lassen sich mit M β CD-Cholesterol-Einschlußverbindungen an SPM signifikante Cholesterol-Anreicherungen im exofacialen Membranblatt erzielen, ohne dass die Cholesterol-Homöostase des cytofacialen Leaflets verändert wird (Tabelle D1). Beide Befunde sind in der Literatur noch nicht beschrieben und tragen somit wesentlich zur Aufklärung des kontrovers diskutierten membranären Interaktionsverhaltens von M β CD-Verbindungen bei.

Tabelle D1. Beeinflussung membranärer Domänen an SPM: M β CD-Verbindungen versus Statine.

<i>In vitro</i> / <i>In vivo</i>	CHOL- (M β CD)	CHOL+ (Cholesterol- Chlatrat)	Lova- statin	Simva- statin	Prava- statin	Alter
DPH- Anisotropie	↓	↑	=	=	=	↑
TMA-DPH- Anisotropie	↓	↑	(↓)	=	=	=
Pyren Bulk Fluoreszenz	(↓)	(↑)	↓	=	↓	↑
Pyren Annular Fluoreszenz	=	=	=	=	=	=
A β -Effekt (DPH)	↑	↓	=	=	=	↓
A β -Effekt (TMA-DPH)	↑	↓	=	=	=	↓
A β -Effekt (Pyren Bulk)	=	=	↓	(↓)	(↓)	=
A β -Effekt (Pyren Annular)	=	=	(↓)	=	=	=
freies Cholesterol	↓	↑	↓	↓	=	↑
Cholesterol exo/cyto	↓	↑	(↓)	↑	↓	↑
Cholesterol- Ester	?	=	(↑)	(↑)	=	?
Phospholipide	=	=	(↓)	=	=	Effekt
Lipid-Rafts	Effekt	?	Effekt ?	Effekt ?	Effekt ?	?

↓: Abnahme; ↑: Zunahme; =: kein Effekt; ? = unklar. Effekte in Klammern sind nur schwach ausgeprägt.
CHOL= Cholesterol

Bedingt durch die Cholesterol-Modulationseffekte der M β CD-Verbindungen wird das Fluiditätsverhalten der Membran in spezifischen Bereichen variiert. Dies belegen auch andere *in vitro* Untersuchungen für den Fall der Cholesterol-Beladung (Hartmann et al., 1994; Hartel et al., 1998) als auch der Cholesterol-Depletion (Gidwani et al., 2001). M β CD-Behandlung erniedrigt an Maus-SPM im Bereich der Phospholipid-Kopfgruppen (dem Lokalisationsbereich von TMA-DPH) als auch im Bereich der Phospholipid-Fettsäureketten (dem Lokalisationsbereich von DPH) die Membranviskosität (Tabelle D1). M β CD-Cholesterol-Einschlußverbindungen bedingen in beiden Membranregionen den gegenteiligen Effekt, wobei in Konsequenz der exklusiv exofacialen Cholesterol-Beladung die exofaciale DPH-Leaflet-Anisotropie am stärksten zunimmt, und sich somit das DPH-Anisotropieverhältnis beider Membranblätter zueinander verändert. Umgekehrt nimmt bei niedrigen M β CD-Konzentrationen infolge der Leaflet-spezifischen Cholesterol-Depletion die DPH-Anisotropie im exofacialen Membranblatt wesentlich stärker ab als im cytofacialen Leaflet. In der Empfindlichkeit gegenüber diesen Modulationseffekten verhalten sich Membranen von jungen und alten Mäusen nahezu gleich.

Durch Variation des Membrancholesterol-Gehalts mit M β CD und seinen Cholesterol-Komplexen lassen sich weiterhin die membranären Effekte von aggregiertem Amyloid beta-Peptid auf die DPH- und TMA-DPH-Anisotropie von Hirnmembranen nachhaltig variiieren, wobei A β in den Lokalisationsbereichen beider Sonden die Membranfluidität *per se* erniedrigt (Anisotropie-Zunahme). Eine derartige Membranrigidisierung durch A β wurde in anderen Arbeiten bestätigt (Müller et al., 1995, 1998, 2001; Eckert et al., 2000, 2001b) (Tabelle D3). In Übereinstimmung mit früheren Daten unserer Arbeitsgruppe sind die A β -Effekte im Bereich der hydrophilen Kopfgruppen der Membranphospholipide deutlich schwächer ausgeprägt als in der hydrophoben Core-Region der Membran (Eckert, 2000; Müller et al., 2001). Die externe Cholesterol-Depletion verstärkt den A β -Membraneffekt in beiden Membranbereichen, die Cholesterol-Beladung schwächt ihn ab (Tabelle D1). Das deutet darauf hin, daß membranäres Cholesterol gegenüber den zytotoxischen A β -Einflüssen, die sehr wahrscheinlich auf der Membraninteraktion des Peptids beruhen (Hirakura et al., 1998; Kanfer et al., 1999), eine protektive Funktion übernimmt, wobei diese Protektion sowohl in Hirnmembranen junger als auch alter Mäuse gleichermaßen evident ist. Die membranäre Schutzfunktion des Cholesterols ist in der Literatur von weiteren Autoren beschrieben worden (Hartmann et al., 1994; Zhou, Richardson, 1996; Eckert et al., 2000; Kawahara, Kuroda, 2001; Arispe, Doh, 2002) und wird in Kapitel 4.4 näher diskutiert.

Im Hinblick auf die Modulation der Pyren-Fluoreszenz-Parameter zeigt sich ein differenzierteres Bild. Auf Ebene der Annular-Fluoreszenz induziert die Cholesterol-Modulation mit M β CD-Verbindungen sowohl an SPM als auch an Ganzhirnmembranen keine Veränderungen (Tabelle D1). Demgegenüber ergeben sich an beiden Membranfraktionen gegensätzliche Effekte von M β CD und seinen Komplexverbindungen auf die Pyren-Bulk-Fluoreszenz (zusammengefaßt in Tabelle D2). Auch sind Ganzhirnmembranen alter Mäuse gegenüber diesen Effekten wesentlich sensibler als junge Mäuse, so daß wahrscheinlich altersassoziierte Membranveränderungen das membranäre Verteilungsverhalten von Pyren mitbeeinflussen. Ein allgemeines Erklärungsmodell für die Befunde zur Pyren-Bulk-Fluoreszenz wird in Kapitel 4.3 beschrieben.

Der Membran-Amyloid-Effekt auf die Pyren-Bulk-Fluoreszenz sowie die Pyren-Annular-Fluoreszenz läßt sich durch *in vitro* Cholesterol-Modulation in unseren Studien nicht variieren. Zudem zeigt aggregiertes A β_{25-35} und A β_{1-40} in Versuchen an Ganzhirnmembranen und SPM junger und alter Mäuse *per se* auf die beiden Pyren-Fluoreszenz-Parameter keinen nennenswerten Einfluß, was durch die Befunde von Eckert et al. (2001b) bestätigt wird. Andere veröffentlichte Daten stehen hierzu im Widerspruch und zeigen insbesondere für lösliches A β_{1-40} an SPM der Ratte einen fluidisierenden Effekt auf die Pyren-Bulk- und Annular-Fluoreszenz (Avdulov et al., 1997a; Mason et al., 1999; Chochina et al., 2001), der in Hirnregionen mit hohem Cholesterolgehalt am stärksten ausgeprägt ist (Chochina et al., 2001) und mit dem Ausmaß der A β -induzierten Lipidperoxidation korreliert (Avdulov et al., 1997a). Mason et al. (1999) beobachten eine Zunahme der Pyren-Fluoreszenz auch für aggregiertes A β_{1-40} -Peptid. Die Diskrepanz zwischen diesen bislang veröffentlichten Daten zum membranären Amyloideffekt auf die Pyren-Fluoreszenz und unseren Befunden geht womöglich zum Teil auf Unterschiede in den verwendeten Amyloid-Sequenzen und deren Aggregationsstatus zurück. Beide Parameter determinieren nachweislich die physikochemischen Membraninteraktionen des Peptids (Mason et al., 1999). Zur Übersicht sind sämtliche Literaturstellen in Tabelle D3 nochmals zusammengefaßt.

In Analogie zu ihrer Verwendung am Hypercholesterinämie-Patienten werden Statine häufig auch in *in vitro* Assays zur Reduktion zellulärer Cholesterolspiegel verwendet (Simons et al., 1998; Frears et al., 1999; Fassbender et al., 2001; Subasinghe et al., 2003). Bislang ist weitestgehend unklar, inwieweit diese teilweise im CSF von Humanpatienten nachweisbaren Substanzen (Botti et al., 1991) *in vivo* auch eine Beeinflussung der *zentralen* Cholesterol-Homöostase induzieren. Mit unseren Daten konnten wir erstmals zeigen, dass die lipophilen Derivate Lovastatin und Simvastatin *in vivo* den Gehalt an freiem Cholesterol in

Ganzhirnmembranen und SPM von Mäusen signifikant erniedrigen, wohingegen das hydrophile Pravastatin die Gesamtmenge an freiem Membrancholesterol nicht beeinflusst (Tabelle D1). Alle drei Substanzen zeigen keinen Effekt auf den membranären Phospholipidspiegel. In jüngster Zeit sind einige weitere Veröffentlichungen erschienen, die einen Effekt von Statinen auf den Cholesterolfstoffwechsel im Gehirn belegen. So vermochten verschiedene Statine in einer 6-monatigen Humanstudie an Hypercholesterinämie-Patienten die CSF-Spiegel an Cholesterol und Lathosterol signifikant zu senken (Fassbender et al., 2002). Eine weitere prospektive Studie an Patienten mit erhöhtem Plasmacholesterol belegte eine nachhaltige Reduktion des Plasma-24S-Hydroxycholesterol-Spiegels unter Simvastatin-Therapie, was auf eine Statin-induzierte Beeinflussung des zerebralen Cholesterol-Turnovers schließen lässt (Locatelli et al., 2002). Auch am Tiermodell zeigte sich Simvastatin effektiv in der Reduktion des Cholesterol-Precursors Lathosterol im Gehirn von Meerschweinchen (Fassbender et al., 2001).

In unseren Studien bewirken die eingesetzten Statine eine Veränderung der membranären Cholesterolverteilung. Lovastatin depletiert SPM-Cholesterol in beiden Membran-Leaflets, Simvastatin exklusiv im cytofacialen Leaflet, und Pravastatin induziert eine Cholesterol-Umverteilung vom exofacialen ins cytofaciale Membranblatt (Tabelle D1). Durch den jeweiligen Cholesterol-Shift ändert sich das Verhältnis von exofacialem zu cytofacialem Membrancholesterol (Tabelle D1). Alle drei Statine reduzieren weiterhin die Expression des Raft-Marker-Proteins Flotillin (Zajchowski, Robbins, 2002; Eckert et al., 2003a), was auf eine Beeinflussung exofacialer Raft-Domänen schließen läßt. Insbesondere für Simvastatin spiegeln sich die Expressions-Daten nach vorläufigen Ergebnissen auch auf mRNA-Ebene wider. Bei der Interpretation dieser Ergebnisse muß man insofern vorsichtig sein, als daß sie keinen direkten Beweis für eine Veränderung der strukturellen Beschaffenheit von Rafts durch Statine liefern. Zum einen wurden keine reinen Raft-Domänen aus dem SPM-Material isoliert, zum anderen müssen sich Effekte auf mRNA-Ebene nicht unbedingt auf Proteinebene abbilden. Auch die bislang in der Literatur zu findenden Hinweise einer Beeinflussung von membranären Raft-Domänen durch Statine sind nur indirekt und basieren auf der Beobachtung veränderter Raft-assoziiertes Signaltransduktionswege unter Cholesterol-Depletion mit Statinen (Taraboulos et al., 1995; Stulnig et al., 1997). Neuere Daten weisen in diesem Zusammenhang auch auf eine Inhibition der Caveolin-Expression in endothelialen Zellen in Gegenwart von Statinen hin, die mit einer erhöhten NO-Synthase-Aktivität verbunden ist (Feron et al., 2001). Weitere Untersuchungen müssen endgültig klären, inwiefern Statin-induzierte Membrancholesterol-Senkungen tatsächlich auch Rafts erfassen.

Interessanterweise beeinflussen die Statine in unserem Tiermodell nicht den membranären Gesamtcholesterol-Gehalt von SPM, was in der Kombination mit der Senkung des freien Cholesterolspiegels für Simvastatin und Lovastatin eine tendentielle Erhöhung der membranären Cholesterolester in diesen beiden Wirkstoffgruppen ausweist. Die pharmakologische Bedeutung dieses Befunds ist unklar. Für Simvastatin und Pravastatin wurde gezeigt, dass sie die Cholesterol-Veresterung peripher in AcLDL-beladenen Makrophagen über einen Isoprenoid-vermittelten Mechanismus in unterschiedlicher Weise beeinflussen (Bernini et al., 1993). Zwei aktuelle Arbeiten assoziieren den zellulären Cholesterolester-Pool mit Veränderungen im APP-Metabolismus. In der *Drosophila*-Mutanten *löchrig*, die eine Untereinheit der AMP aktivierten Protein Kinase (AMPK) als negativem Regulator der HMG-CoA-Reduktase erfaßt, ist ein neurodegenerativer Phänotyp mit verminderten Cholesterolester-Spiegeln und einer veränderten APPL-Prozessierung assoziiert (APPL ist das Fliegen-Homologe zu humanem APP), ohne daß Veränderungen im zellulären Pool an freiem Cholesterol auftreten (Tschäpe et al., 2002). Durch Statingabe läßt sich dieser Phänotyp nachhaltig unterdrücken (Tschäpe et al., 2002). Puglielli et al. (2001) zeigen demgegenüber an Neuronenkulturen der Maus eine direkte Korrelation zwischen zellulären Cholesterolester-Spiegeln bzw. ACAT-Aktivität und intrazellulärer A β -Bildung unter Bedingungen normaler zellulärer Spiegel an freiem Cholesterol. Umgekehrt vermag A β selbst in Neuronen die Cholesterol-Veresterung zu vermindern (Koudinova et al., 1996; Liu et al., 1998). Weiterhin gibt es Hinweise darauf, daß die Aktivität der LCAT im Plasma von Alzheimer Patienten im Vergleich zu Kontrollen tendentiell erniedrigt ist (Knebl et al., 1994). In einer anderen Studie waren die Cholesterolester-Spiegel im parahippokampalen Kortex von Alzheimer-Patienten in Relation zu Kontrollen unverändert (Corrigan et al., 1998). Wenngleich eine einheitliche Interpretation dieser Daten im Moment nicht möglich ist, so sind sie insofern von besonderem Interesse, als daß sie nahelegen, daß dem bis dato weithin als indifferent angesehen zellulären Cholesterolester-Pool womöglich eine aktive Rolle im amyloidogenen Stoffwechsel bei AD zukommt.

Statin-induzierte Cholesterol-Shiftings hin zum Cholesterolester-Pool und damit unveränderte Gesamtmembran-Cholesterolspiegel mögen eine Erklärung dafür sein, dass sämtliche in unseren Versuchen eingesetzten Statine keinen Einfluß auf die DPH- und TMA-DPH-Anisotropie von Maus-SPM nehmen und auch den Amyloideffekt von aggregiertem Peptid auf diese beiden Anisotropie-Parameter nicht modifizieren (Tabelle D1), so wie es für die verwendeten M β CD-Verbindungen der Fall war. Eine andere denkbare Erklärung für diese Befunde ist, daß M β CD und Statine innerhalb der Membran *unterschiedliche* Cholesterol-

Pools beeinflussen. Diese Theorie wird von Daten zur Veränderung der Pyren-Bulk-Fluoreszenz in SPM von Statin-behandelten Mäusen gestützt. Diejenigen Statine, die eine nachhaltige Reduktion des exofacialen Membrancholesterols induzieren, bedingen gleichfalls eine signifikante Abnahme in der Pyren-Bulk-Fluoreszenz, so daß sich über alle Statingruppen eine positive Korrelation zwischen beiden Meßgrößen ergibt (Tabelle D1). Mit der Statin-vermittelten Reduktion der Pyren-Bulk-Fluoreszenz geht gleichfalls eine Modulation des A β -Effekts auf diesen Fluoreszenz-Parameter einher. Der Amyloideffekt auf die Pyren-Bulk-Fluoreszenz von SPM wird von allen Statinen mehr oder weniger stark abgeschwächt (Tabelle D1). Auf Ebene der Pyren-Annular-Fluoreszenz zeigen sich keine vergleichbaren Behandlungseffekte. Anscheinend beeinflussen Statine keine Cholesterool-Pools, die in unmittelbarer Proteinnachbarschaft lokalisiert sind.

Auf Grundlage der bislang vorgestellten Daten soll ein theoretisches Modell angeführt werden, mit dem sich die diskutierten Befunde umfassend erklären lassen (Abb. D1). Nach diesem Modell beeinflussen M β CD-Verbindungen in niedriger Konzentration sowohl exofaciale non-Raft- als auch Raft-Cholesterool-Pools, was im Einklang mit den Befunden von Ilangumaran und Hoessli (1998) steht. DPH und TMA-DPH verhalten sich insbesondere sensitiv gegenüber den non-Raft-Domänen, da sie in ihrem membranären Lokalisationsbereich womöglich strukturell von diesen umgeben sind. Das erklärt die Modulation der DPH- und TMA-DPH-Anisotropie als auch des Amyloideffekts auf diese beiden Anisotropie-Parameter unter Cholesterool-Variation mit M β CD und seinen Cholesterool-Komplexen. Die Pyren-Excimerbildung reagiert hingegen primär sensibel auf Cholesterool-Veränderungen im Raft-Pool, wird aber in seinem Verteilungs- und Diffusionsverhalten eventuell auch durch Modulationen in non-Raft-Pools beeinflußt, so daß in der Kombination beider Effekte nur ein schwacher Einfluß von M β CD auf die Pyren-Bulk-Fluoreszenz und den assoziierten Amyloideffekt resultiert (Abb. D1). In hoher Konzentration vermag M β CD auch konstitutives non-Raft-Cholesterool aus dem cytofacialen Membranblatt zu depletieren. Demgegenüber modulieren Statine möglicherweise exofacial ausschließlich Raft-Cholesterool-Domänen und beeinflussen insofern in hohem Maße den Parameter der Pyren-Bulk-Fluoreszenz als auch den A β -Effekt in diesem Bereich, ohne Einflüsse auf die DPH- und TMA-DPH-Anisotropie und den zugehörigen Amyloideffekt zu nehmen (Abb. D1). Unklar bleibt das Ausmaß der strukturellen Cholesteroolbeeinflussung durch Statine im cytofacialen Leaflet, wengleich wir insbesondere für Simvastatin einen derartigen Effekt deutlich zeigen konnten.

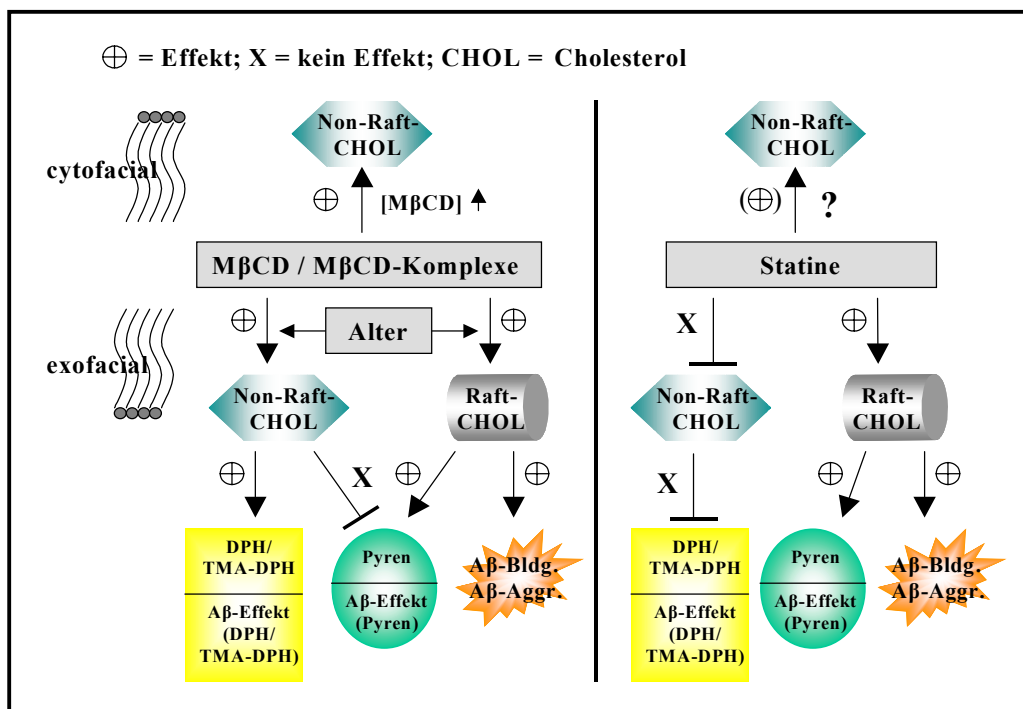


Abb. D1. Beeinflussung unterschiedlicher Membrancholesterol-Pools durch MβCD und seine Cholesterol-Komplexverbindungen, Statine, sowie den physiologischen Alterungsprozess. Verschiedene Cholesterol-Domänen nehmen dabei auf einzelne membranäre Prozesse und lokale Fluiditätsparameter einen differentiellen Einfluß. MβCD beeinflusst in hohen Konzentrationen sowohl exofaciale Raft- als auch non-Raft-Pools, wohingegen Statine womöglich nur exofaciale Raft-Domänen modifizieren. DPH und TMA-DPH reagieren sensibel gegenüber Cholesterolveränderungen in non-Raft-Pools, während Pyren Strukturveränderungen in Raft-Pools detektiert. Exofaciale Raft-Domänen sind gleichfalls Orte der zellulären Aβ-Bildung. + = Effekt; x = kein Effekt.

4.3 Beeinflussung von Membranstruktur und Physikochemie: Das Alter

Mit zunehmendem Alter kommt es zu einer Einlagerung von Cholesterol ins exofaciale Membranblatt von SPM und somit zu einer Netto-Zunahme des Membrancholesterol-Gehalts bzw. der Cholesterol/Phospholipid-Ratio (Tabelle D1). Diese Daten sind in der Literatur vielfach bestätigt worden (Igbavboa et al., 1996; Eckert et al., 2000, 2001b; Wood et al., 2002). Die Cholesterol-Akkumulation bedingt eine deutliche Zunahme der Gesamt- und Leaflet-DPH-Anisotropie, wobei insbesondere das exofaciale Membranblatt rigidisiert wird (Tabelle D1, D3). Die Zunahme der DPH-Anisotropie im cytofacialen Leaflet von SPM im Alter deutet auf altersabhängige strukturelle Modifikationen in diesem Leaflet hin, die nicht mit einer Cholesterol-Anreicherung assoziiert sind. Der Amyloideffekt auf die DPH-Gesamtanisotropie sowie auf die DPH-Leaflet-Anisotropien von SPM wird im Alter erniedrigt (Eckert et al., 2001b; Müller et al., 2001).

Im Hinblick auf altersassoziierte Veränderungen der TMA-DPH-Anisotropie liefert die Literatur zum Teil gegensätzliche Ergebnisse (Tabelle D3). Je nach Membranpräparation wird

im Alter von steigenden, fallenden, sowie unveränderten Anisotropie-Werten berichtet (Tabelle D3). Auch wir finden an SPM alter Mäuse im Vergleich zu Jungtieren nahezu unveränderte TMA-DPH-Anisotropie-Werte, jedoch verringerte $A\beta$ -Effekte auf diesen Anisotropie-Parameter (Tabelle D1). Die berichteten Unterschiede sind sehr wahrscheinlich ursächlich in der Art des verwendeten Gewebes begründet. So konnten Eckert et al. (2001b) auch für die Parameter der Pyren-Bulk-Fluoreszenz und der Pyren-Annular-Fluoreszenz Gewebe-spezifische Unterschiede in den altersbedingten Veränderungen dieser Parameter feststellen. Die Pyren-Bulk-Fluoreszenz an Maushirn-Mitochondrien blieb im Alter unverändert, wohingegen mit zunehmendem Alter an synaptosomenhaltigen Fraktionen und SPM eine deutliche Zunahme der Pyren-Bulk-Fluoreszenz beobachtet wurde (Tabelle D3), die auch wir mit unseren Daten an SPM und Ganzhirnmembranen bestätigen konnten (Tabelle D1). Die Pyren-Annular-Fluoreszenz sowie die Amyloideffekte auf beide Pyren-Fluoreszenz-Parameter bleiben in unseren Messungen an SPM und Ganzhirnmembranen der Maus mit zunehmendem Alter unverändert (Tabelle D1). Der zweite dieser beiden Befunde reproduziert ebenfalls frühere Daten von Eckert et al. (2001b). Im Unterschied zu den hier dargestellten Ergebnissen konnten Eckert et al. (2001b) allerdings eine Zunahme der Pyren-Annular-Fluoreszenz an SPM im Alter zeigen.

Infolge der altersbedingten Veränderungen der DPH- und TMA-DPH-Anisotropie als auch der Pyren Fluoreszenz lässt sich spekulieren, daß mit zunehmendem Alter exofaciales Cholesterol sehr spezifisch sowohl in non-Raft- als auch in Raft-Domänen eingelagert wird (Abb. D1). Sicherlich gibt es dabei qualitative Unterschiede zwischen der physiologischen Cholesterol-Akkumulation im Alter und der eher unspezifischen Cholesterol-Anreicherung durch M β CD-Cholesterol-Komplexe, so daß das Modell in Abb. D1 hier auf seine Grenzen stößt.

Sehr interessant erscheint die Assoziation von Membrancholesterol-Gehalt und Pyren-Bulk-Fluoreszenz. Es mag auf den ersten Blick verwunderlich erscheinen, daß mit Zunahme der exofacialen Cholesterolmenge (z.B. im Alter) auch das Pyren Fluoreszenz-Signal zunimmt. Umgekehrt läßt sich an SPM durch exofaciale Cholesterolreduktion (z.B. durch Statine) die Pyren-Bulk-Fluoreszenz erniedrigen. Abb. D2 gibt hierzu eine mögliche Erklärung.

Im Gegensatz zur DPH-Sonde basiert das Meßsignal bei Pyren-Messungen nicht auf einem Rotationsprozess des Fluorophors, sondern auf einer lokalen bzw. Diffusions-kontrollierten Kollision von angeregten Pyren-Monomeren, deren Anregungszustand im Vergleich zu angeregten DPH-Molekülen eine wesentlich größere Lebensdauer aufweisen (siehe 2.6). In SPM junger Mäuse ist Pyren vorrangig in der Core-Region und den Endbereichen der

Fettsäureketten lokalisiert, so daß einzelne Monomere räumlich isoliert vorliegen können. Durch exofaciale Cholesterolanreicherung in der gealterten Membran wird Pyren von seinen exofacialen Lokalisationsplätzen weiter in den Core-Bereich der Membran gedrängt, in dem sich nun pro Volumeneinheit mehr reaktionsfähige Moleküle befinden, die miteinander kollidieren können (Abb. D2).

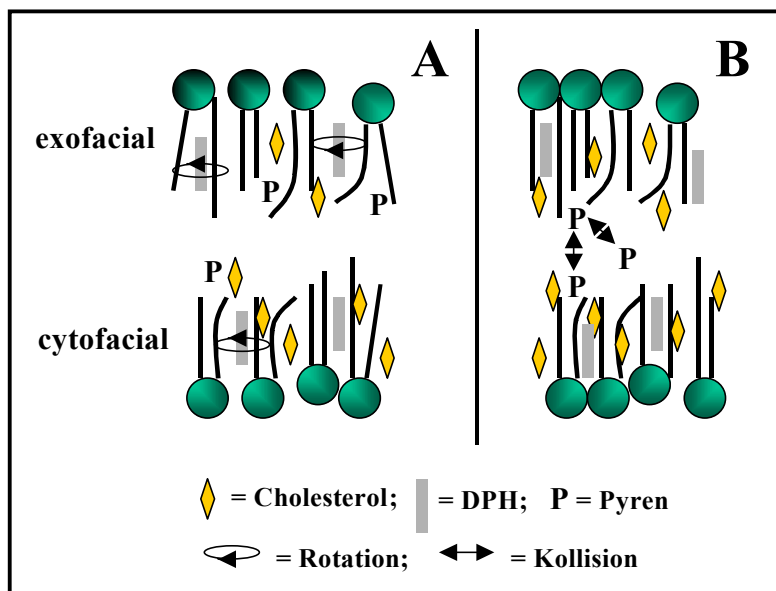


Abb. D2. Modell zum Verteilungsverhalten von Pyren in SPM von jungen (A) und alten (B) Mäusen. Durch exofaciale Cholesterol-Akkumulation im Alter werden Pyren-Moleküle von ihren membranären Lokalisationsplätzen verdrängt. In Konsequenz kumulieren Pyren-Monomere auf engerem Raum in der core-Region der Membran und bilden dort durch Kollision vermehrt Excimere.

Dieses Modell verliert seine Gültigkeit in Ganzhirnmembranen, bei denen es sich im Gegensatz zu SPM nicht um ein definiertes membranäres Kompartiment handelt. Vor allem im Hinblick auf Behandlungseffekte auf den Parameter der Pyren-Fluoreszenz gibt es somit deutliche Abweichungen zwischen beiden Membranpräparationen, die in Tabelle D2 zusammengefaßt sind. Besonders auffällig sind die gegensätzlichen Effekte von M β CD und seinen Komplexverbindungen auf die Pyren-Bulk-Fluoreszenz von Ganzhirnmembranen und SPM. Man kann davon ausgehen, daß Pyren sich in der Gesamtmembran-Fraktion unspezifischer verteilt als in SPM. Eine Cholesterol-Depletion mit M β CD erhöht hier womöglich das Raumangebot zur Diffusion von Pyren-Monomeren und damit die Excimer-Bildungsrate. Umgekehrt ist vorstellbar, dass eine massive und relativ unspezifische Cholesterol-Anreicherung der Ganzhirnfraktion eine vermehrte Isolation einzelner Pyren-Monomere bedingt, die somit keinen Kollisionspartner finden. Unter vergleichbaren methodischen Bedingungen lassen sich Ganzhirnmembranen infolge ihres geringeren

Cholesterolgehalts prozentual wesentlich stärker mit Cholesterol beladen als SPM. Denkbar ist auch, daß M β CD-Cholesterol-Assoziat nach der Inkubation trotz Auswaschprozeß teilweise in der Membranmatrix verbleiben und somit das Phasenverhalten von Pyren zusätzlich mitbestimmen.

Tabelle D2. Unterschiedliche Einflüsse von Cholesterol-Modulatoren auf Pyren-Fluoreszenz-Parameter an Ganzhirnmembranen und SPM.

	Ganzhirnmembran		SPM	
	Pyren-Bulk-Fluoreszenz	A β -Effekt (Pyren Bulk)	Pyren-Bulk-Fluoreszenz	A β -Effekt (Pyren Bulk)
M β CD	++	0	-	+
M β CD/CHOL - Komplex	--	0	(+)	(-)
Lovastatin	--	-	--	-
Simvastatin	--	-	0	-
Pravastatin	--	--	--	0

++ = starke Zunahme; + = Zunahme; -- = starke Abnahme; - = Abnahme; 0 = kein Effekt; CHOL = Cholesterol. Effekte in Klammern sind nur schwach ausgeprägt. Da die Effekte auf die Pyren-Annular-Fluoreszenz jeweils nur sehr gering waren, sind sie hier nicht dargestellt.

4.4 Beeinflussung von Membranstruktur und Physikochemie durch das Alter, M β CD und Statine: Pathophysiologische Relevanz im Rahmen der Alzheimer Demenz

Bis heute ist unklar, inwieweit die Alzheimer'sche Erkrankung tatsächlich mit spezifischen Veränderungen im Gehalt und der Verteilung von zellulärem Cholesterol und anderen Lipiden im Gehirn assoziiert ist. Sehr interessant ist allerdings die Feststellung, daß die zwei wesentlichen Risikofaktoren der sporadischen Alzheimer Demenz - das Alter und der apoE4-Genotyp - eine gleichartige Veränderung in der membranären Verteilung von Cholesterol induzieren: sie erhöhen spezifisch den Gehalt an exofacialem Membrancholesterol in SPM. So belegt eine erst kürzlich veröffentlichte Studie von Hayashi et al. (2002) eine hochsignifikante Cholesterol-Akkumulation im exofacialen Membranblatt von SPM humaner apoE4-knockin-Mäuse im Vergleich zu apoE3-knockin-Mäusen und Wildtyp-Mäusen. Unsere Humandaten belegen einen gleichartigen Effekt des apoE4-Genotyps auf die submembranäre Cholesterolverteilung von kortikalen SPM, wengleich wir zwischen Kontroll- und

Alzheimer-Patienten keine signifikanten Unterschiede im Gehalt an exofaciale Membrancholesterol zeigen konnten (siehe unten). Wie zuvor beschrieben bedingen auch M β CD-Verbindungen und Statine eine Modulation der Leaflet-Cholesterolverteilung in SPM, was diese Substanzen in der Alzheimer Forschung zu bedeutsamen Targets macht.

Zahlreiche *in vitro* Befunde an Zellkultursystemen belegen eine effektive Reduktion der A β -Bildung unter Cholesterolentzug mit M β CD und Statinen (Simons et al. 1998; Frears et al., 1999; Fassbender et al., 2001; Kojro et al., 2001) (siehe 1.4.5.3). Umgekehrt lässt sich der zelluläre Amyloid-Load durch externe Cholesterobeladung erhöhen, und die Spiegel an nicht-amyloidogenem sekretierten sAPP α gehen nachhaltig zurück (Bodovitz, Klein, 1996; Racchi et al., 1997; Frears et al., 1999). Derartige Verschiebungen im Prozessierungsmuster von APP sind anscheinend gekoppelt an Aktivitäts-Shiftings von APP-schneidenden Sekretasen wie ADAM 10 (Kojro et al., 2001) und erfordern *in vitro* sehr starke Variationen (ca. Faktor 5-10) des endogenen zellulären Cholesterospiegels (Frears et al., 1999). Wenngleich es einige Hinweise darauf gibt, dass die enzymatische Aktivität verschiedener APP-schneidender Sekretasen in Caveolin-haltigen Membran-Pools lokalisiert ist (Ikezu et al., 1998; Nishiyama et al., 1999), so weist die Mehrzahl der aktuellen Veröffentlichungen auf eine APP-Prozessierung in membranären exofacialen Raft-Domänen hin. So kolokalisieren sowohl APP, A β , amyloidogene Spaltprodukte von APP wie CTF β , als auch die β -Sekretase BACE-1 sowie Funktionseinheiten der γ -Sekretase wie PS-1 in derartigen nicht-caveolären intrazellulären Membrandomänen (Lee et al., 1998; Morishima-Kawashima, Ihara, 1998; Hayashi et al., 2000; Riddell et al., 2001; Tun et al., 2002; Wahrle et al., 2002; Eehalt et al., 2003). Die enzymatische Aktivität der γ -Sekretase als auch die Raft-Assoziation der β -Sekretase sind dabei besonders Cholesterol-sensibel, d.h. nur unter Bedingungen hoher membranärer Cholesterol-Spiegel werden beide Enzyme zellulär aktiviert (Riddell et al., 2001; Wahrle et al., 2002) (Abb. D3). Vermutlich wird BACE-1 weiterhin durch Interaktion mit Raft-assoziierten GPI-verankerten Proteinen in seinem Funktionsstatus reguliert (Tun et al., 2002; Sambamurti et al., 1999), wohingegen die α -Sekretase ihre volle Aktivität in cholesterolärmeren non-Raft-Domänen erlangt (Kojro et al., 2001; Eehalt et al., 2003) (Abb. D3). Durch physiologische oder externe Modulation des Membrancholesterol-Gehalts lässt sich somit wahrscheinlich sekundär über die Beeinflussung der strukturellen Funktionalität und Integrität spezifischer Membranbereiche die Prozessierung membranständiger Proteine wie APP beeinflussen (Galbete et al., 2000; Golde, Eckman, 2001; Marx, 2001; Wolozin, 2001).

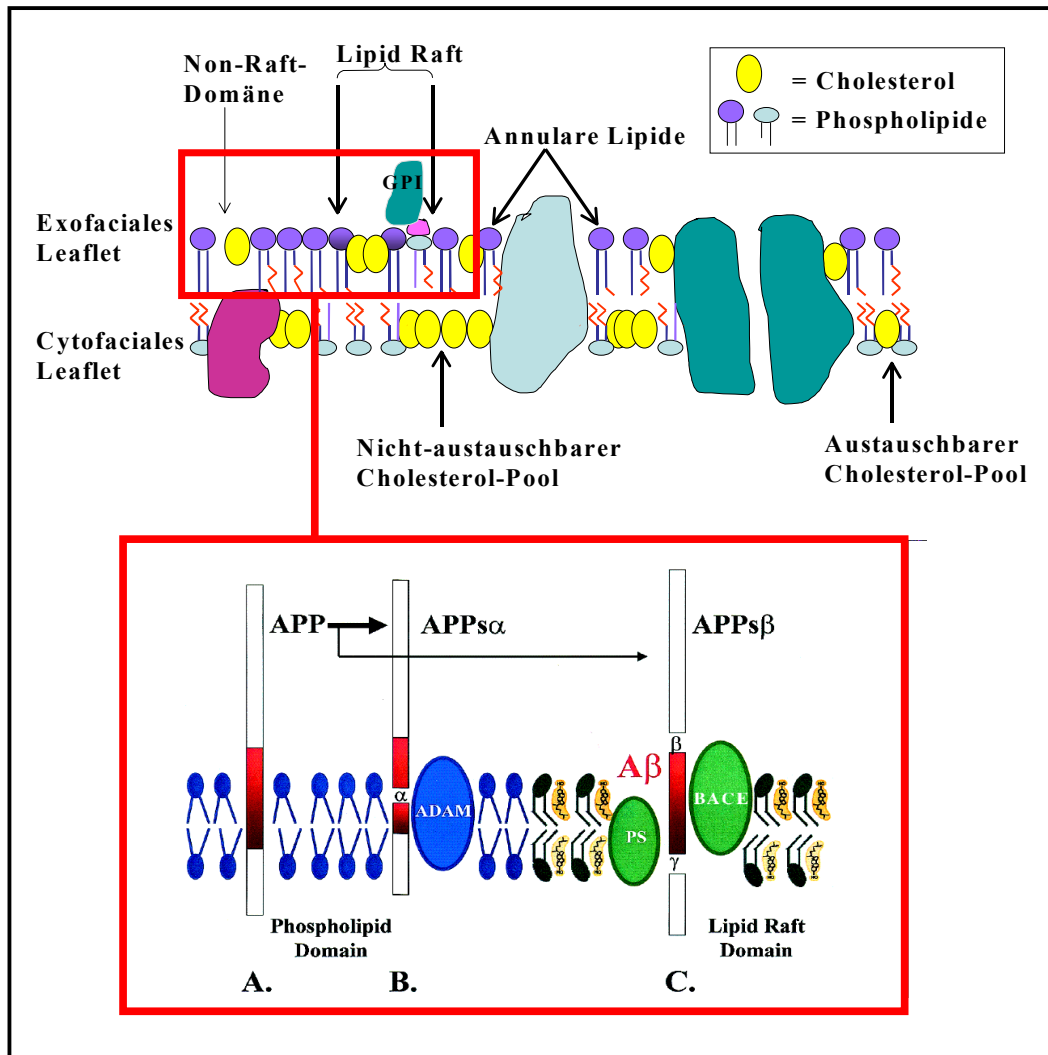


Abb. D3. Membranäre Prozessierung von APP. Die amyloidogene APP-Spaltung läuft innerhalb von Membrankompartimenten vermutlich in cholesterolreichen exofacialen Raft-Domänen (C) ab, in denen die β - und die γ -Sekretase ihre Aktivität entfalten. Cholesterolärmere Phospholipid-Domänen (A,B) sind hingegen die Lokalisationsbereiche der aktiven α -Sekretase. Durch Cholesterol-Modulation kann man den Funktionszustand der einzelnen Enzyme in ihren membranären Plattformen variieren. Nach Schroeder et al., 2001; Wolozin, 2001.

Dieses Modell verbindet kausal unsere Befunde zu Statin- und Cyclodextrin-induzierten Verschiebungen in der membranären Cholesterolverteilung mit deren *in vitro* Kapazität, die amyloidogene APP-Prozessierung effektiv zu unterdrücken. Eine Reduktion der exofacialen Cholesterolmenge bedingt danach sowohl unter M β CD- als auch unter Statin-Behandlung eine Verschiebung der APP-Prozessierung in cholesterolärmere non-Raft-Domänen, in denen unter katalytischer Aktivität der α -Sekretease vermehrt sAPP α und andere nicht-amyloidogene Spaltprodukte entstehen (Abb. D1, D3). Im Fall von Simvastatin, das in unseren Versuchen keine Reduktion der exofacialen Cholesterolmenge in SPM verursachte, spielt eventuell die direkte Beeinflussung von Raft-Strukturen auf Proteinebene, wie man sie aus den Flotillin-Daten vermuten kann, eine wichtige Rolle. Umgekehrt führt die exofaciale Cholesterol-

Beladung zur funktionellen Aktivierung von β - und γ -Sekretase, die in cholesterolreichen Rafts APP katalytisch schneiden (Abb. D1, D3). Diese Modellvorstellung läßt sich weiterhin sehr gut mit der Theorie von Simons und Eehalt (2002) arrangieren, nach der Rafts unter bestimmten physiologischen bzw. pathophysiologischen Bedingungen zu größeren Funktionsplattformen verclustern und erst dadurch aktiviert werden. Womöglich beeinflusst der Membrancholesterol-Gehalt selbst das Koaleszenz-Verhalten dieser Domänen, in dem er das dynamische Fließverhalten von Membranlipiden variiert (Hao et al., 2001).

Bislang war man weithin davon ausgegangen, daß der gleichartige pharmakologische Effekt von M β CD und einzelnen Statinen auf die APP-Prozessierung *in vitro* vorrangig auf die von beiden Substanzen induzierte nachhaltige Netto-Cholesterol-Senkung zurückgeht. Mit einer derartigen Cholesterol-Senkung lassen sich aber eine Vielzahl von *in vivo* Befunden zum Amyloidstoffwechsel nicht kausal erklären. So reduzieren Atorvastatin und Simvastatin am *in vivo* Tiermodell signifikant den zerebralen A β -Load, ohne den Gesamtcholesterol-Spiegel im Gehirn zu verändern (Fassbender et al., 2001; Petanceska et al., 2002). Vielmehr findet sich eine signifikante positive Korrelation zwischen Plasmacholesterol und zentraler A β -Menge (Refolo et al., 2000; Petanceska et al., 2002). In Analogie zu diesen Ergebnissen lässt sich durch exzessive Cholesterol-Fütterung der A β -Spiegel und die Plaque-Dichte im Gehirn von APP-transgenen Mäusen erhöhen, ohne daß der zerebrale Cholesterolgehalt nachhaltig ansteigt (Refolo et al., 2000; Shie et al., 2002). Umgekehrt kann man im selben Modell die zentrale Amyloid-Deposition durch Gabe eines cholesterolsenkenden Agens wieder rückgängig machen, ohne den Gehircholesterol-Spiegel signifikant zu beeinflussen (Refolo et al., 2001). Auch bei der Auswertung unserer Cholesterol-Fütterungsstudie an Ratten konnten wir trotz hochgradig erhöhter Plasma- und Lebercholesterol-Spiegel in der Verum-Gruppe keine Veränderungen der zerebralen Cholesterolmenge in verschiedenen Hirnarealen nachweisen, was die unabhängige Lipid-Regulation von peripherem und zentralem Kompartiment nachhaltig unterstreicht (Dietschy, Turley, 2001). Die einzige bislang veröffentlichte Studie, die einen Zuwachs im zerebralen Cholesterolgehalt um etwa 40% verbunden mit einer signifikanten Zunahme des A β -Spiegels im Gehirn aufzeigt, wurde von Levin-Allerhand et al. (2002) nach einer Langzeit-Fütterungsstudie über knapp 11 Monate mit vergleichsweise niedrigen Nahrungs-Cholesterolmengen (0.15%) an APP-transgenen Mäusen veröffentlicht.

In der Gesamtheit lassen diese Befunde den Schluß zu, dass *in vivo* Veränderungen in der zentralen APP-Prozessierung bzw. A β -Bildung am Tiermodell *primär nicht* auf eine

Modulation der Gesamtcholesterol-Menge im Gehirn zurückzuführen sind. Daten aus Humanstudien, die retrospektiv einen protektiven Einfluß verschiedener Statine bei der Alzheimer Demenz belegen (Jick et al., 2000; Wolozin et al., 2000), finden folglich auch keine kausale Erklärung in den bislang veröffentlichten Studien zur cholesterolahängigen APP-Prozessierung *in vitro*. Die *in vitro* zur Beeinflussung der amyloidogenen Stoffwechsel-Kaskade benötigten profunden Cholesterol-Modifikationen (Frears et al., 1999) sind *in vivo* im Gehirn durch pharmakologische Intervention sicherlich nicht erreichbar und beeinflussen außer dem APP-Metabolismus sehr wahrscheinlich eine Vielzahl weiterer Membranfunktionen. *Der in dieser Arbeit vorgestellten Statin-induzierten Modulation der Cholesterol-Transbilayer-Verteilung, d.h. der Umverteilung von freiem Membrancholesterol ohne nachhaltige Beeinflussung des membranären Gesamtcholesterols, kommt somit womöglich bei der Aufklärung der pharmakodynamischen Mechanismen, die die neuroprotektive Kapazität der Statine in vivo begründen, eine zentrale Bedeutung zu* (siehe Kapitel 4.6). Inwieweit Veränderungen in der submembranären Cholesterol-Verteilung in verschiedenen Hirnarealen auch durch erhöhte periphere Cholesterolzufuhr am Tiermodell induziert werden können und somit eventuell zur verstärkten Amyloidbildung im Gehirn der Tiere beitragen, kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht genau beurteilt werden. Wir konnten an einer sehr geringen Probenanzahl keine Unterschiede in der SPM-Transbilayer-Verteilung von Cholesterol im Kortex von Cholesterol-gefütterten Ratten in Relation zu Kontrolltieren feststellen. Eine exzessive Cholesterol-Fütterung führt unter Umständen auch zu strukturellen Veränderungen an der Blut-Hirn-Schranke, in deren Konsequenz sich der Entzündungs- bzw. Immunstatus des ZNS verändern kann (Mulder et al., 2001).

Eine besondere pathophysiologische Relevanz kommt womöglich den hier vorgestellten Humandaten zur SPM-Cholesterolverteilung im frontalen Kortex von Alzheimer-Patienten im Vergleich zu nicht-dementen Kontrollen zu. Wenngleich wir zwischen AD-Patienten und alters-gematchten Kontroll-Probanden keinen signifikanten Unterschied in der Menge an exofacialelem SPM-Cholesterol im frontalen Kortex feststellen konnten, so ist ein nur geringfügiger Anstieg dieses Parameters in der Alzheimer-Gruppe über die lange Zeitdauer der Krankheitsmanifestation womöglich ausreichend, um die APP-Prozessierung in Richtung Amyloidogenese zu verschieben. Folglich würde es zu einem geringfügigen, aber stetigen Zuwachs der A β -Bildung im Gehirn von Alzheimer-Patienten kommen, der ab einem gewissen Stadium die beobachtbare kumulative Neurodegeneration auslöst. Der in unseren Versuchen nachzuweisende apoE4-Genotyp-Effekt auf die Leaflet-Cholesterolverteilung beeinflusst danach womöglich *initial* die A β -Pathologie. Denkbar ist, daß sich die membranäre

Leaflet-Cholesterol-Homöostase nach Ausbruch der Erkrankung durch bislang unbekannte Faktoren wieder normalisiert. Hier stellt sich somit konkret die Frage nach der Korrelation von statistischer Signifikanz und physiologischer Relevanz. Dabei ist auch zu beachten, daß der frontale Kortex mit fortschreitender Krankheitsprogression bei AD erst relativ spät in Mitleidenschaft gezogen wird. Untersuchungen an anderen Hirnarealen wie dem Hippokampus würden insofern die Aussagekraft unserer Ergebnisse womöglich verändern, allerdings waren derartige Messungen infolge zu geringer vorhandener Gewebemengen praktisch nicht durchführbar. Nicht auszuschließen ist weiterhin, daß sich im Laufe der Alzheimer Demenz neuronale Cholesterol- bzw. Lipidveränderungen auf submembranärer Ebene (z.B. in Raft-Domänen) vollziehen, die sich nicht auf Leaflet-Ebene manifestieren, aber für die Amyloid-Pathogenese relevant sind.

Im Hinblick auf die Menge an freiem und gesamtem Membrancholesterol weisen die Daten aus der Human-Studie für den frontalen Kortex von Alzheimer-Patienten keine Unterschiede im Vergleich zu Kontrollen auf, was die Befunde von Eckert et al. (2000) weitestgehend bestätigt. Hingegen ist die Cholesterol/Phospholipid (C/P)-Ratio in SPM des frontalen Kortex von Alzheimer-Patienten signifikant erhöht, was ein membranäres Phospholipid-Defizit ausweist. Derartige Reduktionen im Membran-Phospholipidgehalt sind für kortikale Regionen von Alzheimer-Gehirnen nachgewiesen worden (Nitsch et al., 1992; Farooqui et al., 1997; Prasad et al., 1998). Demgegenüber zeigen *post-mortem* Daten von Svennerholm und Gottfries (1994) für verschiedene Hirnareale von Alzheimer-Patienten infolge deutlicher Cholesterol-Reduktionen auch eine Abnahme der C/P-Ratio. Membranveränderungen im Laufe der Alzheimer Demenz sind womöglich in unterschiedlichen Hirnarealen entsprechend deren Vulnerabilität auch unterschiedlich stark ausgeprägt, so daß diese Daten nicht zwangsläufig im Widerspruch zu unseren Befunden stehen.

Auf Ebene der Pyren-Fluoreszenz konnten wir für Alzheimer-Patienten keine Unterschiede in Relation zur Kontrollgruppe finden, wohl aber auf Ebene der DPH-Anisotropie. Hier sind die Gesamt- als auch die Leaflet-DPH-Anisotropien von kortikalen SPM bei dementen apoE4/4-Trägern signifikant höher als bei nicht dementen apoE2- und apoE3-Trägern, was auf spezifische AD-assoziierte Membranveränderungen im Bereich der Phospholipid-Fettsäurereste in dieser Region schließen lässt. Eine Zunahme der DPH-Anisotropie wurde für humane Gesamtmembranen des Hippokampus bereits vorher beschrieben (Eckert, 2000). In der Literatur gibt es noch weitere Hinweise auf veränderte Fluiditätseigenschaften von Hirnmembranen bei Alzheimer-Patienten, auch hier sind allerdings Unterschiede zwischen verschiedenen Hirnregionen evident (Tabelle D3).

Tabelle D3. Beeinflussung von Membranfluiditäts-Parametern verschiedener Membranpräparationen durch das Alter, die Alzheimer Demenz (AD) und den membranären Amyloid-Effekt.

		Alter	AD	A β
DPH-Anisotropie	↑	Wood et al., 1989 (1); Miyamoto et al., 1990 (5); Viani et al., 1991 (3); Müller et al., 1995 (4); Igbavboa et al., 1996 (1); Sugawa et al., 1996 (2); Eckert, 2000 (1,4); Kirsch et al., 2002 (1,4)	Mecocci et al., 1996 (10); Scheuer et al., 1996 (11); Eckert, 2000 (13)	Müller et al., 1995 (4,5,15); Müller et al., 1998 (11,12); Müller et al., 2001 (1,4,8); Eckert, 2000 (1,4,7,8,11,12,13); Kirsch et al., 2002 (1,4)
	↓			
	=	LeBel, Bondy, 1991 (6)	Zubenko, 1986 (13); Hajimohammedreza, Brammer, 1990 (14); Scheuer et al., 1996 (12); Eckert, 2000 (11,12)	Avdulov et al., 1997a (2)
TMA-DPH-Anisotropie	↑	Yu et al., 1992 (9); Choi, Yu, 1995 (2); Sugawa et al., 1996 (2)		Eckert 2000 (1,4,11,12,13); Kirsch et al., 2002 (1,4)
	↓	Eckert, 2000 (1,4)	Zubenko, 1986 (13)	
	=	LeBel, Bondy, 1991 (6); Kirsch et al., 2002 (1,4)	Eckert, 2000 (11,12,13)	
Pyren-Fluoreszenz	↑	Eckert, 2000 (1,4,7); Eckert et al., 2001b (1,4,7); Kirsch et al., 2002 (1,4)		Aksentev et al., 1995 (2); Avdulov et al., 1997a (2); Mason et al., 1999 (2); Chochina et al., 2001 (2); Eckert, 2000 (7,8); Eckert et al., 2001b (7,8)
	↓			Binkova et al., 1990 (3)
	=	Eckert et al., 2001b (8)		Eckert, 2000 (1), Eckert et al., 2001b (1); Kirsch et al., 2002 (1,4)

(1) = SPM Maushirn; (2) = SPM Rattenhirn; (3) = Synaptosomen Rattenhirn; (4) = Ganzhirn Maus; (5) = Ganzhirn Ratte; (6) = P2-Fraktion Rattenhirn; (7) = P2-Fraktion Maushirn, (8) = Mitochondrien Maushirn; (9) = Mitochondrien Rattenleber; (10) = kortikale Mitochondrien human; (11) = parietaler Kortex human; (12) = frontaler Kortex human; (13) = Hippokampus human; (14) = Kortex human; (15) = Ganzhirn human. ▲: Zunahme; ▼: Abnahme; = : unverändert.

In der Zusammenfassung der oben diskutierten Daten erhöht Cholesterol durch Interaktion mit APP-schneidenden Proteinen in spezifischen Membrandomänen die zelluläre Amyloidbildung. Doch Cholesterol interferiert nicht allein mit der A β -Bildung und der membranären APP-Prozessierung, es beeinflusst in unterschiedlicher Weise auch die membranäre A β -Aggregation sowie die Membranperturbation des murenen Peptids (Abb. D1). Insofern kommt dem Cholesterol eher die Rolle eines „zweischneidigen Schwertes“ im Krankheitsgeschehen der Alzheimer Demenz zu (Joseph et al., 1997).

Bei der Diskussion der Protektionseffekte von Cholesterol gegenüber den zellulären Amyloideffekten an unterschiedlichen Meßsystemen muß man in erster Linie den Aggregationsstatus und die Sequenz des verwendeten Amyloid beta-Peptids beachten. Cholesterol nimmt auf die Prozesse der A β -Fibrillogenese und der A β -Membranperturbation anscheinend *gegensätzliche* Einflüsse, so daß man im Hinblick auf Cholesteroleffekte klar zwischen monomerem, unaggregiertem Amyloid beta-Peptid und bereits aggregiertem, fibrillärem A β differenzieren muß. Monomeres A β an der Membranoberfläche benötigt zur Induktion der Fibrillogenese die Interaktion mit spezifischen Membranlipiden (Yanagisawa et al., 1995; Avdulov et al., 1997b; Choo-Smith et al., 1997; Buchet, Pikula, 2000; Subasinghe et al., 2003), bevor es sich in Membran-gebundener Form an der Zelloberfläche ablagert (Yamaguchi et al., 2000). Auch Cholesterol stellt einen derartigen Induktionskeim der A β -Aggregation dar (Curtain et al., 2001; Kakio et al., 2001; Harris, 2002; McLaurin et al., 2002; Yanagisawa, Matsuzaki, 2002) und fördert somit, womöglich vermittelt über membranäre GM1-Cluster, die toxische Konformationsänderung des Peptids (Kakio et al., 2001, 2003). In Konsequenz bilden sich relativ niedermolekulare lösliche A β -Oligomere und hochmolekulare polymere A β -Fibrillen aus (Podlinsny et al., 1998). Beide Aggregationsformen des Peptids besitzen potente zytotoxische Eigenschaften, in dem sie durch spezifische Membranperturbation und Kanalbildung die Integrität des betroffenen Membrankompartiments zerstören und somit die Zelle mittelfristig in die Apoptose treiben (Lambert et al., 1998; Kawahara, Kuroda, 2000; Lin et al., 2001).

Dieser Perturbations-Prozess lässt sich wiederum durch Erhöhung des Membrancholesterols effizient unterdrücken. In Analogie zu den in dieser Arbeit vorgestellten Daten verringert Cholesterol sowohl in kultivierten Neuronen als auch in PC12-Zellen die zelltoxischen, Calcium-amplifizierenden Effekte von Amyloid beta-Peptid 25-35 (Hartmann et al., 1994; Zhou, Richardson, 1996; Kawahara, Kuroda, 2001) wie auch von A β ₁₋₄₀ und A β ₁₋₄₂ (Arsipe, Doh, 2002). Gleichfalls schwächt Cholesterol die rigidisierenden A β -Membraneffekte an

humanen hippokampalen Neuronen deutlich ab (Eckert et al., 2000), was sich kausal über eine Cholesterol-induzierte Veränderung der physikochemischen Membraneigenschaften erklären läßt (Hartmann et al., 1994; Arispe, Doh, 2002; Eckert et al., 2003b). Durch Cholesterol-Einlagerung werden die Packungsdichte der Membranlipide wie auch die Rigidität der Membran erhöht, so dass der Membran-Insertionsprozeß von maturem A β behindert wird und dieses womöglich vermindert membranäre Ionen-Poren wie Calcium-Kanäle ausbilden kann (Mirzabekov et al., 1994; Arispe, Doh, 2002).

Interessanterweise bedingen Cholesterol und A β gleichartige Veränderungen im Hinblick auf die Membranfluidität, indem beide sie erniedrigen. Metabolische Amyloideffekte im MTT-Zellassay werden ebenfalls von Cholesterol imitiert (Abe, Saito, 1999b). Dabei erhöhen und beschleunigen sowohl Cholesterol wie auch A β die Exozytose von MTT-Formazan-Kristallen am exofacialen Blatt der Plasmamembran von PC12-Zellen (Leutz, 2001). Unsere Daten belegen die Vermutung, daß die im MTT-Assay beobachteten Cholesterol- und Amyloideffekte in erster Linie auf eine Veränderung der physikochemischen Membraneigenschaften zurückgehen, was in Konsequenz die im LDH-Assay bei höheren Konzentrationen nachweisbaren zytotoxischen Substanzeigenschaften begründet (Leutz, 2001). In Kombination beider Substanzen vermag Cholesterol im niedrigen Konzentrationsbereich die A β -Effekte im MTT-Assay signifikant abzuschwächen, was auf eine direkte Interaktion beider Agentien im Formazan-Exozytose-Stoffwechselweg an der Plasmamembran schließen läßt. Dabei ist es wichtig, beim Einsatz von M β CD-Cholesterol-Solubilisaten die reinen Cyclodextrineffekte zu berücksichtigen, da M β CD *per se* oberhalb bestimmter Konzentrationen einen Einfluß auf die MTT-Reduktion zeigt (Abe, Saito, 1999b; Leutz, 2001). Unsere Befunde an PC12-Zellen erhärten somit nachhaltig die Hypothese, daß Cholesterol die membranären A β -Effekte durch Modulation der Membranphysikochemie beeinflusst, wenngleich der Begriff der *direkten Zytotoxizität* in diesem Fall für Daten aus dem MTT-Assay unangebracht zu sein scheint.

Diese Cholesterol-Hypothese erklärt auch die von uns sowie an anderer Stelle berichteten Befunde, die zeigen, dass cholesterolreiche gealterte Membranen *per se* wesentlich unempfindlicher gegenüber der A β -Membranperturbation reagieren als Membranen junger Mäuse (Eckert et al., 2001b, 2003b). Alte Membranen akkumulieren exofaciales Cholesterol. Im exofacialen Membranblatt ist gleichfalls der Leaflet-Amyloideffekt auf die DPH-Anisotropie am stärksten ausgeprägt, so daß eine Abnahme des exofacialen Amyloideffekts im Alter wesentlich an einer Reduktion der Gesamtempfindlichkeit der Membran gegenüber A β beteiligt sein dürfte. In Übereinstimmung damit lassen die Daten von Eckert et al. (2000)

vermuten, dass bestimmte Hirnareale im Gehirn von Alzheimer-Patienten infolge von Reduktionen des Membrancholesterol-Gehalts überdurchschnittlich sensibel auf A β -Membraninteraktionen reagieren. Auch gibt es Hinweise, dass ein abnormales Splicing von HMG-CoA-Reduktase-Transkripten im frontalen und temporalen Kortex von Alzheimer-Patienten einen Funktionsausfall dieses Enzyms und damit womöglich erniedrigte zelluläre Cholesterolspiegel induziert (Dea et al., 2001). Die mRNA-Expression *per se* scheint dabei unverändert zu sein (Yasojima et al., 2001). Yao et al. (2002) konnten weiterhin zeigen, daß die Gewebespiegel des zytoprotektiven Sterol-Intermediats 22R-Hydroxycholesterol im Hippokampus und frontalen Kortex von Alzheimer-Patienten im Vergleich zu Kontrollen signifikant erniedrigt sind. 22R-Hydroxycholesterol vermag verschiedene oligomere und polymere A β -Peptide über hydrophobe Interaktionen zwischen dem Sterolring-Gerüst und den Aminosäure-Seitenkettenfunktionen des Peptids (Harris, 2002) zu binden und inhibiert damit deren zelltoxische Eigenschaften gegenüber kultivierten Neuronen (Yao et al., 2002).

Insgesamt gesehen zeigt Cholesterol somit ein ambivalentes Verhalten, in dem es die A β -Bildung und die toxische A β -Fibrillogenese fördert, gleichzeitig aber die toxischen Membraneffekte von fibrillärem A β abschwächt. Die Theorie einer ambivalenten Cholesterol-Funktion steht im Einklang mit Daten von Yip et al. (2001), die belegen, dass die Membran-Insertionsfähigkeit von *monomerem* Amyloid beta-Peptid 1-40 an Ganzhirnmembran-Fractionen unter Bedingungen hohen Membrancholesterols erniedrigt, und gleichzeitig die zytotoxische Kapazität von *aggregiertem* Peptid vermindert ist. Unaggregiertes A β verbleibt folglich vermehrt an der Membranoberfläche und bildet dort unter Konformationsänderung fibrilläre Aggregate aus, die die Membran nur schlecht penetrieren können. Curtain et al. (2001) beschreiben unter definierten experimentellen Bedingungen gleichfalls eine verminderte Membraninsertion von monomerem A β_{1-40} mit steigendem Mol%-Gehalt an Cholesterol, wodurch die β -Faltblattbildung von A β an der Membranoberfläche verstärkt wird.

Im Widerspruch dazu zeigen Daten von Ji et al. (2001a) an artifiziellen Lipidmembranen mit steigendem Cholesterolgehalt eine *erhöhte* Membran-Insertionsfähigkeit von unaggregiertem A β_{1-40} , die mit der Ausbildung α -helikaler Strukturen und einer Hemmung der fibrillären Aggregation verbunden ist. Zwei weitere Veröffentlichungen weisen zudem auf eine Verminderung der zytotoxischen Amyloideffekte durch Membrancholesterol-Depletion hin (Wang et al., 2001; Subasinghe et al., 2003). So konnten Subasinghe et al. (2003) an synthetischen Lipidmembranen wie auch an SMC-Membranen nach Cholesterolentzug mit

Lovastatin eine verminderte Lipidbindungsfähigkeit verschiedener löslicher und aggregierter Amyloid beta-Peptide wie auch eine damit assoziierte Abnahme der A β -Zytotoxizität zeigen. Zu vergleichbaren Ergebnissen kommen auch Wang et al. (2001) unter Einsatz von M β CD-Verbindungen. Die Diskrepanz zu unseren Meßergebnissen lässt sich eventuell anhand der im Vergleich zu unserem Membranmodell verschiedenartigen Testsysteme erklären. Für die spezifische Interaktion von Amyloid beta-Peptid mit Lipidmembranen sind eine Vielzahl von determinierenden Faktoren wie Ionenstärke, pH-Wert, Peptidsequenz und Aggregationsstatus, Temperatur, Inkubationsbedingungen als auch die Lipidzusammensetzung und strukturelle Beschaffenheit des membranären Test-Kompartiments von entscheidender Bedeutung (Mason et al., 1999; Curtain et al., 2001; Subasinghe et al., 2003). In Abhängigkeit ihrer Kettenlänge und Aggregation können sich verschiedene Amyloid-Peptide sehr differentiell in der Membran verteilen (Mason et al., 1999; Wood et al., 2002). Weiterhin wurden in der Arbeit von Subasinghe et al. (2003) keine Fluiditätsmessungen, sondern *Bindungsstudien* mit membrangebundenen A β -Aggregaten durchgeführt. Ganz entscheidend bei der Beurteilung des Einflusses einer Cholesterol-Modulation auf den membranären Amyloid-Stoffwechsel scheint die Frage zu sein, welche Membrancholesterol-Pools man unter bestimmten Meßbedingungen tatsächlich erfaßt.

Inwieweit unterschiedliche Membrancholesterol-Pools wie Raft- oder non-Raft-Domänen in die Prozesse der A β -Fibrillogenese und Membranperturbation involviert sind, ist nicht bekannt. Womöglich sind die membranären A β -Effekte vor allem gegenüber membraninkorporierten non-Raft-Pools sensibel, wohingegen die A β -Aggregation sensitiv gegenüber Cholesterolveränderungen in an der Membranoberfläche lokalisierten Raft-Pools reagiert (Abb. D1). So belegen aktuelle *in vitro* Befunde von Kakio et al. (2003), daß der membranäre A β -Aggregationsprozess an *Raft-ständigen* GM1-Domänen initiiert wird. Vorstellbar ist allerdings auch, daß ein und derselbe Cholesterol-Pool beide Prozesse in unterschiedlicher Art und Weise beeinflusst.

Interaktionen zwischen Cholesterol und A β bzw. APP treten in einer Vielzahl von zellulären Kompartimenten wie dem ER, dem Golgi-Komplex, Endosomen, oder auch der PM auf. Cholesterol zyklisiert intrazellulär in einem frequentierten Kreislauf zwischen Plasmamembran und frühen membranären Kompartimenten (Liscum, Underwood, 1995; Schroeder et al., 2001) und kolokalisiert in diesem Zyklus in spezifischen Transport-Domänen wie Lipid-Rafts mit APP und intrazellulärem A β (Runz et al., 2002; Eehalt et al., 2003; Shie et al., 2003), dessen Bildung und Maturation es somit unmittelbar zu beeinflussen

vermag. Unabhängig von einer indirekten Modulation des A β -Metabolismus durch eine Cholesterol-induzierte Veränderung der Membran-Physikochemie deuten die Befunde von Yao et al. (2002) auf eine direkte Wechselwirkung von Cholesterol und A β in membranären Kolokalisationsbereichen hin, die womöglich bereits in frühen intrazellulären Kompartimenten wie dem Golgi-Komplex pathologische Relevanz im Rahmen der Alzheimer Demenz erlangt.

So konnten Galbete et al. (2000) an neuronaler und glialer Zellkultur zeigen, daß Cholesterol die posttranslationale Glykosylierung von APP im sekretorischen Pathway moduliert und somit gleichfalls die Zugänglichkeit der α -Sekretase zu seinem Substrat verändert. In ähnlicher Weise modifiziert Lovastatin in Asp-2 transfizierten HEK 293-Zellen die Glykosylierung der β -Sekretase und dispergiert somit das Enzym von seinem Substrat APP, ohne einen Einfluß auf die enzymatische Aktivität der β -Sekretase *per se* zu nehmen (Sidera et al., 2002). Umgekehrt erhöht Cholesterol die Kolokalisation von APP und Asp-2 in membranären Raft-Domänen und führt beide Proteine kompartimentell zusammen (Sidera et al., 2002). Eine kausale Verschaltung von intrazellulären Cholesterol-Pools und intrazellulärer A β -Genese belegen auch die bereits zuvor diskutierten Daten von Puglielli et al. (2001, 2003), die eine Assoziation von Cholesterolester-Spiegeln und A β -Load in mutanten CHO-Zellen zeigen. Eine deutsche Arbeitsgruppe konnte kürzlich nachweisen, daß die intrazelluläre APP-Prozessierung und Presenilin-Lokalisation sensibel gegenüber einer Inhibition des Cholesterol-Transports von späten endozytotischen Kompartimenten zum ER reagieren (Runz et al., 2002). So induzierte die Transport-Blockade eine Anreicherung von PS1 und PS2 in spezifischen Cholesterol-Transportorganellen sowie eine Verschiebung im Aktivitätsmuster der β - und γ -Sekretase, verbunden mit einer erhöhten Produktion von A β ₁₋₄₀ und A β ₁₋₄₂ (Runz et al., 2002). In Analogie dazu akkumulieren auch Niemann-Pick Typ C-Zellen aggregiertes Amyloid beta-Peptid in späten endosomalen Kompartimenten, in denen es mit überschüssigen Mengen an Cholesterol kolokalisiert (Yamazaki et al., 2001). Das in diesen Zellen defekte NPC-1 Protein übernimmt wesentliche Funktionen im zellulären Cholesterol-Transport zwischen ER und endozytotischen Organellen und ist gleichfalls an der Steuerung der intrazellulären Raft-Dynamik und Cholesterol-Sortierung beteiligt (Lusa et al., 2001). Weiterhin gibt es Hinweise darauf, daß auch das Sterolderivat 17 β -Estradiol, dem im Rahmen der post-menopausalen Estrogen-Therapie ein protektiver Einfluß auf die Pathogenese der Alzheimer Demenz zugeschrieben wird (Tang et al., 1996), am zellulären *in vitro* Modell die A β -Generation durch eine Modulation des APP-Transports im sekretorischen Pathway

vermindert (Greenfield et al., 2002). Dieser Mechanismus mag ursächlich an der im transgenen Tiermodell beobachteten Reduktion des Amyloid-Loads unter Estrogen-Gabe beteiligt sein (Zheng et al., 2002). Zudem zeigen aktuelle Human-Daten an Alzheimer-Patientinnen eine inverse Korrelation von 17β -Estradiol- und $A\beta_{1-42}$ -Spiegeln im CSF der Probanden (Schonknecht et al., 2001).

Diese Daten weisen zusammengefaßt darauf hin, daß *anscheinend nicht der Gesamtcholesterol-Menge der Zelle per se, sondern vielmehr der zellulären Kompartimentierung und Verteilung von endogenem Cholesterol die primäre Rolle bei der Steuerung der zellulären $A\beta$ -Produktion zukommt* (Urmoneit et al., 1998). *Unsere in vivo und in vitro Daten gliedern sich in diese Überlegung sehr gut ein und geben Anlaß zu der Vermutung, dass Substanzen, die regulativ in eine gestörte neuronale Cholesterol-Homöostase bei AD eingreifen, womöglich potente Wirkstoffe in der Therapie dieser Demenz sind.* Dabei ist allerdings zu beachten, daß Cholesterol und $A\beta$ in einem bidirektionalen Verhältnis zueinander stehen und ihren zellulären Metabolismus gegenseitig beeinflussen (Koudinov, Koudinova, 2001). Cholesterol moduliert den $A\beta$ -Metabolismus, gleichfalls determiniert aber auch $A\beta$ den zellulären Cholesterol-Transport (Liu et al., 1998; Michikawa et al., 2001; Igbavboa et al., 2003). So zeigen Zellstudien, daß $A\beta$ die ApoE- und LDL-Lipoprotein-Internalisation an hippokampalen Neuronen bzw. PC12-Zellen erhöht (Beffert et al., 1998; Janciauskiene et al., 1999). Demgegenüber belegen andere Arbeiten einen verstärkten $A\beta$ -induzierten Cholesterol- und Lipid-Efflux aus kultivierten Neuronen (Liu et al., 1998; Michikawa et al., 2001). Diese divergierenden Aussagen gehen womöglich auf Unterschiede im Aggregationsstatus und der Sequenz des verwendeten Peptids zurück. Igbavboa et al. (2003) konnten kürzlich an Astrozyten eine unterschiedliche Beeinflussung der Cholesterol-Homöostase im Golgi-Komplex für frisches und gealtertes $A\beta_{1-42}$ -Peptid zeigen. Frisches $A\beta$ erhöhte signifikant den Cholesterolgehalt des Golgis, gealtertes erniedrigte ihn. Für frisches Peptid wurde weiterhin ein signifikant erniedrigter Zellmembran-Cholesterolgehalt, ein erhöhter intrazellulärer ApoE-Spiegel, als auch eine gehemmte Phosphatidylcholin-Phospholipase-D-Aktivität (PC-PLD) gefunden (Igbavboa et al., 2003). Womöglich wird unter dem Einfluß von löslichem $A\beta$ durch eine verminderte Aktivität der am Cholesterol-Efflux beteiligten PC-PLD vermehrt PM-Cholesterol über Raft-Vesikel in den Golgi-Komplex transportiert (Igbavboa et al., 2003). Aggregiertes $A\beta_{1-42}$ -Peptid induziert demgegenüber differentielle Effekte.

Es ist unklar, durch welche genauen Mechanismen Amyloid beta-Peptid das Verteilungs- und Efflux-Verhalten von Cholesterol reguliert, und ob es mit membranären Cholesterol-Transportern wie ABCA1 interagiert. In einer kürzlich veröffentlichten Studie von Wollmer et al. (2003) wird von einem ABCA1-Polymorphismus berichtet, der das Erkrankungsalter und die CSF-Cholesterolspiegel von Alzheimer-Patienten zu modulieren scheint. An Neuroblastoma-Zellen bewirkte die ABCA1-Induktion mit spezifischen Leber-X-Rezeptor-Agonisten eine vermehrte Sekretion von $A\beta_{1-40}$ - und $A\beta_{1-42}$ -Peptid (Fukumoto et al., 2002).

4.5 ApoE - ein Bindeglied zwischen Cholesterol und A β

Warum der apoE4-Genotyp die Krankheitspathogenese der Alzheimer Demenz fördert, kann man bis heute nicht kausal erklären. Naheliegend ist eine Verknüpfung mit der physiologischen Funktion von ApoE im körpereigenen Lipidstoffwechsel sowie eine ApoE-Assoziation mit dem zerebralen Amyloid- und Tau-Stoffwechsel. Wissenschaftliche Befunde weisen auf eine Isoform-abhängige Beeinflussung sämtlicher dieser Stoffwechselwege durch ApoE hin, die in ihrer Gesamtheit den neurodegenerativen Prozess der Alzheimer Demenz zu forcieren vermögen. Eine Vielzahl der Erkenntnisse resultiert dabei aus *in vivo* Studien am apoE-knockout-Modell der Maus.

apoE-knockout-Mäuse zeigen in Konsequenz der mit zunehmendem Alter auftretenden neuropathologischen Läsionen (Gordon et al., 1995; Masliah et al., 1995) nachhaltige Defizite in kognitiven Funktionen wie Gedächtnis und Lernprozessen (Oitzl et al., 1997; Veinbergs, Masliah, 1999; Veinbergs et al., 2000), wenngleich ihr allgemeines Wachstums- und Entwicklungsverhalten nicht wesentlich beeinflusst ist (Moghadasian et al., 2001). Synaptosomen von apoE-knockout-Mäusen sind vermehrt anfällig gegenüber oxidativer Schädigung durch Amyloid beta-Peptid und anderen Stressoren und weisen strukturelle Modifikationen auf, die *in vivo* vermutlich eine synaptische Dysintegrität von Nerventerminalen im Gehirn der Tiere mitbegründen (Lauderback et al., 2001). Diese Befunde unterstreichen die zentrale Funktion von ApoE im Rahmen des zentralen Lipid-Turnovers bei der Erhaltung synaptischer Plastizität (Poirier, 1996). Neben massiven atherosklerotischen Veränderungen in der Peripherie (Plump, Breslow, 1995; Moghadasian et al., 2001), zeigen apoE-knockout-Tiere weiterhin eine zerebrale xanthomatöse Lipidakkumulation (Mato et al., 1999; Walker et al., 1997) und weisen im Gehirn erhöhte Lipidperoxidations-Marker (Pratico et al., 1999; Montine et al., 1999) sowie veränderte

membranäre Phospholipid-Kompositionen (Lomnitski et al., 1997) auf. Auch ist die Immunantwort der Tiere verändert und steht womöglich mit den teilweise defektiven Gedächtnisleistungen der Tiere in kausalem Zusammenhang (Laskowitz et al., 2000).

In Analogie zu apoE-knockout-Mäusen lassen sich im ZNS von Alzheimer-Patienten erhöhte Spiegel an Lipidperoxidations- und Entzündungsmarkern (Markesbery, 1997; Gahtan, Overmier, 1999), wie auch eine veränderte Funktion der BHS nachweisen (Kalaria, Hedera, 1995; Kalaria et al., 1996; De Vries et al., 1997). Der vaskuläre Endothelfilm der BHS ist abluminal von einem Astrozyten-Layer umgeben (Pardridge, 1991). Astrozyten sind im Gehirn die primären Orte der ApoE-Synthese (Pitas et al., 1987) und exprimieren analog den Kapillarendothelzellen den LDL-Rezeptor (Dehouck et al., 1994). Mulder et al. (2001) und Fullerton et al. (2001) konnten zeigen, daß ApoE wesentlich an der Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität der BHS unter Bedingungen hoher exogener Cholesterol-Zufuhr wie auch im Alterungsprozess beteiligt ist. Analog schützt ApoE die funktionelle Konstitution der BHS auch nach zentralen traumatischen Läsionen (Methia et al., 2001) und beeinflusst die Funktions-Integrität der Blut-Nerven-Schranke (Fullerton et al., 2001). So treten durch fettreiche Nahrung induzierte neuropathologische Veränderungen verbunden mit einer erhöhten Permeabilität der BHS nur in apoE-knockout-Mäusen, nicht aber in apoE^{+/+}-Kontroll-Mäusen auf (Mulder et al., 2001). Das legt die Vermutung nah, daß der apoE-Genotyp den Prozeß der Neurodegeneration bei Alzheimer durch Isoform-spezifische Unterschiede in der Fähigkeit des ApoE-Proteins, die BHS-Integrität zu erhalten, beeinflusst. Womöglich ist ApoE4 in dieser Funktion weniger wirksam als ApoE3 und ApoE2. Genotyp-abhängige ApoE-Effekte am Kapillarendothel der BHS sowie anderer Gefäße sind nach diesem Modell eventuell das entscheidende Bindeglied zwischen VD und AD (Mulder, Terwel, 1998; Fullerton et al., 2001) und begründen gleichfalls die Assoziation des ϵ 4-Genotyps mit vaskulären Pathologien wie Atherosklerose oder CAA (Schmechel et al., 1993; Greenberg et al., 1995; Mulder, Terwel, 1998; Sparks et al., 2000). Durch welchen Mechanismus ApoE die Funktionalität der BHS beeinflusst, ist unbekannt. Möglich sind direkte Interaktionen bzw. Signalkaskaden zwischen Kapillarendothel, Basalmembran und Gliamantel (Dehouck et al., 1994) wie auch indirekte Effekte über die Steuerung inflammatorischer Reaktionen durch ApoE (Fullerton et al., 2001).

Konformationsunterschiede der einzelnen ApoE-Varianten bedingen veränderte Lipidbindungs-Eigenschaften der funktionellen Apolipoproteine z.B. gegenüber dem LDL-Rezeptor (Weisgraber et al., 1982), was in Konsequenz eine unterschiedliche Funktionalität und Effektivität der einzelnen ApoE-Isoformen im extrazellulären Lipid-Transport bedingt.

So ist *in vitro* der ApoE-vermittelte Phospholipid- und Cholesterol-Efflux von Astrozyten und Neuronen streng Isoform-abhängig und für ApoE4 am wenigsten effizient (Michikawa et al., 2000; Gong et al., 2002b), was eine *Dysfunktionalität* der ϵ 4-Variante im Rahmen des zellulären Lipidstoffwechsels wahrscheinlich macht (Michikawa et al., 2000). Die Befunde von Michikawa et al. (2000) legen nahe, daß der ApoE-vermittelte Lipid-Efflux unter Beteiligung von membranären Heparansulfat-Proteoglykanen und dem LRP-Rezeptor abläuft. ApoE3 induziert dabei im Vergleich zu ApoE4 die Bildung von ApoE-ärmeren Lipidpartikeln vergleichbarer Größe, die folglich in der Lage sind, eine wesentlich höhere Cholesterol- bzw. Lipidmenge zu transportieren als ApoE4-haltige Lipoproteine (Gong et al., 2002b). Daraus ergibt sich im Gehirn von Alzheimer Patienten im Rahmen von Regenerationsprozessen womöglich eine regionale neuronale Unterversorgung mit synaptischen Lipiden wie Cholesterol, so daß sich langfristig Krankheits-assoziierte Defekte in der neuronalen Plastizität manifestieren (Poirier, 1996). In Analogie zu diesen Befunden zeigen sich Allelspezifische ApoE-Effekte auch auf Ebene neuronaler Restorationsprozesse, wobei ApoE4 die neurotrophen Eigenschaften anderer ApoE-Isoformen kompromittiert (Buttini et al., 1999; Veinbergs et al., 1999; Nathan et al., 2002). So fördern beispielsweise ApoE3-haltige Lipoproteine an kultivierten ganglionären Neuronen das Neuriten-Wachstum, während ApoE4-haltige Lipoproteine den Wachstumsprozess unterdrücken (Nathan et al., 2002).

In einer weiteren möglichen Konsequenz des defektiven bzw. dysfunktionalen zellulären Cholesterol-Fluxes verbleibt in ApoE4-Trägern eventuell vermehrt Cholesterol in membranären Zell-Kompartimenten zurück und wird dort spezifisch in Membran-Pools umverteilt, die Orte der zellulären APP-Prozessierung bzw. Amyloid-Bildung darstellen. In Übereinstimmung mit dieser Vermutung zeigen sowohl apoE-knockout- als auch apoE4-knockin-Mäuse eine exzessive Akkumulation von exofacialem Cholesterol in SPM (Igbavboa et al., 1997; Hayashi et al., 2002). Einen gleichartigen Effekt des apoE4-Genotyps auf die neuronale Cholesterolverteilung konnten auch wir an humanem Kortextgewebe nachweisen (siehe 4.4). Fagan et al. (2002) konnten kürzlich am APP^{V717F}- transgenen Mausmodell zeigen, daß muriners ApoE in Stadien vor der Amyloid-Deposition die intrazelluläre A β -Kompartimentierung moduliert und eine Anreicherung des Peptids in unlöslichen Mikrodomän-Fractionen (DIGs) induziert, so daß ApoE womöglich nach Endozytose die neuronale intrazelluläre A β -Akkumulation in spezifischen Cholesterol-reichen Membran-Domänen direkt beeinflusst (Yang et al., 1999). Diese Befunde lassen auf eine kausale Verknüpfung zwischen defektivem ApoE-Metabolismus und veränderter neuronaler Cholesterol- bzw. A β -Distribution im Gehirn von Alzheimer Patienten schließen.

Auch in peripheren Zellen fördert ApoE als Lipidakzeptor den Cholesterol-Efflux, (Yokoyama, 1998) (siehe 1.2). Die Tatsache, daß apoE4-Träger im Vergleich zu Trägern anderer apoE-Varianten deutlich erhöhte Serum-LDL-Cholesterolspiegel aufweisen (Notkola et al., 1998), deutet gleichfalls auf Funktionsdefizite des Apolipoproteins beim zellulären Cholesterol-Uptake hin. An apoE-knockout-Mäusen konnte dementsprechend ein verminderter selektiver Uptake von HDL-Cholesterolestern in periphere Gewebe wie die Leber nachgewiesen werden (Arai et al., 1999).

Zahlreiche *in vitro* und *in vivo* Befunde zeigen weiterhin wesentliche Interaktionspunkte zwischen ApoE und zellulärem Amyloidstoffwechsel auf. ApoE-Immunoreaktivität konnte in zerebralen Amyloid-Plaques und NFT von Alzheimer Patienten nachgewiesen werden (Namba et al., 1991, Wisniewski, Frangioni, 1992), wo es eventuell als eine Art pathologisches Chaperon die β -Faltblattstruktur von Amyloid beta-Peptid konserviert und damit die Aggregation des Peptids fördert (Wisniewski et al., 1994). *In vivo* Studien an humanem Hirngewebe von Alzheimer-Patienten belegen, daß ApoE sowohl mit fribillärem als auch mit löslichem A β zu assoziieren vermag (Naslund et al., 1995; Fagan et al., 2000). Die mögliche pathologische Relevanz einer derartigen A β /ApoE-Interaktion wird durch die Tatsache untermauert, daß das ϵ 4-Allel, wie bereits erwähnt, ein gemeinsamer Risikofaktor sowohl für AD als auch für CAA bzw. VD ist, in deren Verlauf es zu Ablagerungen unlöslicher A β -Peptide in der Media vorrangig kortikaler Gefäße kommt (Schmechel et al., 1993; Greenberg et al., 1995). Die Bindungs- bzw. Komplexierungsfähigkeit von ApoE gegenüber A β ist streng Isoform-abhängig und in lipidfreier Form für ApoE4 am stärksten ausgeprägt (Strittmatter et al., 1993b; LaDu et al., 1994; Wisniewski et al., 1994). *In vivo* wird ApoE allerdings primär in Form HDL-ähnlicher Lipoproteine sekretiert und kommt insofern physiologisch extrazellulär so gut wie nicht lipidfrei vor (Pitas et al., 1987; Fagan et al., 1999). In Lipoprotein-haltigem Milieu zeigen *in vitro* Studien dementsprechend häufig ein verändertes ApoE-Bindungsverhalten. In Lipid-assoziiierter Form bindet ApoE4 im Vergleich zu ApoE2 und ApoE3 wesentlich schlechter einen SDS-stabilen Komplex mit A β aus (LaDu, et al., 1994, 1995). Das Affinitätsverhalten von ApoE gegenüber A β wird folglich durch die Zustandsform von ApoE unmittelbar determiniert (Tokuda et al., 2000). Durch Interaktion mit A β nehmen verschiedene ApoE-Isoformen unterschiedlichen Einfluß auf die Prozesse der A β -Fibrillogenese wie auch der A β -Clearance.

Die verfügbaren *in vitro* Daten zum Isoform-spezifischen Effekt von ApoE auf die A β -Fibrillogenese sind zum Teil widersprüchlich (zur Übersicht siehe Holtzman, 2001), jedoch

weist die Mehrzahl der Studien für ApoE4 in Relation zu anderen Allel-Varianten den stärksten Aggregations-fördernden Effekt aus (Wisniewski et al., 1994; Golabek et al., 1996; Soto et al., 1996). Im *in vivo* Tiermodell vermindern humanes ApoE3 und ApoE4 in jungen APP_{SW}- und APP^{V717F}-transgenen Mäusen effektiv die frühzeitige fibrilläre Deposition von Amyloid beta-Peptid (Holtzman et al., 1999, 2000). Ab einem Alter von etwa 15-18 Monaten bewirkt ApoE4 dann im Vergleich zu ApoE3 eine stärkere Amyloid-Akkumulation im Gehirn der Tiere (Holtzman et al., 2000; Fagan et al., 2002). Dieser Isoform-spezifische Effekt auf die Amyloidablagerung *in vivo* wurde in weiteren Studien bestätigt (Carter et al., 2001) Auch APP-transgene Mäuse vor einem genetischen apoE-knockout Hintergrund weisen im Vergleich zu apoE^{+/+}-Tieren einen verminderten zerebralen Gehalt an fibrillärem Amyloid wie auch niedrigere A β -Spiegel *per se* auf (Bales et al., 1999; Holtzman et al., 2000, Holtzman, 2001).

Diese Ergebnisse legen den Schluß nahe, daß ApoE die A β -Deposition auch *in vivo* in einer Isoform-abhängigen Weise beeinflusst. Diese Deposition kann letzten Endes in Konsequenz einer vermehrten Bildung und Aggregation, wie auch einer verminderten Degradation von löslichem Amyloid beta-Peptid auftreten. Daten an APP^{V717F}-apoE-knockout-Mäusen weisen darauf hin, daß ApoE eine Rolle in der Regulation der APP-Prozessierung übernimmt und damit einen direkten Effekt auf die zelluläre Amyloidbildung ausübt (Dodart et al., 2002). In Lipoprotein-komplexierter Form nimmt ApoE anscheinend auch Isoform-spezifischen Einfluß auf die zentrale A β -Clearance. Diese wird wahrscheinlich zum einen lokal bzw. ZNS-intern über zelluläre Rezeptoren der LDL-Rezeptor-Familie wie LRP vermittelt (Russo et al., 1998; Beffert et al., 1999b; Yang et al., 1999b; Poirier, 2000), welche abundant im Gehirn expremiert werden (Herz, 2001). Der LDL-Rezeptor wird dabei primär astrozytär, der LRP-Rezeptor primär neuronal expremiert (Herz, 2001). LRP, Cholesterol, ApoE und A β kolokalisieren in senilen Plaques in der Umgebung von aktivierten Astrozyten (Arelin et al., 2002; Burns et al., 2003), wobei die Expression von LRP in diesen Regionen streng ApoE-abhängig ist und folglich einen lokalen astrozytären Clearance-Prozess von A β /ApoE-Lipid-Komplexen wahrscheinlich macht. Zum anderen findet womöglich ein ApoE-vermittelter A β -Transfer vom CSF ins Plasma statt, der *in vivo* am Mausmodell mit einer HWZ von etwa 25 Minuten unter Beteiligung des LRP-Proteins gezeigt wurde (Shibata et al., 2000; Ji et al., 2001b). Ein defektiver ApoE4-vermittelter BHS-Transport von A β (Urmoneit et al., 1997) könnte in diesem Zusammenhang ursächlich an der vermehrten Gefäßablagerung des A β -Peptids bei AD beteiligt sein (Mulder, Terwel, 1998). In der Konsequenz eines ApoE-abhängigen A β -Fluxes in die Peripherie läßt sich durch Reduktion des Plasma-A β -Pools

eventuell über Gleichgewichtsverschiebung der zentrale A β -Load verringern (Wolozin, 2002) (siehe 4.6). Auch in der Peripherie ist ApoE *in vivo* nachweislich an der Amyloid-Clearance beteiligt (Hone et al., 2003).

Wahrscheinlich spielt nicht allein der ApoE-*Typ*, sondern auch die vorhandene ApoE-*Menge* für die Wechselwirkung von ApoE mit A β -Peptid in diesem Clearance-Prozess eine entscheidende Rolle. apoE4-Träger weisen im Vergleich zu Trägern anderer Allel-Varianten deutlich erniedrigte ApoE-Protein-Spiegel sowohl im Plasma (Boerwinkle, Utermann, 1988; Panza et al., 2003) als auch im ZNS auf (Poirier, 1994; Bertrand et al., 1995; Beffert et al., 1999a). Niedrige ApoE-Spiegel in apoE4/4-Trägern bedingen in Konsequenz nach dem *ApoE/Lipid-Recycling-Kaskaden Modell von Poirier* (2000) eine gestörte Clearance von löslichem extrazellulärem A β über den LDL- bzw. LRP-Rezeptor-Pathway und damit eine erhöhte Anzahl unlöslicher extrazellulärer Amyloid-Ablagerungen, die *post-mortem* für den Hippokampus und den Kortex von Alzheimer-Patienten beschrieben wurde. So zeigen Human-Daten von Beffert et al. (1999a), daß in diesen beiden Hirnregionen mit steigender ϵ 4-Frequenz die ApoE-Spiegel fallen und die A β -Spiegel steigen. Der Amyloid-Load im zerebralen Kortex korrelierte auch in einigen anderen Studien mit der Häufigkeit des apoE4-Allels (Schmechel et al., 1993), jedoch gibt es auch *post-mortem* Analysen von AD-Patienten, die keine derartige Assoziation zeigen konnten (Pirtillä et al., 1996). Umgekehrt ist die Plaque-Dichte in hippokampalen und kortikalen Regionen von apoE2-Trägern am niedrigsten (Beffert, Poirier, 1996), was die *in vitro* Befunde zur streng ApoE-Isoform-spezifischen A β -Clearance nachhaltig untermauert (Beffert et al., 1999b). Der A β -Clearance-Prozess wird anscheinend durch A β selbst induziert. So wird *in vitro* die ApoE-Rezeptor-Bindung und Internalisation in Gegenwart von A β verstärkt (Beffert et al., 1998).

ApoE scheint *in vivo* auch mit dem zweiten charakteristischen neuropathologischen Marker der Alzheimer Demenz assoziiert zu sein: den NFT. Eine isoform-spezifische Interaktion von ApoE konnte *in vitro* für das Tau-Protein nachgewiesen werden (Strittmatter et al., 1994). So binden die Isoformen ApoE2 und ApoE3 leichter an matures Tau und verhindern somit womöglich eine pathologische Hyperphosphorylierung des Proteins, wohingegen die Expression von humanem ApoE4 in Neuronen transgener Mäuse eine derartige Hyperphosphorylierung zu induzieren vermag (Tesseur et al., 2000). Kognitive Defizite bei apoE-knockout-Mäusen sind assoziiert mit einer Epitop-spezifischen Hyperphosphorylierung von Tau in der Nähe des Protein N-Terminus, die sich durch muskarinerge M1-Agonisten rückgängig machen läßt (Genis et al., 1999). Gegen eine direkte zelluläre Wechselwirkung von ApoE und Tau spricht allerdings die Tatsache, daß ApoE nicht frei im Cytosol der Zelle

vorkommt. Das macht eine Beteiligung von ApoE an zellulären Signalkaskaden wahrscheinlich, die mit dem Tau-Metabolismus gekoppelt sind. In Zellkultur beeinflusst ApoE isoform-spezifisch den neuronalen Calcium-Flux und damit sekundär das Ausmaß der Tau-Phosphorylierung (Wang et al., 1998). Für ApoE3 und ApoE4 wurde in Fibroblasten zudem gezeigt, daß sie als Einzelsubstanzen oder in Komplexform mit A β die zelluläre Translokation von Proteinkinase C- α (PKC- α) stimulieren (Cedazo-Minguez, Cowburn, 2001). Eine PKC-Dysregulation im Gehirn von Alzheimer-Patienten wird mit der amyloidogenen APP-Prozessierung wie auch mit der Tau-Phosphorylierung in direkten Zusammenhang gebracht. PKC inaktiviert die sogenannte Glycogen Synthase Kinase-3 β (GSK-3 β), die sowohl an der Phosphorylierung von Tau beteiligt ist, wie auch mit PS1 interagiert (Cedazo-Minguez, Cowburn, 2001). Unterschiedliche ApoE-Varianten haben einen differentiellen Effekt auf die GSK-3 β -vermittelte Tau-Phosphorylierung (Cedazo-Minguez, Cowburn, 2001). Neue Studien an Neuronenkulturen deuten weiterhin darauf hin, daß ApoE4 CREB-vermittelt die zelluläre Gen-transkriptionelle Aktivität beeinflusst (Ohkubo et al., 2001).

Über zelltoxische und neuroprotektiv-antioxidative Eigenschaften der ApoE-Isoformen gibt es in der Literatur zum Teil widersprüchliche Aussagen. *In vivo* und *in vitro* Studien deuten jedoch mehrheitlich darauf hin, daß ApoE3 im Gegensatz zu ApoE4 deutlich ausgeprägte antioxidative wie auch neuroprotektive Kapazität besitzt (Miyata, Smith, 1996; Ramassamy et al., 2000), wohingegen ApoE4 im Zellmodell sogar neurotoxisch wirken kann und gleichfalls die Zytotoxizität von A β erhöht (Ma et al., 1996). Neurotoxische Effekte von ApoE4 werden womöglich über den LDL-Rezeptor- oder LRP-Pathway vermittelt und sind unter Bedingungen zellulärer Cholesterolsynthese-Hemmung provoziert (Michikawa, Yanagisawa, 1998). Da die HMG-CoA-Reduktase mit zunehmendem Alter herunterreguliert wird (Volpe et al., 1985), ist die Zelle im Alter sowie unter Bedingungen gehemmter Cholesterolsynthese vermehrt auf die exogene Zufuhr von ApoE-Lipoprotein-inkorporiertem Cholesterol angewiesen. Womöglich macht sich im Verlauf der sporadischen Alzheimer Demenz an dieser Stelle ein Funktionsdefizit der ApoE4-Isoform im Lipidtransport bzw. eine erhöhte zytotoxische Kapazität dieser Allel-Variante bemerkbar (Michikawa, Yanagisawa, 1998).

Post-mortem Studien an Hirngewebe von Alzheimer Patienten belegen für apoE4-Träger erhöhte Spiegel an aktivierten Mikroglia bzw. Astrozyten und weisen insofern auf eine Assoziation von zerebralem Entzündungs- bzw. Immunstatus und apoE-Genotyp hin (Eikelenboom et al., 1998). ApoE4 vermag im Gegensatz zu ApoE3 die A β -induzierte Mikroglia-Aktivierung nicht zu unterdrücken, in deren Folge es unter anderem zur vermehrten Produktion und Ausschüttung von NO kommt (Laskowitz et al., 1998). Neben

seiner vasoaktiven Funktion und seiner Beteiligung als *second messenger*-Substanz an einer Vielzahl neurophysiologischer Prozesse kommt NO als radikalischer Substanz eine wesentliche Rolle als Induktor von oxidativem Stress und damit eine potente neurotoxische Kapazität zu (Law et al., 2001). *In vivo* Studien zeigen, daß ApoE4 gegenüber ApoE3 und ApoE2 eine signifikant erhöhte zelluläre Produktion von NO in Mikroglia verbunden mit einem erhöhten Arginin-Uptake induziert, was in Konsequenz eine nachhaltige Verschiebung der endogenen Redox-Balance der Zelle bedingen kann (Colton et al., 2002a,b). Gleichfalls weisen Studien am Mausmodell eine im Alter erhöhte NOS-Aktivität aus (Law et al., 2003). Bei der pathophysiologischen Bewertung dieser putativ pro-oxidativen Effekte der ApoE4-Isoform im NO-System ist allerdings Vorsicht geboten. Im Gehirn werden drei verschiedene NO-Synthasen exprimiert, deren Funktion im Rahmen neurodegenerativer Prozesse bislang kontrovers diskutiert wird. Vermutlich kommt der induzierten NOS (iNOS) in Mikroglia und Astrozyten eine pathophysiologische Rolle im Rahmen inflammatorischer Reaktionen zu, wohingegen die endotheliale NOS (eNOS) und die neuronale NOS (nNOS) als konstitutive Enzym-Isoformen eine gefäß- und neuroprotektive Funktion übernehmen (Law et al., 2001).

Dem ApoE-Protein wird ebenfalls eine isoform-spezifische Rolle im bei Alzheimer Patienten defizienten Acetylcholin-Stoffwechsel zugeschrieben (Cedazo-Minguez, Cowburn, 2001). Dieses Neurotransmitter-System ist insofern einzigartig im ZNS, als daß es in hohem Maße abhängig ist von der Lipid-Bioverfügbarkeit zur lokalen Synthese von Acetylcholin. So zeigen apoE4-Träger mit AD die größte Abnahme der Acetylcholinesterase-Aktivität im Hippokampus und Kortex sowie den größten Verlust cholinergischer Neuronen im Vergleich zu Trägern anderer apoE-Genotypen (Poirier et al., 1995).

Zusammengefaßt bedingt der apoE4-Genotyp phänotypisch vermutlich eine Protein-Fehl- bzw. Unterfunktion und läßt sich in vielen *in vitro* und *in vivo* Modellen am ehesten mit dem apoE^{-/-}-Genotyp assoziieren. Vieles spricht dafür, daß ApoE kumulativ durch Beeinflussung vielfältiger in die Neurodegeneration involvierter Prozesse das Erscheinungsbild der AD begünstigt (Abb. D4).

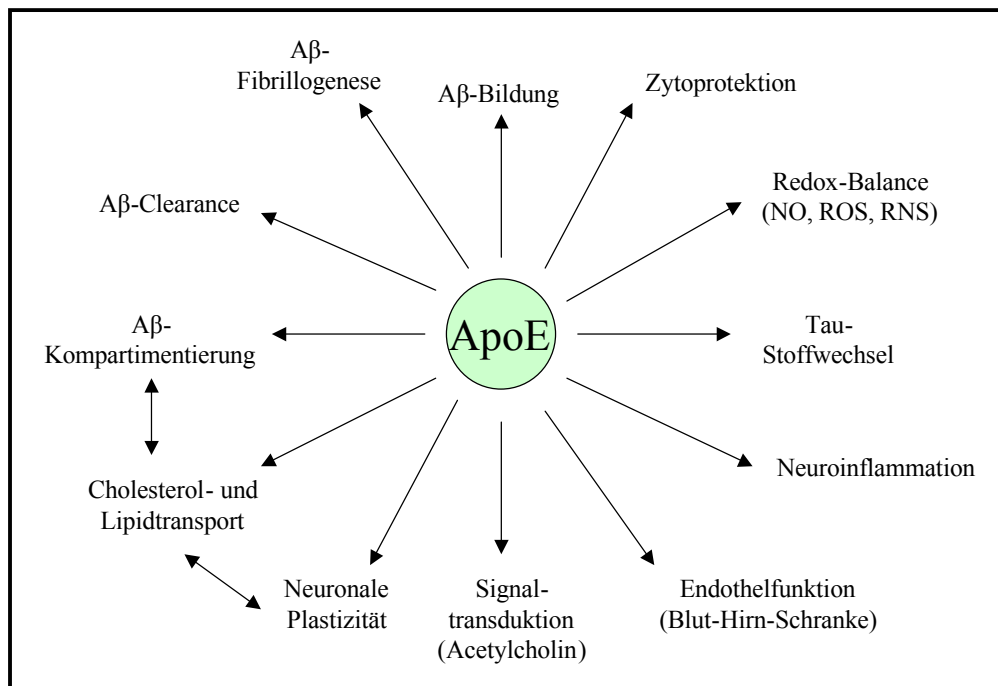


Abb. D4. Interaktionspunkte zwischen ApoE und AD-relevanten pathophysiologischen Prozessen. ApoE weist vielfältige Wechselwirkungen mit unterschiedlichen Effektorsystemen auf, die in ihrer Gesamtheit vermutlich die neurodegenerativen Veränderungen bei AD fördern. Der ApoE4-Isoform kommt dabei anscheinend ein dysfunktionaler Phänotyp zu.

4.6 Wie wirken Statine im Gehirn - ein Rolle für ApoE, NO, und mehrfach ungesättigte Fettsäuren?

Die in der Therapie peripherer Hypercholesterinämien sowie der Prophylaxe von Koronarereignissen eingesetzten Statine unterscheiden sich zum Teil deutlich in ihren physikochemischen Eigenschaften (Tabelle D4). So ist Pravastatin infolge seiner Hydrophilie nicht in der Lage, lipophile Kompartimente durch Diffusions-Übertritt zu überwinden, und erscheint im Gegensatz zu den lipophilen Derivaten Simvastatin und Lovastatin nicht in der Cerebrospinalflüssigkeit ausgewählter Probanden (Tabelle D4). In zwei erst kürzlich veröffentlichten retrospektiven Studien an Hyperlipidämie-Patienten ergab sich überraschenderweise sowohl unter Pravastatin-, Simvastatin- als auch unter Lovastatin-Therapie eine signifikante Reduktion der Alzheimer-Prävalenz, die für Lipidsenker anderer Substanzklassen nicht evident war (Jick et al., 2000; Wolozin et al., 2000). Auch in unseren *in vivo* Versuchen an der Maus konnten wir eine Beeinflussung der zerebralen Lipidhomöostase unter Pravastatingabe beobachten. Diese Befunde werfen die Frage auf, wodurch der zentral-neuroprotektive Effekt des nachweislich nicht Hirn-gängigen Pravastatins zustandekommt. Womöglich sind sekundäre Transduktions-Systeme an der

Übermittlung zentraler Signale beteiligt, die von Pravastatin an der BHS initiiert werden. Inwiefern derartige Signalkaskaden auch für zentrale Stoffwechseleinflüsse von Simvastatin oder Lovastatin verantwortlich sind, ist unklar. Wenngleich beide Wirksubstanzen *direkt* in das ZNS zu penetrieren vermögen (Tabelle D4), so ist nicht auszuschließen, daß auch lipophile Statine ihre ZNS-Effekte zum Teil *indirekt* über das periphere Kompartiment vermitteln. ApoE, MUFs und NO sind möglicherweise an einer Statin-vermittelten Signaltransduktion vom peripheren ins zentrale Kompartiment beteiligt.

Tabelle D4. Pharmakokinetische und metabolische Kenngrößen ausgewählter Statine (nach Igel et al., 2001).

	Lova- statin	Simva- statin	Prava- statin	Atorva- statin	Ceriva- statin ¹⁾
Ursprung	Mikrobiell	Semi- synthetisch	Semi- synthetisch	Synthetisch	Synthetisch
Prodrug-Charakter	Ja	Ja	Nein	Nein	Nein
C log P (Oktanol/H ₂ O)	4.3	4.7	-0.2	4.1	1.5
Hirngängigkeit ²⁾ (P _{app} ³⁾)	Ja (57.9)	Ja (27.7)	Nein (0.178)	n.d.	n.d.
Therapeut. Dosierung (mg)	10-80	5-80	5-40	10-80	0.1-0.8
Resorption (%)	31	60-85	35	30	>98
Bioverfügbarkeit (%)	<5	<5	17	12	60
T _{max} (h)	2.8	1.3-2.4	0.9-1.6	2-4	2.5-3
Terminale HWZ (h)	2.5-15	1.9-15.6	0.8-3.0	11-30	2-3
Clearance (l/h/kg)	0.26-1.1	0.45	0.81	0.25	0.2
Hepatische Extraktion (%)	>70	78-87	66	>70	n.d.

¹⁾ Markrücknahme 2001; ²⁾ nach Botti et al., 1991; ³⁾ P_{app} = in vivo Permeabilitätskoeffizient nach Saheki et al., 1994; C log P = Logarithmus des Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten; n.d. = nicht definiert.

Putative second messenger-Systeme von Statinen

ApoE

Ein wichtiges sekundäres Transduktionssystem von Statinen könnte ApoE sein. In mehreren *in vivo* Cholesterolfütterungsstudien an Nagern, die einen erhöhten zerebralen A β -Load

induzierten, konnte parallel ein nachhaltiger Anstieg der zerebralen ApoE-Spiegel nachgewiesen werden (Sparks et al., 1995; Howland et al., 1996; Levin-Allerhand et al., 2002). Eine vergleichbare Hirnregion-spezifische Herauf-Regulation von ApoE wurde an C57BL/6-Mäusen unter pharmakologischer Behandlung mit 17 β -Estradiol gezeigt (Levin-Allerhand et al., 2001). Es läßt sich spekulieren, daß durch spezifische periphere Stimuli wie Cholesterol- oder Statingabe an der BHS diskrete Signalkaskaden aktiviert werden, die in einer veränderten astrozytären Sekretion von ApoE-Protein resultieren, welches als eine Art sekundärer Bote das Signal ins ZNS transferiert. Dieses Modell läßt sich mit unseren *in vivo* Daten an apoE-knockout-Mäusen in Einklang bringen, bei denen wir im Gegensatz zu apoE^{+/+}-Kontrollmäusen keine Beeinflussung der membranären Cholesterollhomöostase im ZNS unter Lovastatin-Behandlung feststellen konnten. Hier fehlt womöglich ApoE als „Vermittler“ der zentralen Lovastatin-Effekte. Vorstellbar ist auch, daß in apoE-KO-Mäusen infolge eines verminderten neuronalen Cholesterol-Effluxes (Michikawa et al., 2000) intrazellulär eine Down-Regulation der HMG-CoA-Reduktase stattfindet, so daß ausgeprägte Hemmungs-Effekte von Statinen auf die Cholesterol-Synthese ausbleiben. *In vivo* konnte gezeigt werden, daß der anti-atherosklerotische und Gefäß-protective Effekt von Simvastatin die Gegenwart von ApoE-Protein erfordert und in apoE-KO-Mäusen nicht auftritt (Wang et al., 2002). Interessanterweise weisen apoE-knockout-Mäuse profunde Veränderungen in der SPM-Leaflet-Cholesterolverteilung auf und akkumulieren signifikant mehr exofaciales Cholesterol als apoE^{+/+}-Kontrollen bei unverändertem Gesamtcholesterol-Pool (Igbavboa et al., 1997), was eine regulative Funktion von ApoE in diesem Distributions-Prozess wahrscheinlich macht. Eine aktuelle Studie von Igbavboa et al. (2002) weist für SPM von C57BL/6J-apoE^{-/-}-Mäusen gegenüber Kontrollmäusen deutlich erhöhte Spiegel an mehrfach ungesättigten Fettsäuren wie Docosahexaensäure (22:6, ω -3) in der PS-Fraktion aus. MUFs bedingen in Zellkultur an Fibroblasten eine exzessive Cholesterol-Anreicherung im äußeren Membranblatt der Plasmamembran (Kier et al., 1986; Schroeder et al., 1990), so daß sich hier womöglich eine kausale Verknüpfung zu unseren Cholesterolverteilungs-Daten an SPM von Statin-behandelten Mäusen ergibt. Wenn Statine im ZNS tatsächlich eine Modulation der ApoE-Expression bzw. Sekretion induzieren, so vermittelt diese eventuell durch eine sekundäre Beeinflussung der membranären Distribution von mehrfach ungesättigten Fettsäuren eine Cholesterol-Umverteilung zwischen dem exofacialen und dem cytofacialen Membranblatt neuronaler Membranen. Das Modell einer ApoE-assoziierten Statin-Signalkaskade wird durch aktuelle Befunde von Naidu et al. (2002) gestützt, die zeigen, daß Statine an Hirn-Gliazellen die Sekretion von Apolipoprotein E durch eine Inhibierung der

Protein-Prenylierung zu einem frühen Zeitpunkt der Cholesterol-Kaskade inhibieren, und somit womöglich sekundäre ApoE/A β -Interaktionen, die zu vermehrter A β -Deposition führen (siehe 4.5), präventiv verhindern. Diese Zellkultur-Daten implizieren allerdings, dass gewisse Statine das ZNS direkt penetrieren, um dort diesen Effekt auszuüben. Sollte dies *in vivo* nicht der Fall sein, so ist keinesfalls auszuschließen, daß Statine bei einer möglichen Signaltransduktion an der BHS die ApoE-Sekretion in differentieller Weise beeinflussen als im *in vitro* Zellkulturmodell.

MUFs

Der Einfluß von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (MUFs) auf die Transbilayer-Cholesterolverteilung von Zellen *in vitro* läßt die Vermutung zu, daß auch MUFs an einer Statin-vermittelten second messenger-Kaskade im ZNS beteiligt sein könnten. Es gibt Hinweise, daß der membranäre Stoffwechsel von MUFs im Gehirn von Alzheimer-Patienten verändert ist (Corrigan et al., 1998), und daß ein Mangel an Docosahexaensäure im Plasma das Erkrankungsrisiko für die Demenz erhöht (Kyle et al., 1999).

Statine und MUFs zeigen in vielerlei Hinsicht gleichartige pharmakologische Effekte. Dabei darf man nicht vergessen, daß *MUFs* ein zusammengefaßter Begriff für eine Vielzahl ungesättigter Fettsäuren ist, die sich in Kettenlänge sowie Lage (ω -3 oder ω -6) und Anzahl der Doppelbindungen unterscheiden, und insofern je nach Struktur verschiedenartige Funktionen übernehmen können. Diese Tatsache macht eine zusammengefaßte Beurteilung der Substanzklasse im Rahmen dieser Diskussion sehr schwierig. Gemeinsam scheint vielen MUFs zu sein, daß sie analog den Statinen peripher hypolipidämisch wirken, die enzymatische Aktivität der HMG-CoA-Reduktase wie auch die Produktion proinflammatorischer Zytokine inhibieren, und eine Erhöhung der endothelialen NO-Produktion induzieren (zur Übersicht siehe Das UN, 2001a, 2002a). Weiterhin werden einzelnen MUFs wie der Docosahexaensäure - der wichtigsten ω -3-Fettsäure im Gehirn - zentrale neuroprotektive Funktionen zugeschrieben (Das UN, 2001a, 2002a), die womöglich zum Teil auf Restaurationsprozesse an neuronalen Membranen zurückgehen (Yehuda et al., 2002). Mehrfach ungesättigte ω -3- und ω -6- Fettsäuren werden als essentielle Substanzen aus dem Plasma ins Gehirn liberiert (Rapoport et al., 2001; Spector, 2001). Je nach Fettsäureklasse und deren prozentualem Vorkommen in peripher zirkulierenden Triglyceriden, Phospholipiden oder Cholesterolestern, erreichen hierbei freie Fettsäuren entweder direkt oder nach Lipoprotein-Hydrolyse an der BHS das zentrale Kompartiment, in dem kurzkettige Precursor noch weiter zu langkettigen Derivaten umgebaut werden können (Spector, 2001). Durch eine

Reduktion der Triglycerid-Spiegel im Plasma vermögen Statine womöglich peripher den Fettsäure-Pool als Quelle des ZNS-Pools zu reduzieren (Todd, Goa, 1990; Lousberg et al., 2001), jedoch gibt es auch Hinweise, daß einzelne Statine den Plasmaspiegel bestimmter MUFs wie Arachidonsäure zu erhöhen vermögen (Das UN, 2002a). In welcher Weise Statine eventuell den Fettsäure-Transfer direkt an der BHS beeinflussen, ist völlig unklar.

Mehrere *in vitro* Untersuchungen belegen, dass MUFs infolge ihrer räumlichen Struktur bei der Abgrenzung und Ausbildung funktioneller Membrandomänen eine wichtige Rolle spielen (Ahmed et al., 1997; Stulnig et al., 2001; Brzustowicz et al., 2002a, 2002b). Unter exogener Zufuhr bedingt die Einlagerung von ungesättigten Fettsäuren wie Eicosapentaensäure an Zell- und Modellmembranen dabei vornehmlich im cytofacialen Membranblatt eine nachhaltige Veränderung der Lipid-Komposition und eine Zerstörung der funktionellen Integrität von Raft-Domänen (Ahmed et al., 1997; Stulnig et al., 2001). Durch die vermehrte Einlagerung der voluminösen ungesättigten Fettsäureketten in cytofaciale Phospholipide wird die Strukturassoziation zu Cholesterol und bestimmten Signalpeptiden im exofacialen Membranblatt behindert und dadurch die Struktur der Raft-Domänen verändert (Stulnig et al., 2001). Es sind weitere Substanzen wie Sphingomyelinase oder Cholesterol-Oxidase bekannt, die exofacial eine Zerstörung von Raft-Strukturen induzieren und gleichfalls die Kinetik von austauschbaren Cholesterol-Pools verändern (Wood et al., 2002). Das durch Sphingomyelinase liberierte, nicht mehr Raft-assoziierte Cholesterol wird dann anscheinend analog unseren Daten aus dem exofacialen Membranblatt entfernt und intrazellulär zum ER transportiert (Simons, Ikonen, 2000; Wood et al., 2002). Anscheinend vermag nur nicht Raft-assoziiertes Cholesterol den zellulären Bulk-Cholesterolspiegel über den ER-Sensor in dieser Weise zu sensibilisieren, wohingegen sich Raft-Cholesterol indifferent verhält und stärker immobilisiert ist (Simons, Ikonen, 2000).

Im Falle von MUFs sieht man im Hinblick auf diese Theorie einen genau entgegengesetzten Effekt. Die Substanzen bauen Raft-Strukturen ab, induzieren aber *erhöhte* exofaciale Cholesterolspiegel (Schroeder et al., 1990). Daraus läßt sich schlußfolgern, daß die zelluläre Cholesterolverteilung einem sehr komplexen und multifaktoriellen Regulationssystem unterliegt, in das MUFs womöglich auf verschiedenem Wege Einfluß nehmen. In der Literatur sind neben MUFs eine Anzahl weiterer Modulatoren der zellulären Cholesterolverteilung wie ApoE, SCP-2, Caveolin-1, LDLR oder FABPs beschrieben worden (zur Übersicht siehe Wood et al., 1999, 2002). MUFs modulieren auf Gen-Transkriptionsebene die Expression einer Vielzahl von am zellulären Lipid-Stoffwechsel beteiligten Proteine wie HMG-CoA-Reduktase oder Stearoyl-CoA-Desaturase, indem sie

unter anderem die Maturation von SREBPs inhibieren (Ntambi, 1999; Bey et al., 2001; Ntambi, Bene, 2001; Kim et al., 2002). Die Konsequenzen derartiger Interaktionen für die Feedback-kontrollierte zelluläre Cholesterol-Homöostase und -Distribution kann man bis heute nicht abschätzen.

NO

Ein weiterer putativer „second messenger“ von Statinen ist NO (Das UN, 2002b). Die Statin-induzierte Herauf-Regulation der endothelialen NOS, verbunden mit einer erhöhten Ausschüttung von vasorelaxierendem NO, ist dabei Bestandteil des Spektrums der sogenannten Cholesterol-unabhängigen Isoprenoid-vermittelten Statin-Effekte (Laufs et al., 1998; Bellosta et al., 2000; Takemoto et al., 2001) (Abb. D5). Im Hinblick auf eine kausale pathophysiologische Assoziation zwischen VD und AD (Kalaria, Ballard, 1999; Skoog, 2000; Jellinger, 2002) vermögen Statine womöglich indirekt über eine Stimulation der zerebrovaskulären NO-Liberierung einer endothelialen Dysfunktion und Minderdurchblutung bzw. Ischämie in bestimmten Hirnregionen, die sich analog auch bei einem Schlaganfall manifestiert, entgegenzuwirken (Endres et al., 1998; Sheehy et al., 2001). Es gibt Hinweise darauf, daß die eNOS in Hirn-Kapillaren von Alzheimer Patienten unterexpressiert ist, was die Bedeutung eines derartigen Gefäßeffekts nachhaltig unterstreicht (Dahiyat et al., 1999). Die neuroprotektive Funktion der Statine ergibt sich dabei vermutlich aus der Kombination zweier Wirkmechanismen. Neben der Aktivierung der konstitutiven eNOS inhibieren Statine in Astrozyten und Mikroglia gleichfalls die Induktion der iNOS (Pahan et al., 1997), die primär im Laufe entzündlicher Reaktionen aktiviert wird (Sheehy et al., 2001). Durch diesen dualen Effekt läßt sich eine pro-inflammatorische Kaskade im Läsionsgebiet effektiv unterdrücken (Sun et al., 2003).

Die Bedeutung von endothelialelem und neuronalem NO als second messenger-Substanz geht über eine lokale Gefäßfunktion weit hinaus (Law et al., 2001; Das UN, 2002b). So übernimmt konstitutives NO z.B. eine wichtige Rolle in der Steuerung neuromodulatorischer Prozesse im Rahmen von Gedächtnis- und Entwicklungsvorgängen (Law et al., 2001). Eine Beteiligung von NO an der zentralen Regulation der intra- und extrazellulären Lipidhomöostase wurde bislang nicht gezeigt.

Direkte Statin-Effekte

Eine immer größer werdende Anzahl an Veröffentlichungen erweitert kontinuierlich das pleiotrope Wirkspektrum der CSE-Hemmer. Sollten einige lipophile Statine tatsächlich in

pharmakologischen Konzentrationen ins Hirngewebe vordringen, so sind die vornehmlich an *in vitro* Systemen studierten Isoprenoid-abhängigen Statin-Wirkungen vermutlich für die pharmakodynamischen ZNS-Effekte dieser Wirkstoffe mitverantwortlich. Statine inhibieren unter anderem die Maturation von Funktionsproteinen wie *ras p21*, das in einer nachgeschalteten Kaskade z.B. die Expression von sogenannten „bone morphogenetic proteins“ (BMPs) unterdrückt (Das UN, 2001b, Ruocco et al., 2002). BMPs werden wichtige neurotrophe Funktionen in der ZNS-Entwicklung zugeschrieben (Das UN, 2001b). Eine direkte neuroprotektive Funktion der Statine leitet sich auch aus der Isoprenoid-vermittelten Inhibition der Ausschüttung inflammatorischer Zytokine wie TNF α oder IL-6 (Das UN, 2001b) sowie aus der direkten antioxidativen Kapazität der Wirkstoffe ab (Abb. D5). Statin-induzierten Signaltransduktions-Kaskaden, die an der Regulation neuronaler Entzündungsprozesse beteiligt sind, dürfte im Rahmen der Alzheimer Demenz dabei eine besondere Bedeutung zukommen.

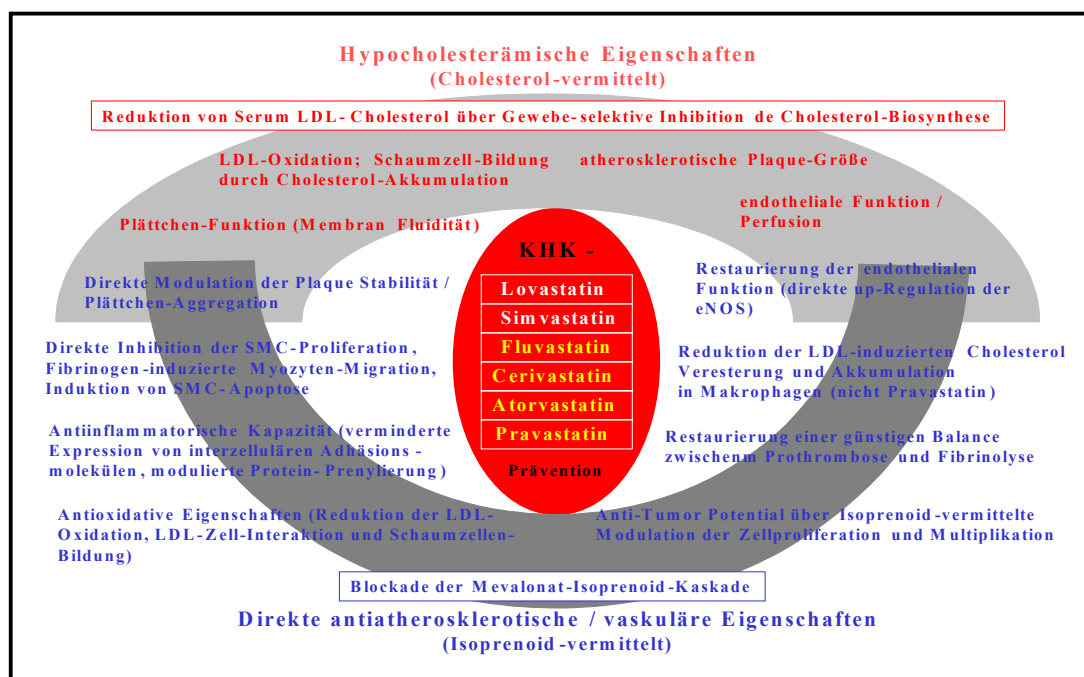


Abb. D5. Cholesterolabhängige und cholesterolonabhängige Statin-Effekte.

Eine kürzlich erschienene Studie an neuronaler Zellkultur zeigt unter Statin-Behandlung eine Isoprenoid-abhängige Tau-Phosphorylierung und Mikrotubuli-Destabilisierung auf (Meske et al., 2003). Dabei inhibiert Lovastatin die Geranylgeranylphosphat-Lipidmodifikation der für die Stabilität des Mikrofilaments mitverantwortlichen RhoA-GTPase, die ohne Prenylierung

in einem dysfunktionalen Zustand verbleibt (Meske et al., 2003). Veröffentlichungen von Fan et al. (2001, 2002) machen demgegenüber für die Tau-Hyperphosphorylierung und Mikrotubuli-Destabilisierung *in vitro* eine zelluläre Cholesterol-Defizienz verantwortlich, welche anscheinend auch die Zell-Viabilität von Neuronenkulturen entscheidend determiniert (Michikawa, Yanagisawa, 1999). Diese Diskrepanz läßt sich womöglich aufgrund von Unterschieden im Alter und Differenzierungsgrad der verwendeten Zellen erklären. Die Regulation der funktionellen Stabilität des Mikrotubuli-Systems unterliegt zudem sehr wahrscheinlich einer Vielzahl von Faktoren. NFT treten z.B. auch im Rahmen der NPC-Typ1-Erkrankung auf, die letzten Endes auf einer zellulären Cholesterol-Dysverteilung beruht (Auer et al., 1995). Gleichfalls haben Tangle-haltige Neuronen deutlich erhöhte zelluläre Cholesterol-Spiegel, was auf eine gestörte zelluläre Feedback-Kontrolle schließen läßt (Distl et al., 2002). Welchen Einfluß Statine auf den Prozess der NFT-Bildung *in vivo* nehmen, läßt sich bislang nicht beurteilen. Die Befunde von Meske et al. (2003) stehen dabei nicht zwangsläufig im Widerspruch zu den berichteten neuroprotektiven Statin-Wirkungen in Humanstudien (Jick et al., 2000; Wolozin et al., 2000). Bei einer milden Inhibierung der Cholesterol-Synthese-Kaskade wird zuerst die Sterol-Schiene „lahmgelegt“, die Bildung ringoffener Isoprenoide wird erst unter Bedingungen starker Inhibition tangiert (Brown, Goldstein, 1980). Die *in vivo* mit einigen Statinen im ZNS erreichbaren Gewebespiegel (Botti et al., 1991) sind zu niedrig, um eine komplette Blockierung der Isoprenoid-Synthese zu bewirken (Meske et al., 2003). Gleichfalls sollten in diesen Konzentrationsbereichen noch keine nachhaltigen Cholesterol-Effekte auf die Zell-Viabilität auftreten, so wie dies von einigen Autoren vermutet wird (Sparks et al., 2002).

Sehr interessant ist die Vorstellung, daß Statine den A β -Spiegel im Plasma senken, und dadurch indirekt die A β -Clearance aus dem ZNS erhöhen (Wolozin, 2002). Buxbaum et al. (2002) konnten zeigen, daß Lovastatin die A β -Menge sowohl in der Zellkultur wie auch im Serum von hyperlipidämischen Patienten effektiv senkt. Die Applikation peripherer, nicht ZNS-gängiger anti-A β -Antikörper bei APP-transgenen Mäusen reduzierte sowohl den freien Plasma-Amyloidspiegel als auch den zerebralen Plaque-Load, was offensichtlich durch eine initiale Umverteilung von zerebralem A β ins Plasma initiiert wurde (Schenk et al., 1999; DeMattos et al., 2001, 2002). *In vivo* Studien belegen, daß Amyloid beta-Peptid durch einen aktiven, Rezeptor-vermittelten Mechanismus unter vermeintlicher Beteiligung von ApoE und Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPGs) (Mulder, Terwel, 1998) über die BHS transportiert werden kann (Mackic et al., 1998; Poduslo et al., 1999; Shibata et al., 2000; Ji et al., 2001b). Folglich läßt sich durch periphere Amyloidreduktion im Sinne einer

Gleichgewichtsverschiebung anscheinend der zentrale Amyloid-Pool verringern. Das würde auch erklären, warum in einigen *in vivo* Cholesterolfütterungsstudien eine direkte Korrelation zwischen Plasmacholesterol und zerebralem Amyloid-Load gefunden wurde (Refolo et al., 2001; Petanceska et al., 2002). A β interagiert mit ApoE an einer Domäne, die auch für die Lipidbindung des Lipoproteins relevant ist (Pillot et al., 1999; Yao, Papadopoulos, 2002). Bei hohen Plasmacholesterol-Spiegeln kommt es dann womöglich zu einer Art kompetitiven Verdrängungsreaktion, so daß A β nicht mehr effizient an ApoE binden kann und in Konsequenz vermindert degradiert wird (Kuo et al., 1999; Friedland, 2002). Die Risikoassoziation von Hypercholesterolämie und AD findet in diesem Modell eine kausale Erklärung (Notkola et al., 1998; Romas et al., 1999; Kivipelto et al., 2001).

Inwieweit die in unseren Untersuchungen beobachteten Einflüsse von Pravastatin, Lovastatin und Simvastatin auf die membranäre Lipidhomöostase von SPM auf indirekte oder unmittelbar im ZNS induzierte direkte cholesterolabhängige oder cholesterolonabhängige Effekte zurückgehen, läßt sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht beurteilen. Zur Klärung dieser Frage sollen in weiteren Untersuchungen die Gewebekonzentrationen einzelner Statine im Gehirn von Mäusen sowie zerebrale mRNA- und Protein-Expressionen an Statin-behandelten Tieren bestimmt werden. Abb. D6 faßt mögliche Statin-Targets im Rahmen der zerebralen Cholesterol-Homöostase noch einmal zusammen. Durch eine Beeinflussung der membranären Cholesterol-Transbilayer-Verteilung durch Statine werden womöglich Raft-Domänen als Orte der zellulären Amyloidogenese abgebaut, wodurch exofaciales Cholesterol vermehrt in den intrazellulären Cholesterol-Regelkreislauf eingeht und am ER-Sensor die Substrat- und Feedback-gesteuerte Aktivität von Enzymen wie HMG-CoA-Reduktase oder ACAT moduliert. Dadurch induzierte sekundäre Cholesterol-Umverteilungen begünstigen womöglich einen nicht-amyloidogenen Stoffwechsel. Die HMG-CoA-Reduktase stellt zudem ein direktes Target der Statine dar.

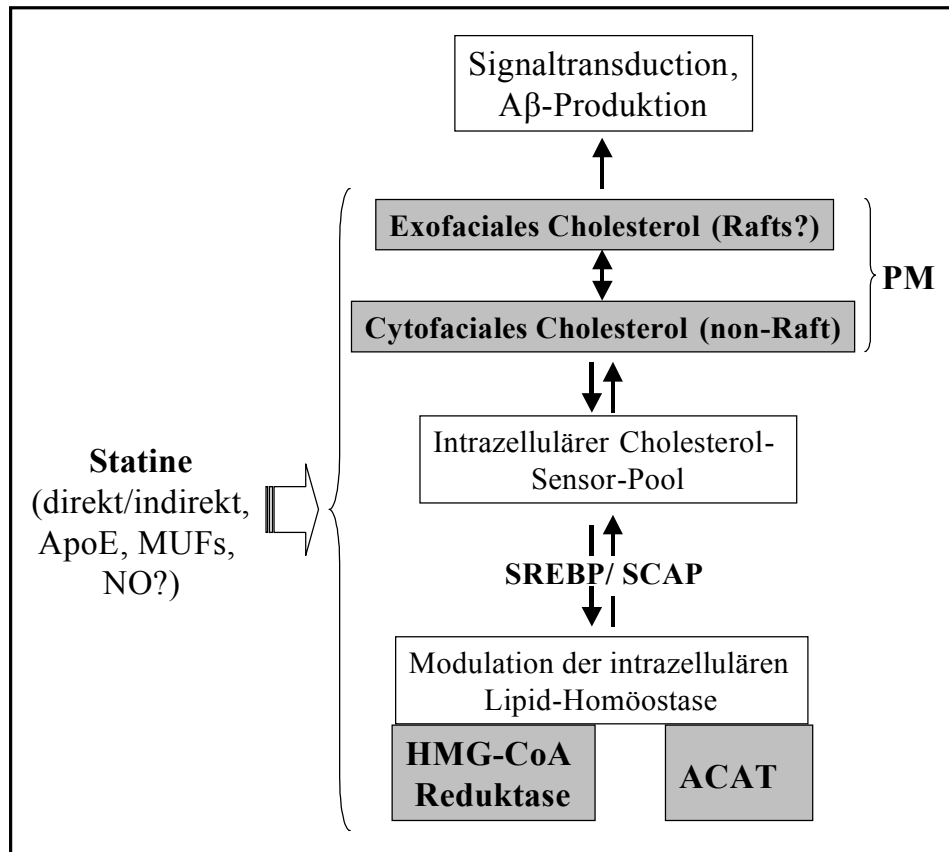


Abb. D6. Mögliche Statin-Einflüsse auf den zellulären Cholesterolfstoffwechsel in Neuronen. Durch diskrete Veränderung der zellulären Cholesterolverteilung und Inhibition der zellulären Cholesterol-Synthese wird die neuronale Aβ-Bildung womöglich reduziert. PM = Plasmamembran.

4.7 Gesamtmodell zur Pathophysiologie der sporadischen Alzheimer Demenz

Im Laufe dieser Diskussion ist deutlich geworden, daß Cholesterolf- und Amyloidstoffwechsel in der Peripherie und im ZNS sowohl intra- als auch extrazellulär in sehr vielfältiger Weise verschaltet sind (Koudinov, Koudinova, 2001). Infolge dieser bidirektionalen Interaktion lässt sich keine endgültige Antwort auf die Frage finden, ob letztendes ein veränderter Lipidstoffwechsel bei Alzheimer Patienten ursächlich die Ablagerung neuropathologischer Stoffwechselprodukte wie Aβ-Fibrillen und NFT induziert (Cholesterolf-Hypothese), oder umgekehrt die exzessive Aβ- und NFT-Deposition den Lipidmetabolismus erst sekundär modifiziert (Amyloid-Hypothese). Das folgende, stark vereinfachte Modell, vereint beide Überlegungen miteinander und bildet einen möglichen pathophysiologischen Kreislauf der sporadischen Alzheimer Demenz ab. Dabei wird ein besonderes Augenmerk auf das Cholesterolf gelegt (Eckert et al., 2003b), was die Relevanz von vielfältigen Veränderungen anderer Lipidklassen wie Gangliosiden oder Phospholipiden

(Wood et al., 2002, 2003) oder die Bedeutung vaskulärer Faktoren im Zuge der Erkrankung (Sparks 1997; Sparks et al., 2000) nicht schmälern soll.

Das Modell in Abb. D7 räumt subzellulären Veränderungen in der Verteilung und Dynamik von spezifischen neuronalen Cholesterol-Domänen eine zentrale Bedeutung im Pathomechanismus der Demenz ein. Diese Veränderungen werden initial durch individuelle Risikofaktoren gefördert. So bedingen Faktoren wie das Alter, der apoE4-Genotyp, oder womöglich auch periphere Stimuli eine Akkumulation von Cholesterol im exofacialen Membranblatt von membranären neuronalen Kompartimenten, die gleichfalls Orte der zellulären APP-Prozessierung sind (Wood et al., 2002). Durch die Cholesteroleinlagerung werden in diesen Bereichen die physikochemischen Membraneigenschaften, die funktionelle Aktivität von Membranproteinen wie auch der Redox-Status der Membran verändert, sowie möglicherweise intrazelluläre Feedback-kontrollierte Transkriptionsprozesse aktiviert (Hartmann, 2001; Simons et al., 2001; Wolozin, 2001). In der Konsequenz wird die APP-Prozessierung in Richtung Amyloidogenese verlagert, so daß es zur vermehrten Bildung von Amyloid beta-Peptid kommt. Dieses wird infolge einer verminderten Aktivität A β -degradierender Enzyme wie Plasmin (Ledesma et al., 2000) sowie A β -transportierender Proteine wie ApoE (Poirier, 2000) nicht effizient aus dem Gewebe entfernt bzw. in Abhängigkeit des peripheren Lipid-Status nicht ausreichend ins Plasma transferiert (Buxbaum et al., 2002). Das A β -Peptid kann unter den vorherrschenden Bedingungen hoher Membrancholesterol-Spiegel sehr schnell aggregieren (Yanagisawa, 2002) und bildet toxische Fibrillen aus, die im folgenden die Membranintegrität im geschädigten Areal z.B. durch Ionenkanal-Bildung zerstören, oxidativen Streß generieren, und eine lokale Entzündungsreaktion auslösen (Pappolla et al., 2002). Weiterhin vermögen die oligomeren Amyloid-Aggregate die zelluläre Cholesterol-Homöostase direkt zu modulieren und induzieren einen erhöhten membranären Cholesterol-Efflux, wodurch sie einerseits ihre eigene toxische Kapazität in einer Art Teufelskreis potenzieren (Gong et al., 2002; Yao, Papadopoulos, 2002), und andererseits möglicherweise den extrazellulären Cholesterol-Turnover im ZNS beeinflussen (Schonknecht et al., 2002). Der veränderte Cholesterol-Status der Zelle bildet wahrscheinlich zusätzlich die Grundlage für eine erhöhte Tau-Phosphorylierung und Mikrotubuli-Depolymerisation, so daß wichtige Transportprozesse im Rahmen synaptischer Plastizitätsvorgänge unterbunden werden (Fan et al., 2001). Sämtliche Ereignisse kumulieren im apoptotischen Neuronenuntergang und einer regiospezifischen neurodegenerativen Symptomatik im Vollbild der Demenz.

Im Hinblick auf die bei AD auftretende selektive neuronale Vulnerabilität besitzt die hier aufgezeichnete Kaskade womöglich nur für ganz bestimmte Hirnareale Gültigkeit. Faktoren, die die selektive Empfindlichkeit determinieren und einzelne Hirnregionen wie beispielsweise das Cerebellum weitestgehend von der Pathogenese ausschließen, sind nicht bekannt. Bestimmte Hirnregionen unterscheiden sich nachweislich in ihrer funktionellen Lipidzusammensetzung (Svennerholm, Gottfries, 1994; Chochina et al., 2001) und sind insofern gegenüber gewissen Stimuli wie Amyloid beta-Peptid vermutlich auch unterscheidlich sensibel (Chochina et al., 2001). Das belegen auch unsere *in vivo* Maus-Studien, in denen z.B. Statine an Cerebellum-Fraktionen andersartige Veränderungen der Lipidhomöostase induzieren als an Kortex-Fraktionen. Die zentralen pathophysiologischen Veränderungen im Verlauf der familiären Form der Alzheimer Demenz mögen zum Teil auf anderen als den hier dargestellten Mechanismen beruhen. Bislang ist unklar, inwiefern APP- und PS1-Mutationen mit Veränderungen im zerebralen Lipidstoffwechsel assoziiert sind.

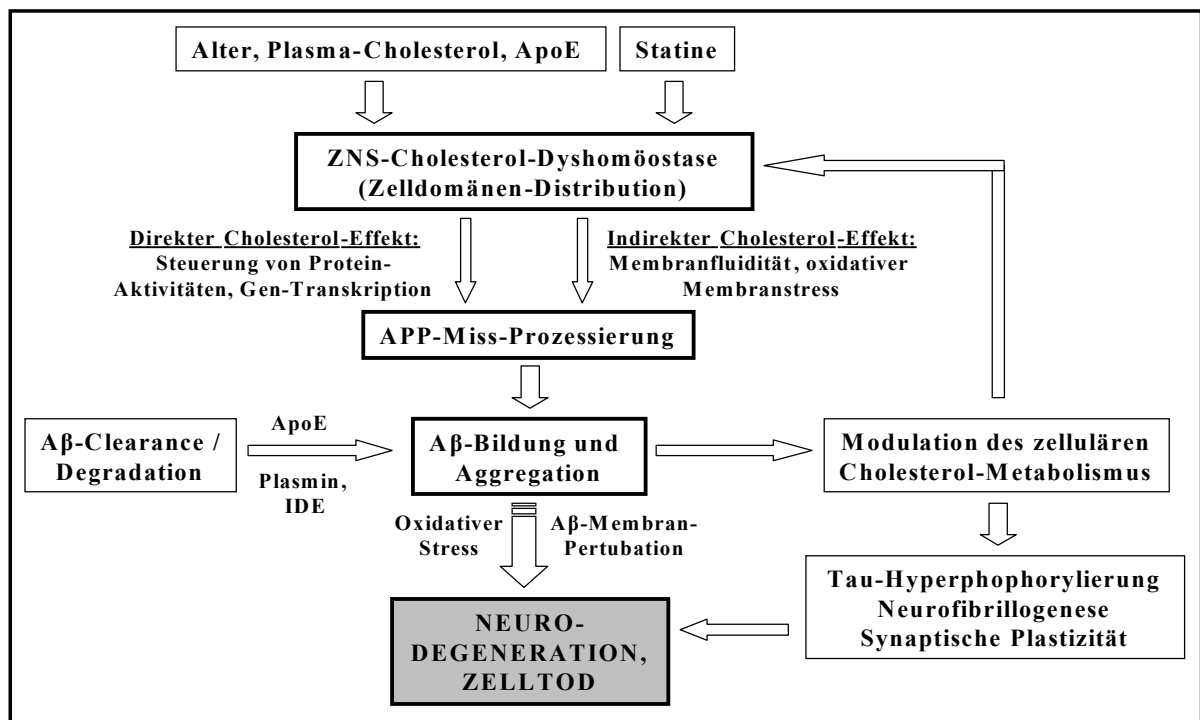


Abb. D7. Vereinfachtes Modell einer möglichen pathophysiologischen Kaskade bei sporadischer Alzheimer Demenz. IDE = insulin degrading enzyme.

4.8 Statine als Alzheimer-Therapeutika?

Zum jetzigen Zeitpunkt rechtfertigt die vorhandene Datenlage keine pharmakologische Intervention mit Statinen an Alzheimer Patienten zur Senkung der Krankheits-Progrediens. Sollte sich in weiteren groß angelegten prospektiven Studien allerdings bestätigen, daß Statine ein direktes neuroprotektives Potential bei AD besitzen und womöglich kausal in pathologische Krankheitsprozesse der Demenz eingreifen (Abb. D7), so ist im Hinblick auf das sehr gute Sicherheitsprofil dieser Wirkstoffe eine Indikationserweiterung der Statine zur Therapie der Alzheimer Demenz durchaus vorstellbar.

5 Zusammenfassung

Die exzessive Bildung und Ablagerung von aggregiertem Amyloid beta-Peptid im Gehirn von Alzheimer Patienten wird allgemein als zentrales Ereignis im Rahmen des Neurodegenerationsprozesses der Alzheimer Demenz betrachtet. Der Amyloid-Stoffwechsel ist dabei in sehr vielfältiger Weise mit dem zellulären Cholesterol-Stoffwechsel verknüpft. Hohe Cholesterolspiegel in spezifischen Membrandomänen wie Lipid-Rafts forcieren sehr wahrscheinlich die zelluläre Produktion als auch die Fibrillogene von Amyloid beta-Peptid. Umgekehrt schützt ein hoher Membrancholesterol-Gehalt aber auch vor den toxischen Effekten von aggregiertem A β . Durch Modulation des Cholesterolgehalts von Hirnmembranen mit M β CD und seinen Cholesterol-Komplexverbindungen *in vitro* sowie mit Statinen *in vivo* konnten wir zeigen, daß beide Substanzklassen verschiedene membranäre Cholesterol-Pools beeinflussen, die gleichfalls an der Vermittlung zytotoxischer Amyloid-Effekte in unterschiedlicher Weise beteiligt sind. Wir konnten weiterhin erstmals nachweisen, daß sowohl hydrophile als auch lipophile Statine *in vivo* einen unmittelbaren Einfluß auf die zerebrale Membrancholesterol-Homöostase nehmen und dabei vermutlich membranäre Raft-Strukturen im exofacialen Membranblatt verändern, die favorisierte Orte der zellulären APP-Prozessierung bzw- Amyloidbildung sind. Aus diesem Wirkmechanismus leitet sich womöglich der für bestimmte Statine berichtete neuroprotektive Effekt bei AD in retrospektiven Humanstudien ab, der sich durch eine reine Cholesterolsenkung in spezifischen Bereichen des ZNS nicht erklären läßt. Ob einzelne Statine in ausreichender Konzentration direkt ins Gehirn vordringen und dort teilweise Isoprenoid-abhängige Signalkaskaden induzieren, oder ihre zentralen Effekte indirekt an der BHS vermitteln, ist unklar. Unsere Daten stützen nachhaltig die Hypothese, daß die sporadische Alzheimer Demenz vergleichbar der Niemann-Pick Typ C-Krankheit auf einer Dysregulation der zellulären Cholesterolverteilung beruht, die durch spezifische Risikofaktoren wie das Alter oder den apoE4-Genotyp gefördert wird. Substanzen, die gezielt in Mechanismen der fehlgesteuerten zellulären Lipid-Distribution und Kompartimentierung eingreifen, sind somit potentielle Wirkstoffe in der Therapie der Alzheimer Demenz.

6 Literaturverzeichnis

Abe K, Saito H (1998) Amyloid beta protein inhibits cellular MTT reduction not by suppression of mitochondrial succinate dehydrogenase but by acceleration of MTT formazan exocytosis in cultured rat cortical astrocytes. *Neurosci Res* 31: 295-305

Abe K, Saito H (1999a) Both oxidative stress-dependent and independent effects of amyloid beta protein are detected by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction assay. *Brain Res* 830: 146-154

Abe K, Saito H (1999b) Cholesterol does not affect the toxicity of amyloid beta fragment but mimics its effect on MTT formazan exocytosis in cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci Res* 35: 165-174

Ahmed SN, Brown DA, London E (1997) On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes: physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent-insoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes. *Biochemistry* 36: 10944-10953.

Ahsan CH, Shah A, Ezekowitz M (2001) Acute statin treatment in reducing risk after acute coronary syndrome: the MIRACL (Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering) Trial. *Curr Opin Cardiol* 16: 390-393

Aksentsev SL, Samoilenko SG, Kaler GV, Konev SV (1995) Effect of proteolysis on the state of lipid phase in rat brain synaptosomal membranes. *Arch Biochem Biophys* 316: 47-51

Alonso AC, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1994) Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 5562-5566

Anderton (B) 1994 Free radicals on the mind. Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Hum Exp Toxicol* 13: 719

Ando S, Tanaka Y, Toyoda nee Ono, Kon K, Kawashima SI (2002) Turnover of synaptic membranes: Age-related changes and modulation by dietary restriction. *J Neurosci Res* 70: 290-297

Ando S, Tanaka Y, Waki H, Fukui F (2001) Synaptic functions and synaptic membrane lipids in the aging brain. *World Rev Nutr Diet* 88: 53-57

Andreason NC, O'Leary DS, Arndt S (1995) Short-term and long-term verbal memory: A positron emission tomography study. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 5111-5115

Arai T, Rinninger F, Varban L, Fairchild-Huntress V, Liang CP, Chen W, Seo T, Deckelbaum R, Huszar D, Tall AR (1999) Decreased selective uptake of high density lipoprotein cholesteryl esters in apolipoprotein E knock-out mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 12050-12055

Arelin K, Kinoshita A, Whelan CM, Irizarry MC, Rebeck GW, Strickland DK, Hyman BT (2002) LRP and senile plaques in Alzheimer's disease: colocalization with apolipoprotein E and with activated astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res* 104: 38-46

- Arispe N, Doh M (2002) Plasma membrane cholesterol controls the cytotoxicity of Alzheimer's disease A β (1-40) and (1-42) peptides. *FASEB J* 16: 1526-1536
- Arispe N, Rojas E, Pollard HB (1993) Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 567-571
- Asai M, Hattori C, Szabo B, Sasagawa N, Maruyama K, Tanuma S, Ishiura S (2003) Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP alpha-secretase. *Biochem Biophys Res Commun* 301: 231-235
- Atwood CS, Martins RN, Smith MA, Perry G (2002) Senile plaque composition and posttranslational modification of amyloid-beta peptide and associated proteins. *Peptides* 23: 1343-1350
- Auer IA, Schmidt ML, Lee VM, Curry B, Suzuki K, Shin RW, Pentchev PG, Carstea ED, Trojanowski JQ (1995) Paired helical filament tau (PHFtau) in Niemann-Pick type C disease is similar to PHFtau in Alzheimer's Disease. *Acta Neuropathol Berl* 90 : 547-551
- Auerbach BJ, Parks JS, Applebaum-Bowden D (1990) A rapid and sensitive micro-assay for the enzymatic determination of plasma and lipoprotein cholesterol. *J Lipid Res* 31: 738-742
- Austen B, Christodoulou G, Terry JE (2002) Relation between Cholesterol levels, Statins and Alzheimer s Disease in the human population. *J Nutr Health Aging* 6: 377-382
- Avdulov NA, Chochina SV, Igbavboa U, O'Hare EO, Schroeder F, Cleary JP, Wood WG (1997a) Amyloid beta-peptides increase annular and bulk fluidity and induce lipid peroxidation in brain synaptic plasma membranes. *J Neurochem* 68: 2086-2091
- Avdulov NA, Chochina SV, Igbavboa U, Warden CS, Vassiliev AV, Wood WG (1997b) Lipid binding to amyloid beta-peptide aggregates: preferential binding of cholesterol as compared with phosphatidylcholine and fatty acids. *J Neurochem* 69: 1746-1752
- Bales KR, Verina T, Cummins DJ, Du Y, Dodel RC, Saura J, Fishman CE, DeLong CA, Piccardo P, Petegnief V, Ghetti B, Paul SM (1999) Apolipoprotein E is essential for amyloid deposition in the APP(V717F) transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 15233-15238
- Barghorn S, Mandelkow E (2002) Toward a unified scheme for the aggregation of tau into Alzheimer paired helical filaments. *Biochemistry* 41: 14885-14896
- Baron GS, Caughey B (2003) Effect of GPI-anchor-dependent and-independent prion protein association with model raft membranes on conversion to the protease-resistant isoform. *J Biol Chem* 278: 14883-14892
- Bastiaanse EM, Hold KM, Van der Laarse A (1997) The effect of membrane cholesterol content on ion transport processes in plasma membranes. *Cardiovasc Res* 33: 272-283
- Battula SB, Fitzsimons O, Moreno S, Owens D, Collins P, Johnson A, Tomkin GH (2000) Postprandial apolipoprotein B48-and B100-containing lipoproteins in type 2 diabetes: do statins have a specific effect on triglyceride metabolism? *Metabolism* 49: 1049-1054

- Bauer KH, Frömmling KH, Führer C (1997) Pharmazeutische Technologie. Govi Velag, Frankfurt
- Bayer TA, Wirths O, Majtenyi K, Hartmann T, Multhaup G, Beyreuther K, Czech C (2001) Key factors in Alzheimer's disease: beta-amyloid precursor protein processing, metabolism and intraneuronal transport. *Brain Pathol* 11: 1-11
- Beffert U, Aumont N, Dea D, Davignon J, Lussier-Cacan S, Poiriere J (1998) Apolipoprotein uptake is increased by beta amyloid peptides and reduces by blockade of the LDL receptor in neurons. *J Neurochem* 70: 1458-1466
- Beffert U, Aumont N, Dea D, Lussier-Cacan S, Davignon J, Poirier J (1999b) Apolipoprotein E isoform-specific reduction of extracellular amyloid in neuronal cultures. *Mol Brain Res* 68: 181-185
- Beffert U, Cohn JS, Petit-Turcotte C, Tremblay M, Aumont N, Ramassamy C, Davignon J, Poirier J (1999) Apolipoprotein E and beta-amyloid levels in the hippocampus and frontal cortex of Alzheimer's disease subjects are disease-related and apolipoprotein E genotype dependent. *Brain Res* 843: 87-94
- Beffert U, Poirier J (1996) Apolipoprotein E, plaques, tangles and cholinergic dysfunction in Alzheimer's Disease. *Ann N Y Acad Sci USA* 777: 166-174
- Bellosta S, Ferri N, Bernini F, Paoletti R, Corsini A (2000) Non-lipid-related effects of statins. *Ann Med* 32: 164-176
- Bernini F, Didoni G, Bonfadini G, Bellosta S, Fumagalli R (1993) Requirement for mevalonate in acetylated LDL induction of cholesterol esterification in macrophages. *Atherosclerosis* 104: 19-26
- Bertrand P, Poirier J, Oda T, Finch CE, Pasinetti GM (1995) Association of apolipoprotein E genotype with brain levels of apolipoprotein E and apolipoprotein J (clusterin) in Alzheimer disease. *Brain Res Mol Brain Res* 33: 174-178
- Bey L, Maigret P, Laouenan H, Hamilton MT (2002) Induction of lipoprotein lipase gene expression in 3T3-L1 preadipocytes by atorvastatin, a cholesterol- and triglyceride-lowering drug. *Pharmacology* 66: 51-56
- Bickel H (1999) Epidemiologie der Demenzen. In: *Alzheimer Demenz - Grundlagen, Klinik und Therapie* (Förstl H, Bickel H, Kurz A, Ed.), Springer-Verlag, Berlin, S. 9-32
- Binkova B, Erin AN, Sram RJ, Topinka J (1990) Lipid peroxidation-induced changes in physical properties of annular lipids in rat brain synaptosomal membranes. *Gen Physiol Biophys* 9: 311-318
- Birkmayer JG (1996) Coenzyme nicotinamide adenine dinucleotide: new therapeutic approach for improving dementia of the Alzheimer type. *Ann Clin Lab Sci*. 26: 1-9
- Bischoff H, Heller AH (1998) Preclinical and clinical pharmacology of cerivastatin. *Am J Cardiol* 82: 18J-25J

Bist A, Fielding PE, Fielding CJ (1997) Two sterol regulatory element-like sequences mediate up-regulation of caveolin gene transcription in response to low density lipoprotein free cholesterol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 10693-10698

Björkhem I, Lutjohann D, Breuer O, Sakinis A, Wennmalm A (1997) Importance of a novel oxidative mechanism for elimination of brain cholesterol. Turnover of cholesterol and 24-S-hydroxycholesterol in rat brain as measured with 1802 techniques in vivo and in vitro. *J Biol Chem* 272: 30178-30184

Björkhem I, Lutjohann D, Diczfalusy U, Stahle L, Ahlborg G, Wahren J (1998) Cholesterol homeostasis in human brain: turnover of 24S-hydroxycholesterol and evidence for a cerebral origin of most of this oxysterol in the circulation. *J Lipid Res* 39: 1594-1600

Blackwell MF, Gounaris K, Barber J (1986) Evidence that pyrene excimer formation in membranes is not diffusion-controlled. *Biochim Biophys Acta* 858: 221-234

Bodovitz S, Klein WL (1996) Cholesterol modulates alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 271: 4436-4440

Boerwinkle E, Utermann G (1988) Simultaneous effects of the apolipoprotein E polymorphism on apolipoprotein E, apolipoprotein B, and cholesterol metabolism. *Am J Hum Genet* 42: 104-112

Bores GM, Smith CP, Wirtz-Brugger F, Giovanni A (1998) Amyloid beta-peptide inhibits Na^+/K^+ -ATPase: tissue slices versus primary cultures. *Brain Res Bull* 46: 423-427

Bosman GJCGM, Engbersen A, Vollaard CH, Bartholomeus IGP, Pistorius AMA, Renkawek K, de Grip WJ (1996) Implications of aging and degeneration-related changes in anion exchange proteins for the maintenance of neuronal homeostasis. *Cell Mol Biol* 42: 905-918

Botti RE, Triscari J, Pan HY, Zayat J (1991) Concentrations of pravastatin and lovastatin in cerebrospinal fluid in healthy subjects. *Clin Neuropharmacol* 14: 256-261

Braak H, Braak E (1991) Demonstration of amyloid deposits and neurofibrillary changes in whole brain sections. *Brain Pathol* 1: 213-216

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254

Breteler MM (2000) Vascular involvement in cognitive decline and dementia. Epidemiologic evidence from the Rotterdam Study and the Rotterdam Scan Study. *Ann N Y Acad Sci* 903: 457-465

Brown BG, Hillger L, Zhao XQ, Poulin D, Albers JJ (1995) Types of change in coronary stenosis severity and their relative importance in overall progression and regression of coronary disease. Observations from the FATS Trial. *Familial Atherosclerosis Treatment Study*. *Ann N Y Acad Sci* 748: 407-417

Brown D (2002) Structure and function of membrane rafts. *Int J Med Microbiol* 291: 433-437

Brown DA, London E (1998) Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14: 111-136

Brown DA, London E (2000) Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem* 275: 17221-17224

Brown MS, Goldstein JL (1980) Multivalent feedback regulation of HMG-CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth. *J Lipid Res* 21: 935-940

Brown MS, Goldstein JL (1997) The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89: 331-340

Brzustowicz MR, Cherezov V, Caffrey M, Stillwell W, Wassall SR (2002a) Molecular organization of cholesterol in polyunsaturated membranes: microdomain formation. *Biophys J* 82: 285-298

Brzustowicz MR, Cherezov V, Zerouga M, Caffrey M, Stillwell W, Wassall SR (2002b) Controlling membrane cholesterol content. A role for polyunsaturated (docosahexaenoate) phospholipids. *Biochemistry* 41: 12509-12519

Buchet R, Pikula S (2000) Alzheimer's disease: its origin at the membrane, evidence and questions. *Acta Biochim Pol* 47: 725-733

Buee L, Hof PR, Bouras C, Delacourte A, Perl DP, Morrison JH, Fillit HM (1994) Pathological alterations of the cerebral microvasculature in Alzheimer's disease and related dementing disorders. *Acta Neuropathol (Berl)* 87: 469-480

Burdick D, Soreghan B, Kwon M, Kosmoski J, Knauer M, Henschen A, Yates J, Cotman C, Glabe C (1992) Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's beta amyloid peptide analogs. *J Biol Chem* 267: 546-554

Burns MP, Noble WJ, Olm V, Gaynor K, Casey E, LaFrancois J, Wang L, Duff K (2003) Co-localization of cholesterol, apolipoprotein E and fibrillar Abeta in amyloid plaques. *Brain Res Mol Brain Res* 110: 119-125

Butterfield DA, Yatin SM, Varadarajan S, Koppal T (1999) Amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress, neurotoxicity, and Alzheimer's disease. *Methods Enzymol* 309: 746-68

Buttini M, Orth M, Bellosta S, Akeefe H, Pitas RE, Wyss-Coray T, Mucke L, Mahley RW (1999) Expression of human apolipoprotein E3 or E4 in the brains of ApoE^{-/-} mice: isoform-specific effects on neurodegeneration. *J Neurosci* 19: 4867-4880

Buxbaum JD, Cullen EI, Friedhoff LT (2002) Pharmacological concentrations of the HMG-CoA reductase inhibitor lovastatin decrease the formation of the Alzheimer beta-amyloid peptide in vitro and in patients. *Front Biosci* 7: a50-a59

Buxbaum JD, Geoghagen NS, Friedhoff LT (2001) Cholesterol depletion with physiological concentrations of a statin decreases the formation of the Alzheimer amyloid Abeta peptide. *J Alzheimers Dis* 3: 221-229

- Cai H, Wang Y, McCarthy D, Wen H, Borchelt DR, Price DL, Wong PC (2001) BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons. *Nat Neurosci* 4: 233-234
- Cameron PL, Ruffin WJ, Bollag R, Rasmussen H, Cameron RS (1997) Identification of caveolin and caveolin-related proteins in the brain. *J Neurosci* 17: 9520-9535
- Capell A, Grunberg J, Pesold B, Diehlmann A, Citron M, Nixon R, Beyreuther K, Selkoe DJ, Haass C. (1998) The proteolytic fragments of the Alzheimer's Disease-associated presenilin-1 form heterodimers and occur as a 100-150 kDa molecular mass complex. *J Biol Chem* 273: 3205-3211
- Cappai R, White AR (1999) Amyloid beta. *Int J Biochem Cell Biol* 31: 885-889
- Cardebat D, Demonet JF, Puel M, Angiel A, Viallerd G, Celsis P (1998) Brain correlates of memory processes in patients with dementia of Alzheimer's type: A SPECT activation study. *J Cerebral Blood Flow Metabol* 18: 457-462
- Carter DB, Dunn E, McKinley DD, Stratman NC, Boyle TP, Kuiper SL, Oostveen JA, Weaver RJ, Boller JA, Gurney ME (2001) Human apolipoprotein E4 accelerates beta-amyloid deposition in APPsw transgenic mouse brain. *Ann Neurol* 50: 468-475
- Cedazo-Minguez A, Cowburn RF (2001) Apolipoprotein E: a major piece in the Alzheimer's disease puzzle. *J Cell Mol Med* 5: 254-266
- Chalvardjian A, Rudnicki E (1970) Determination of lipid phosphorus in the nanomolar range. *Anal Biochem* 36: 225-226
- Chan SL, Furukawa K, Mattson MP (2002) Presenilins and APP in neuritic and synaptic plasticity: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med* 2: 167-196
- Chauhan A, Ray I, Chauhan VP (2000) Interaction of amyloid beta-protein with anionic phospholipids: possible involvement of Lys28 and C-terminus aliphatic amino acids. *Neurochem Res* 25: 423-429
- Checler F (1995) Processing of the beta-amyloid precursor protein and its regulation in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 65: 1431-1444
- Chochina SV, Avdulov NA, Igbavboa U, Cleary JP, O'Hare EO, Wood WG (2001) Amyloid beta-peptide(1-40) increases neuronal membrane fluidity. Role of cholesterol and brain region. *J Lipid Res* 42: 1292-1297
- Choi JH, Yu BP (1995) Brain synaptosomal aging: free radicals and membrane fluidity. *Free Radic Biol Med* 18: 133-139
- Choo-Smith LP, Garzon-Rodriguez W, Glabe C, Surewicz WK (1997) Acceleration of Amyloid fibril formation by specific binding of A β -(1-40) peptide to ganglioside -containing membrane vesicles. *J Biol Chem* 272: 22987-22990
- Choo-Smith LP, Surewicz WK (1997) The interaction between Alzheimer amyloid beta(1-40) peptide and ganglioside GM1-containing membranes. *FEBS Lett* 402: 95-98

Christian AE, Haynes MP, Phillips MC, Rothblat GH (1997) Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *J Lipid Res* 38: 2264-2272

Clarris HJ, Cappai R, Heffernan D, Beyreuther K, Masters CL, Small DH (1997) Identification of heparin-binding domains in the amyloid precursor protein of Alzheimer's disease by deletion mutagenesis and peptide mapping. *J Neurochem* 68: 1164-1172

Clayton DA, Grosshans DR, Browning MD (2002) Aging and surface expression of hippocampal NMDA receptors. *J Biol Chem* 277: 14367-14369

Colton CA, Brown CM, Cook D, Needham LK, Xu Q, Czapiga M, Saunders AM, Schmechel DE, Rasheed K, Vitek MP (2002a) APOE and the regulation of microglial nitric oxide production: a link between genetic risk and oxidative stress. *Neurobiol Aging* 23: 777

Colton CA, Brown CM, Czapiga M, Vitek MP (2002b) Apolipoprotein-E allele-specific regulation of nitric oxide production. *Ann N Y Acad Sci* 962: 212-225

Cook DG, Sung JC, Golde TE, Felsenstein KM et al. (1996) Expression and analysis of presenilin 1 in a human neuronal system: localization in cell bodies and dendrites. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9223-9228

Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's Disease in late onset families. *Science* 261: 921-923

Corrigan FM, Horrobin DF, Skinner ER, Besson JA, Cooper MB (1998) Abnormal content of n-6 and n-3 long-chain unsaturated fatty acids in the phosphoglycerides and cholesterol esters of parahippocampal cortex from Alzheimer's disease patients and its relationship to acetyl CoA content. *Int J Biochem Cell Biol* 30: 197-207

Corsini A, Bernini F, Quarato P, Donetti E, Bellosta S, Fumagalli R, Paoletti R, Soma VM (1996) Non-lipid-related effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Cardiology* 87: 458-468

Crisby M, Carlson LA, Winblad B (2002) Statins in the prevention and treatment of Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 16: 131-136

Crisby M, Nordin-Fredriksson G, Shah PK, Yano J, Zhu J, Nilsson J (2001) Pravastatin treatment increases collagen content and decreases lipid content, inflammation, metalloproteinases, and cell death in human carotid plaques: implications for plaque stabilization. *Circulation* 103: 926-933

Cucchiara B, Kasner SE (2001) Use of statins in CNS disorders. *J Neurol Sci* 187: 81-89

Curtain CC, Ali FE, Smith DG, Bush AI, Masters CL, Barnham KJ (2002) Metal ions, pH and cholesterol regulate the interactions of Alzheimer's disease amyloid-beta peptide with membrane lipid. *J Biol Chem* 278: 2977-2982

Curtain CC, Ali F, Volitakis I, Cherny RA, Norton RS, Beyreuther K, Barrow CJ, Masters CL, Bush AI, Barnham KJ (2001) Alzheimer's disease amyloid-beta binds copper and zinc to generate an allosterically ordered membrane-penetrating structure containing superoxide dismutase-like subunits. *J Biol Chem* 276: 20466-20473

Czech C, Forstl H, Hentschel F, Monning U, Besthorn C, Geiger-Kabisch C, Sattel H, Masters C, Beyreuther K (1994) Apolipoprotein E-4 gene dose in clinically diagnosed Alzheimer's disease: prevalence, plasma cholesterol levels and cerebrovascular change. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 243: 291-292

Dahiyat M, Cumming A, Harrington C et al. (1999) Assoziation between Alzheimer's Disease and the NOS3 gene. *Ann Neurol* 46: 664-667

Danik M, Champagne D, Petit-Turcotte C, Beffert U, Poirier J (1999) Brain lipoprotein metabolism and its relation to neurodegenerative disease. *Crit Rev Neurobiol* 13: 357-407

Das UN (2001a) Essential fatty acids as possible mediators of the actions of statins. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 65: 37-40

Das UN (2002a) Estrogens, statins, and polyunsaturated fatty acids: similarities in their actions and benefits-is there a common link? *Nutrition* 18: 178-188

Das UN (2002b) Nitric oxide as the mediator of the antiosteoporotic actions of estrogen, statins, and essential fatty acids. *Exp Biol Med (Maywood)* 227: 88-93

Das UN (2001b) Statins and the prevention of dementia. *CMAJ* 165: 908-909

Dea D, Lamarre-Theroux, Aumont N, Poirier J (2001) Abnormal splicing of the 3-hydroxy-3-methylglutarylcoenzyme A reductase in the brain of sporadic Alzheimer's Disease subjects. *Soc Neurosci Abstr* 27, program no. 192.5

Debry P, Nash EA, Neklason DW, Metherall JE (1997) Role of multidrug resistance P-glycoproteins in cholesterol esterification. *J Biol Chem* 272: 1026-1031

Dehouck B, Dehouck MP, Fruchart JC, Cecchelli R (1994) The upregulation of the low density lipoprotein receptor at the blood-brain barrier: Intercommunication between brain capillary endothelial cells and astrocytes. *J Cell Biol* 126: 465-473

Delanty N, Vaughan CJ, Sheehy N (2001) Statins and neuroprotection. *Expert Opin Investig Drugs* 10: 1847-1853

De la Torre JC, Stefano GB (2000) Evidence that Alzheimer's disease is a microvascular disorder: the role of constitutive nitric oxide. *Brain Res Brain Res Rev* 34: 119-136

Del Mar Martinez-Senac M, Villalain J, Gomez-Fernandez JC (1999) Structure of the Alzheimer beta-amyloid peptide (25-35) and its interaction with negatively charged phospholipid vesicles. *Eur J Biochem* 265: 744-753

DeMattos RB, Bales KR, Cummins DJ, Dodart JC, Paul SM, Holtzman DM (2001) Peripheral anti-A beta antibody alters CNS and plasma A beta clearance and decreases brain A beta burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 8850-8855

DeMattos RB, Bales KR, Cummins DJ, Paul SM, Holtzman DM (2002) Brain to plasma amyloid-beta efflux: a measure of brain amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Science* 295: 2264-2267

De Vries H, Kuiper J, De Boer AG, Van Berkel TJC, Breimer DD (1997) The blood-brain-barrier in neuroinflammatory disease. *Pharmacol Rev* 49: 143-152

Dietschy JM (1997) Overview of cholesterol and lipoprotein metabolism in the brain, liver and extrahepatic organs. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 7: 162-168

Dietschy JM, Turley SD (2001) Cholesterol metabolism in the brain. *Curr Opin Lipidol* 12: 105-112

Dimitroulakos J, Yeger H (1996) HMG-CoA reductase mediates the biological effects of retinoic acid on human neuroblastoma cells: lovastatin specifically targets P-glycoprotein-expressing cells. *Nat Med* 2: 326-333

Distl R, Meske V, Ohm TG (2001) Tangle-bearing neurons contain more free cholesterol than adjacent tangle-free neurons. *Acta Neuropathol (Berl)* 101: 547-554

Dodart JC, Bales KR, Johnstone EM, Little SP, Paul SM (2002) Apolipoprotein E alters the processing of the beta-amyloid precursor protein in APP(V717F) transgenic mice. *Brain Res* 955: 191-199

Dodart JC, Mathis C, Ungerer A (2000) The beta-amyloid precursor protein and its derivatives: from biology to learning and memory processes. *Rev Neurosci* 11: 75-93

Dreja K, Voldstedlund M, Vintne J, Tranum-Jensen J, Hellstrand P, Sward, K (2002) Cholesterol depletion disrupts caveolae and differentially impairs agonist-induced arterial contraction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 1267-1272

Eckert GP (2000) Untersuchungen zum Effekt von Beta-Amyloid Protein auf neuronale Zellmembranen. *Dissertation Universität Frankfurt*, Fachbereich Pharmazie

Eckert GP, Cairns NJ, Maras A, Gattaz WF, Müller WE (2000) Cholesterol modulates the membrane-disordering effects of beta-amyloid peptides in the hippocampus: specific changes in Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 11: 181-186

Eckert GP, Igbavboa U, Müller WE, Wood WG (2003a) Lipid rafts of purified mouse brain synaptosomes prepared with or without detergent reveal different lipid and protein domains. *Brain Res.* 962: 144-150

Eckert GP, Kirsch C, Müller WE (2003b) Brain membrane cholesterol in Alzheimer's Disease. *J Nutrition Health Aging* 7: 18-23

Eckert GP, Kirsch C, Müller WE (2001a) Differential effects of lovastatin treatment on brain cholesterol levels in normal and apoE-deficient mice. *Neuroreport* 12: 883-887

Eckert GP, Wood WG, Müller WE (2001b) Effects of aging and beta-amyloid on the properties of brain synaptic and mitochondrial membranes. *J Neural Transm* 108: 1051-1064

Edidin M (1992) Patches, posts and fences: Proteins and plasma membrane domains. *Trends Cell Biol* 2: 376-386

Eehalt R, Keller P, Haass C, Thiele C, Simons K (2003) Amyloidogenic processing of the Alzheimer amyloid beta precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol* 160: 113-123

Eikelenboom P, Rozemuller JM, van Muiswinkel FL (1998) Inflammation and Alzheimer's disease: relationships between pathogenic mechanisms and clinical expression. *Exp Neurol* 154: 89-98

Endres M, Laufs U, Huang Z, Nakamura T, Huang P, Moskowitz MA, Liao JK (1998) Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 8880-8885

Fagan AM, Holtzman DM, Munson G, Mathur T, Schneider D, Chang LK, Getz GS, Reardon CA, Lukens J, Shah JA, LaDu MJ (1999) Unique lipoproteins secreted by primary astrocytes from wild type, apoE (-/-), and human apoE transgenic mice. *J Biol Chem* 274: 30001-30007

Fagan AM, Watson M, Parsadanian M, Bales KR, Paul SM, Holtzman DM (2002) Human and murine ApoE markedly alters A beta metabolism before and after plaque formation in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 9: 305-318

Fagan AM, Younkin LH, Morris JC, Fryer JD, Cole TG, Younkin SG, Holtzman DM (2000) Differences in the Abeta40/Abeta42 ratio associated with cerebrospinal fluid lipoproteins as a function of apolipoprotein E genotype. *Ann Neurol* 48: 201-210

Fan QW, Yu W, Gong JS, Zou K, Sawamura N, Senda T, Yanagisawa K, Michikawa M (2002) Cholesterol-dependent modulation of dendrite outgrowth and microtubule stability in cultured neurons. *J Neurochem* 80: 178-190

Fan QW, Yu W, Senda T, Yanagisawa K, Michikawa M (2001) Cholesterol-dependent modulation of tau phosphorylation in cultured neurons. *J Neurochem* 76: 391-400

Farmer JA (2003) MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomized, placebo-controlled trial. *Curr Atheroscler Rep* 5: 93-94

Farooqui AA, Rapoport SI, Horrocks LA (1997) Membrane phospholipid alterations in Alzheimer's Disease: deficiency of ethanolamine plasmalogens. *Neurochem Res* 22: 523-527

Fassbender K, Simons M, Bergmann C, Stroick M, Lutjohann D, Keller P, Runz H, Kuhl S, Bertsch T, von Bergmann K, Hennerici M, Beyreuther K, Hartmann T (2001) Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta - amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 5856-5861

Fassbender K, Stroick M, Bertsch T, Ragooschke A, Kuehl S, Walter S, Walter J, Brechtel K, Muehlhauser F, von Bergmann K, Lutjohann D (2002) Effects of statins on human cerebral cholesterol metabolism and secretion of Alzheimer amyloid peptide. *Neurology* 59: 1257-1258

Fernandes CM, Ramos P, Falcao AC, Veiga FJ (2003) Hydrophilic and hydrophobic cyclodextrins in a new sustained release oral formulation of nicardipine: in vitro evaluation and bioavailability studies in rabbits. *J Control Release* 88: 127-134

Feron O, Dessy C, Desager JP, Balligand JL (2001) Hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibition promotes endothelial nitric oxide synthase activation through a decrease in caveolin abundance. *Circulation* 103: 113-118

Fielding CJ, Fielding PE (1997) Intracellular cholesterol transport. *J Lipid Res* 38: 1503-1521

Fielding PE, Fielding CJ (1995) Plasma membrane caveolae mediate the efflux of cellular free cholesterol. *Biochemistry* 34: 14288-14292

Fischer VW, Siddiqi A, Yusufaly Y (1990) Altered angioarchitecture in selected areas of brains with Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 79: 672-679

Floyd RA, Hensley K (2002) Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging* 23: 795-807

Fontaine RN, Schroeder F (1979) Plasma membrane aminophospholipid distribution in transformed murine fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 558: 1-12

Frautschy SA, Yang F, Calderon L, Cole GM (1996) Rodent models of Alzheimer's Disease : rat beta-amyloid infusion approaches to amyloid deposits. *Neurobiol Aging* 17: 31-321

Frears ER, Stephens DJ, Walters CE, Davies H, Austen BM (1999) The role of cholesterol in the biosynthesis of beta-amyloid. *Neuroreport* 10: 1699-1705

Fredrickson DS (1971) An international classification of hyperlipidemias and hyperlipoproteinemias. *Ann Intern Med* 75: 471-472

Friedland RP (2002) Lipid metabolism, epidemiology, and the mechanisms of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 977: 387-390

Frisoni GB, Manfredi M, Geroldi C, Binetti G, Zanetti O, Bianchetti A, Trabucchi M (1998) The prevalence of apoE-e4 in Alzheimer's Disease is age-dependent. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 65: 103-106

Frohlich J, Lear SA (2002) Old and new risk factors for atherosclerosis and development of treatment recommendations. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29: 838-842

Fujimoto T (2000) Cell biology of caveolae and its implication in clinical medicine. *Nagoja J Med Sci* 63: 9-18

Fukumoto H, Deng A, Irizarry MC, Fitzgerald ML, Rebeck GW (2002) Induction of the cholesterol transporter ABCA1 in central nervous system cells by liver X receptor agonists increases secreted Abeta levels. *J Biol Chem* 277: 48508-48513

Fullerton SM, Shirman GA, Strittmatter WJ, Matthew WD (2001) Impairment of the blood-nerve and blood-brain barriers in apolipoprotein e knockout mice. *Exp Neurol* 169: 13-22

Furukawa K, Abe Y, Akaike N (1994) Amyloid beta protein-induced irreversible current in rat cortical neurones. *Neuroreport* 5: 2016-2018

- Gahtan E, Overmier JB (1999) Inflammatory pathogenesis in Alzheimer's Disease: Biological mechanisms and cognitive sequeli. *Neurosci Biobehav Rev* 23: 615-633
- Galbete JL, Martin TR, Peressini E, Modena P, Bianchi R, Forloni G (2000) Cholesterol decreases secretion of the secreted form of amyloid precursor protein by interfering with glycosylation in the protein secretory pathway. *Biochem J* 348: 307-313
- Galbiati F, Volonte D, Gil O, Zanazzi G, Salzer JL, Sargiacomo M, Scherer PE, Engelman JA, Schlegel A, Parenti M, Okamoto T, Lisanti MP (1998) Expression of caveolin-1 and -2 in differentiating PC12 cells and dorsal root ganglion neurons: caveolin-2 is up-regulated in response to cell injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 10257-10262
- Galla HJ (1988) *Spektroskopische Methoden in der Biochemie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Galla HJ, Sackmann E (1974) Lateral diffusion in the hydrophobic region of membranes: use of pyrene excimers as optical probes. *Biochim Biophys Acta* 339: 103-115
- Gallegos AM, Atshaves BP, Story SM, McIntosh AL, Petrescu AD, Schroeder F (2001) Sterol carrier protein-2 expression alters plasma membrane lipid distribution and cholesterol dynamics. *Biochemistry* 40: 6493-6506
- Gao S, Hendrie HC, Hall KS, Hui S (1998) The relationship between age, sex, and the incidence of dementia and Alzheimer Disease. *Arch Gen Psychiatry* 55: 809-815
- Genis I, Fisher A, Michaelson DM (1999) Site-specific dephosphorylation of tau of apolipoprotein E-deficient and control mice by M1 muscarinic agonist treatment. *J Neurochem* 72: 206-213
- Geula C, Wu CK, Saroff D, Lorenzo A, Yuan M, Yankner BA (1998) Aging renders the brain vulnerable to amyloid beta-protein neurotoxicity. *Nat Med* 4: 827-831
- Gidwani A, Holowka D, Baird B (2001) Fluorescence anisotropy measurements of lipid order in plasma membranes and lipid rafts from RBL-2H3 mast cells. *Biochemistry* 40: 12422-12429
- Gimpl G, Burger K, Fahrenholz F (1997) Cholesterol as modulator of receptor function. *Biochemistry* 36: 10959-10974
- Gimpl G, Wiegand V, Burger K, Fahrenholz F (2002) Cholesterol and steroid hormones: modulators of oxytocin receptor function. *Prog Brain Res* 139: 43-55
- Glabe C (2001) Intracellular mechanisms of amyloid accumulation and pathogenesis in Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci* 17: 137-145
- Glomset JA, Gelb MH, Farnsworth CC (1990) Prenyl proteins in eukaryotic cells: a new type of membrane anchor. *Trends Biochem Sci* 15: 139-142
- Glomset JA, Farnsworth CC (1994) Role of protein modification reactions in programming interactions between ras-related GTPases and cell membranes. *Annu Rev Cell Biol* 10: 181-205

Goedert M (1993) Tau protein and the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 16: 460-465

Golabek AA, Soto C, Vogel T, Wisniewski T (1996) The interaction between apolipoprotein E and Alzheimer's amyloid beta-peptide is dependent on beta-peptide conformation. *J Biol Chem* 271: 10602-10606

Goldberg EM, Zidovetzki R (1997) Effects of dipalmitoylglycerol and fatty acids on membrane structure and protein kinase C activity. *Biophys J* 75 :2603-2614

Golde TE, Eckman CB (2001) Cholesterol modulation as an emerging strategy for the treatment of Alzheimer's disease. *Drug Discov Today* 6: 1049-1055

Goldstein JL, Brown MS (1990) Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343: 425-430

Gong CX, Lidsky T, Wegiel J, Zuck L, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2000) Phosphorylation of microtubule-associated protein tau is regulated by protein phosphatase 2A in mammalian brain. Implications for neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 275: 5535-5544

Gong JS, Kobayashi M, Hayashi H, Zou K, Sawamura N, Fujita SC, Yanagisawa K, Michikawa M (2002b) Apolipoprotein E (apoE) isoform-dependent lipid release from astrocytes prepared from human-apoE3- and apoE4-knock-in mice. *J Biol Chem* 277: 29919-29926

Gong JS, Sawamura N, Zou K, Sakai J, Yanagisawa K, Michikawa M (2002a) Amyloid beta-protein affects cholesterol metabolism in cultured neurons: Implications for pivotal role of cholesterol in the amyloid cascade. *J Neurosci Res* 70: 438-446

Goodrum JF, Bouldin TF, Zhang SH, Maeda N, Popko B (1995) Nerve regeneration and cholesterol reutilization occur in the absence of apolipoproteins E and A-I in mice. *J Neurochem* 64: 408-416

Gordon I, Grauer E, Genis I, Sehayek E, Michaelson DM (1995) Memory deficits and cholinergic impairments in apolipoprotein E-deficient mice. *Neurosci Lett* 199: 1-4

Graham ME, Higgins JA (1998) *Molekularbiologische Membrananalyse*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

Grange-Midroit M, Garcia-Sevilla JA, Ferrer-Alcon M, La Harpe R, Walzer C, Guimon J (2002) G protein-coupled receptor kinases, beta-arrestin-2 and associated regulatory proteins in the human brain: postmortem changes, effect of age and subcellular distribution. *Brain Res Mol Brain Res* 101: 39-51

Greenberg SM, Rebeck GW, Vonsattel JP, Gomez-Isla T, Human BT (1995) Apolipoprotein E ϵ 4 and cerebral hemorrhage associated with amyloid angiopathy. *Ann Neurol* 38: 254-259

Greenfield JP, Leung LW, Cai D, Kaasik K, Gross RS, Rodriguez-Boulan E, Greengard P, Xu H (2002) Estrogen lowers Alzheimer beta-amyloid generation by stimulating trans- Golgi network vesicle biogenesis. *J Biol Chem* 277: 12128-12136

- Grunler J, Ericsson J, Dallner G (1994) Branch-point reactions in the biosynthesis of cholesterol, dolichol, ubiquinone and prenylated proteins. *Biochim Biophys Acta* 1212: 259-277
- Guan ZZ, Yu WF, Shan KR, Nordman T, Olsson J, Nordberg A (2003) Loss of nicotinic receptors induced by beta-amyloid peptides in PC12 cells: possible mechanism involving lipid peroxidation. *J Neurosci Res* 71: 397-406
- Guijarro C, Blanco-Colio LM, Ortego M, Alonso C, Ortiz A, Plaza JJ, Diaz C, Hernandez G, Egido J (1998) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase and isoprenylation inhibitors induce apoptosis of vascular smooth muscle cells in culture. *Circ Res* 83: 490-500
- Guillaume D, Bertrand P, Dea D, Davignon J, Poirier J (1996) Apolipoprotein E and low-density lipoprotein binding and internalization in primary cultures of rat astrocytes: isoform-specific alterations. *J Neurochem* 66: 2410-2418
- Hajimohammadreza I, Brammer M (1990) Brain membrane fluidity and lipid peroxidation in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 112: 333-337
- Hajjar I, Schumpert J, Hirth V, Wieland D, Eleazer GP (2002) The impact of the use of statins on the prevalence of dementia and the progression of cognitive impairment. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 57: M414-M418
- Hall A (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279: 509-514
- Hamelin BA, Turgeon J (1998) Hydrophilicity/lipophilicity: relevance for the pharmacology and clinical effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Trends Pharmacol Sci* 19: 26-37
- Haniu M, Denis P, Young Y, Mendiaz EA, Fuller J, Hui JO, Bennett BD, Kahn S, Ross S, Burgess T, Katta V, Rogers G, Vassar R, Citron M (2000) Characterization of Alzheimer's beta -secretase protein BACE. A pepsin family member with unusual properties. *J Biol Chem* 275: 21099-21106
- Hao M, Mukherjee S, Maxfield FR (2001) Cholesterol depletion induces large scale domain segregation in living cell membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 13072-13077
- Hardie DG, Carling D (1997) The AMP-activated protein kinase-fuel gauge of the mammalian cell? *Eur J Biochem* 246: 259-273
- Harman D (1968) Free radical theory of aging: Effect of free radical reaction inhibitors on the mortality rate of male LAF mice. *J Gerontol* 23: 476-482
- Harris JR (2002) In vitro fibrillogenesis of the amyloid beta(1-42) peptide: cholesterol potentiation and aspirin inhibition. *Micron* 33: 609-626
- Hartel S, Diehl HA, Ojeda F (1998) Methyl-beta-cyclodextrins and liposomes as water-soluble carriers for cholesterol incorporation into membranes and its evaluation by a microenzymatic fluorescence assay and membrane fluidity-sensitive dyes. *Anal Biochem* 258: 277-284

Hartmann H, Eckert A, Crews FT, Müller WE (1996) β -amyloid amplifies PLC activity and Ca^{2+} -signalling in fully differentiated brain cells of adult mice. *Amyloid Int J Exp Clin Invest* 3: 234-241

Hartmann H, Eckert A, Müller WE (1994) Apolipoprotein E and cholesterol affect neuronal calcium signalling: the possible relationship to beta-amyloid neurotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 200: 1185-1192

Hartmann T (2001) Cholesterol, A beta and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 24: S45-S48

Hartmann T (1999) Intracellular biology of Alzheimer's disease amyloid beta peptide. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 249: 291-298

Hayashi H, Igbavboa U, Hamanaka H, Kobayashi M, Fujita SC, Wood WG, Yanagisawa K (2002) Cholesterol is increased in the exofacial leaflet of synaptic plasma membranes of human apolipoprotein E4 knock-in mice. *Neuroreport* 13: 383-386

Hayashi H, Mizuno T, Michikawa M, Haass C, Yanagisawa K (2000) Amyloid precursor protein in unique cholesterol-rich microdomains different from caveolae-like domains. *Biochim Biophys Acta* 1483: 81-90

Hernandes-Perera O, Perez-Sala D, Navarro-Antolin J, Sanchez-Pascuala R, Hernandez G, Diaz C (1998) Effects of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelin 1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 101: 2711-2719

Hertel C, Terzi E, Hauser N, Jakob-Rotne R, Seelig J, Kemp JA (1997) Inhibition of the electrostatic interaction between beta-amyloid peptide and membranes prevents beta-amyloid-induced toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 9412-9416

Herz J (2001) Lipoprotein receptors: beacons to neurons? *Trends Neurosci* 24: 193-195

Heyn MP (1979) Determination of lipid order parameters and rotational correlation times from fluorescence depolarisation experiments. *FEBS Lett* 108: 359-364

Hirakura Y, Satoh Y, Hirashima N, Suzuki T, Kagan BL, Kirino Y (1998) Membrane perturbation by the neurotoxic Alzheimer amyloid fragment beta 25-35 requires aggregation and beta-sheet formation. *Biochem Mol Biol Int* 46: 787-794

Ho R, Ortiz D, Shea TB (2001) Amyloid-beta promotes calcium influx and neurodegeneration via stimulation of L voltage-sensitive calcium channels rather than NMDA channels in cultured neurons. *J Alzheimers Dis* 3: 479-483

Hofman A, Rocca WA, Brayne C (1991) The prevalence of dementia in Europe: A collaborative study of 1980-1990 findings. *Int J Epidemiology* 20: 736-748

Holtzman DM (2001) Role of apoe/Abeta interactions in the pathogenesis of Alzheimer's disease and cerebral amyloid angiopathy. *J Mol Neurosci* 17: 147-155

- Holtzman DM, Bales KR, Tenkova T, Fagan AM, Parsadanian M, Sartorius LJ, Mackey B, Olney J, McKeel D, Wozniak D, Paul SM (2000) Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 2892-2897
- Holtzman DM, Bales KR, Wu S, Bhat P, Parsadanian M, Fagan AM, Chang LK, Sun Y, Paul SM (1999) Expression of human apolipoprotein E reduces amyloid-beta deposition in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Clin Invest* 103: R15-R21
- Hone E, Martins IJ, Fonte J, Martins RN (2003) Apolipoprotein E influences amyloid-beta clearance from the murine periphery. *J Alzheimers Dis* 5: 1-8
- Horrocks LA, Harder HW (1983) Fatty acids and cholesterol. In: *Handbook of neurochemistry* (Lajtha A, ed.), New York: Plenum Press, S. 1-16
- Howland DS, Trusko SP, Savage MJ, Reaume AG, Lang DM, Hirsch JD, Maeda N, Siman R, Greenberg BD, Scott RW, Flood DG (1998) Modulation of secreted beta-amyloid precursor protein and amyloid beta-peptide in brain by cholesterol. *J Biol Chem* 273: 16576-16582
- Huhle G, Abletshauer C, Mayer N, Weidinger G, Harenberg J, Heene DL (1999) Reduction of platelet activity markers in type II hypercholesterolemic patients by a HMG-CoA-reductase inhibitor. *Thromb Res* 95: 229-234
- Huse JT, Pijak DS, Leslie GJ, Lee VM, Doms RW (2000) Maturation and endosomal targeting of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. The Alzheimer's disease beta-secretase. *J Biol Chem* 275: 33729-33737
- Hussain I, Powell D, Howlett DR, Tew DG, Meek, TD, Chapman C, Gloger IS, Murphy KE, Southan CD, Ryan DM, Smith TS, Simmons DL, Walsh FS, Dingwall C, Christie G (1999) Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as β -secretase. *Mol Cell Neurosci* 14: 419-427
- Igbavboa U, Avdulov NA, Chochina SV, Wood WG (1997) Transbilayer distribution of cholesterol is modified in brain synaptic plasma membranes of knockout mice deficient in the low-density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *J Neurochem* 69: 1661-1667
- Igbavboa U, Avdulov NA, Schroeder F, Wood WG (1996) Increasing age alters transbilayer fluidity and cholesterol asymmetry in synaptic plasma membranes of mice. *J Neurochem* 66: 1717-1725
- Igbavboa U, Hamilton J, Kim HY, Sun GY, Wood WG (2002) A new role for apolipoprotein E: modulating transport of polyunsaturated phospholipid molecular species in synaptic plasma membranes. *J Neurochem* 80: 255-261
- Igbavboa U, Pidcock JM, Johnson LN, Malo TM, Studniski AE, Yu S, Sun GY, Wood WG (2003) Cholesterol distribution in the golgi complex of astrocytes is differentially altered by fresh and aged amyloid beta-peptide1-42. *J Biol Chem* 278: 17150-17157
- Igel M, Sudhop T, von Bergmann K (2001) Metabolism and drug interactions of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A-reductase inhibitors (statins). *Eur J Clin Pharmacol* 57: 357-364

Ikezu T, Trapp BD, Song KS, Schlegel A, Lisanti MP, Okamoto T (1998) Caveolae, plasma membrane microdomains for alpha-secretase-mediated processing of the amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 273: 10485-10495

Ikezu T, Ueda H, Trapp BD, Nishiyama K, Sha JF, Volonte D, Galbiati F, Byrd AL, Bassell G, Serizawa H, Lane WS, Lisanti MP, Okamoto T (1998) Affinity-purification and characterisation of caveolins from the brain-differential expression of caveolin-1, -2, and -3 in brain endothelial and astroglial cell types. *Brain Res* 804: 177-192

Ikonen E (1997) Molecular mechanisms of intracellular cholesterol transport. *Curr Opin Lipidol* 8: 60-64

Ilangumaran S, Hoessli DC (1998) Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane. *Biochem J* 335 (Pt 2): 433-440

Ioannou YA (2000) The structure and function of the Niemann-Pick C1 protein. *Mol Genet Metab* 71: 175-181.

Istvan ES (2002) Structural mechanism for statin inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Am Heart J* 144(6 Suppl): S27-S32

Iversen LL, Mortishire-Smith RJ, Pollack SJ, Shearman MS (1995) The toxicity in vitro of beta-amyloid protein. *Biochem J* 311 (Pt 1): 1-16

Janciauskiene S, Wright HT, Lindgren S (1999) Fibrillar Alzheimer's amyloid peptide Abeta(1-42) stimulates low density lipoprotein binding and cell association, free radical production and cell cytotoxicity in PC12 cells. *Neuropeptides* 33: 510-516

Jarvik GP, Wijsman EM, Kukull WA, Schellenberg GD, Yu C, Larson EB (1995) Interactions of apolipoprotein E genotype, total cholesterol level, age, and sex in prediction of Alzheimer's disease: a case-control study. *Neurology* 45: 1092-1096

J. C, Cardenas-Vazquez R, Martinez F, M. A (1999) Comparative toxicity of high doses of vastatins currently used by clinicians, in CD-1 male mice fed with a hypercholesterolemic diet. *Life Sci* 65: 947-956

Jellinger KA (2002) Alzheimer disease and cerebrovascular pathology: an update. *J Neural Transm* 109: 813-836

Ji SR, Wu Y, Sui SS (2001a) Cholesterol is an important factor affecting the membrane insertion of beta-amyloid peptide (A-beta 1-40) which may potentially inhibit the fibril formation. *J Biol Chem* 277: 6273-6279

Ji Y, Permanne B, Sigurdsson EM, Holtzman DM, Wisniewski T (2001b) Amyloid beta40/42 clearance across the blood-brain barrier following intraventricular injections in wild-type, apoE knock-out and human apoE3 or E4 expressing transgenic mice. *J Alzheimer's Dis* 3: 23-30

Jicha GA, Weaver C, Lane E, Vianna C, Kress Y, Rockwood J, Davies P (1999) cAMP-dependent protein kinase phosphorylations on tau in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 19: 7486-7494

Jick H, Zornberg GL, Jick SS, Seshadri S, Drachman DA (2000) Statins and the risk of dementia. *Lancet* 356: 1627-1631

Johnson WJ, Mahlberg FH, Rothblat GH, Phillips MC (1991) Cholesterol transport between cells and high-density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1085: 273-298

Johnson WJ, Phillips MC, Rothblat GH (1997) Lipoproteins and cellular cholesterol homeostasis. *Subcell Biochem* 28: 235-276

Jorm AF, Korten AE, Henderson AS (1987) The prevalence of dementia: A quantitative integration of the literature. *Acta Psychiatr Scand* 76: 465-479

Jorm, Jolley (1998) The incidence of dementia. A meta-analysis. *Neurology* 51 :728-733

Joseph JA, Villalobos-Molinas R, Denisova NA, Erat S, Strain J (1997) Cholesterol: a two-edged sword in brain aging. *Free Radic Biol Med* 22: 455-462

Kabouridis PS, Janzen J, Magee AL, Ley SC (2000) Cholesterol depletion disrupts lipid rafts and modulates the activity of multiple signaling pathways in T lymphocytes. *Eur J Immunol* 30: 954-963

Kaiser RD, London E (1998) Location of diphenylhexatriene (DPH) and its derivatives within membranes: comparison of different fluorescence quenching analyses of membrane depth. *Biochemistry* 37: 8180-8190

Kakio A, Nishimoto S, Kozutsumi Y, Matsuzaki K (2003) Formation of a membrane-active form of amyloid beta-protein in raft-like model membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 303: 514-518

Kakio A, Nishimoto SS, Yanagisawa K, Kozutsumi Y, Matsuzaki K (2001) Cholesterol-dependent formation of GM1 ganglioside-bound amyloid beta-protein, an endogenous seed for Alzheimer amyloid. *J Biol Chem* 276: 24985-24990

Kakio A, Nishimoto S, Yanagisawa K, Kozutsumi Y, Matsuzaki K (2002) Interactions of amyloid beta-protein with various gangliosides in raft- like membranes: importance of GM1 ganglioside-bound form as an endogenous seed for Alzheimer amyloid. *Biochemistry* 41: 7385-7390

Kalaria RN, Ballard C (1999) Overlap between pathology of Alzheimer disease and vascular dementia. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 13: Suppl. 3, S115-S123

Kalaria RN (1996) Cerebral vessels in aging and Alzheimer's Disease. *Pharmacol Ther* 72: 193-214

Kalaria RN, Hedera P (1995) Differential degeneration of the cerebral microvasculature in Alzheimer's Disease. *Neuroreport* 6: 477-480

Kalmijn S, Feskens EJ, Launer LJ, Kromhout D (1997) Polyunsaturated fatty acids, antioxidants, and cognitive function in very old men. *Am J Epidemiol* 145: 33-41

- Kamal A, Almenar-Queralt A, LeBlanc JF, Roberts EA, Goldstein LS (2001) Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing beta-secretase and presenilin-1 requires APP. *Nature* 414: 643-648
- Kanfer JN, Sorrentino G, Sitar DS (1999) Amyloid beta peptide membrane perturbation is the basis for its biological effects. *Neurochem Res* 24: 1621-1630
- Kawahara M, Kuroda Y (2001) Intracellular calcium changes in neuronal cells induced by Alzheimer's β -amyloid protein are blocked by estradiol and cholesterol. *Cell Mol Neurobiol* 21: 1-13
- Kawahara M, Kuroda Y (2000) Molecular mechanism of neurodegeneration induced by Alzheimer's beta- amyloid protein: channel formation and disruption of calcium homeostasis. *Brain Res Bull* 53: 389-397
- Kenworthy A (2002) Peering inside lipid rafts and caveolae. *Trends Biochem Sci* 27: 435-442
- Kessler J, Markowitsch HJ, Denzler P (1990) *Der Mini-Mental-Status-Test*. Beltz, Weinheim
- Kier AB, Sweet WD, Cowlen MS, Schroeder F (1986) Regulation of transbilayer distribution of a fluorescent sterol in tumor cell plasma membranes. *Biochim Biophys Acta* 861: 287-301
- Kim HJ, Miyazaki M, Man WC, Ntambi JM (2002) Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) as regulators of lipid metabolism: polyunsaturated fatty acids oppose cholesterol-mediated induction of SREBP-1 maturation. *Ann N Y Acad Sci* 967: 34-42
- Kimberly WT, Zheng JB, Guenette SY, Selkoe DJ (2001) The intracellular domain of the beta-amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a notch-like manner. *J Biol Chem* 276: 40288-40292
- Kimura H, Schubert D (1993) Amyloid beta-protein activates tachykinin receptors and inositol triphosphate accumulation by synergy with glutamate. *Proc Natl Acad Sci* 90: 7508-7512
- Kirsch C, Eckert GP, Mueller WE (2002) Cholesterol attenuates the membrane perturbing properties of beta-amyloid peptides. *Amyloid* 9: 149-159
- Kirsch C, Eckert GP, Mueller WE (2003) Statin effects on cholesterol micro-domains in brain plasma membranes. *Biochem Pharmacol* 65: 843-856
- Kivipelto M, Helkala EL, Laakso MP, Hanninen T, Hallikainen M, Alhainen K, Soininen H, Tuomilehto J, Nissinen A (2001) Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. *Br Med J* 322: 1447-1451
- Klein U, Gimpl G, Fahrenholz F (1995) Alteration of the myometrial plasma membrane cholesterol content with beta-cyclodextrin modulates the binding affinity of the oxytocin receptor. *Biochemistry* 34: 13784-13793
- Knebl J, DeFazio P, Clearfield MB, Little L, McConathy WJ, McPherson R, Lacko AG (1994) Plasma lipids and cholesterol esterification in Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev* 73: 69-77

-
- Koga T, Fukuda K, Shimada Y, Fukami M, Koike H, Tsujita Y (1992) Tissue selectivity of pravastatin sodium, lovastatin and simvastatin. The relationship between inhibition of de novo sterol synthesis and active drug concentrations in the liver, spleen and testis in rat. *Eur J Biochem* 209: 315-319
- Kojro E, Gimpl G, Lammich S, Marz W, Fahrenholz F (2001) Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 5815-5820
- Kölsch H, Lütjohann D, Ludwig M, Schulte A, Ptok U, Jessen F, von Bergmann K, Rao ML, Maier W, Heun R (2002) Polymorphism in the cholesterol 24S-hydroxylase gene is associated with Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry* 7: 899-902
- Komai T, Shigehara E, Tokui T, Koga T, Ishigami M, Kuroiwa C, Horiuchi S (1992) Carrier-mediated uptake of pravastatin by rat hepatocytes in primary culture. *Biochem Pharmacol* 43: 667-670
- Kosukhin AB, Akhmetova BS (1987) Lipid extraction with a heptane-isopropanol mixture to determine diene conjugate. *Lab Delo* 5: 335-337
- Koudinov AR, Koudinova NV, Berezov TT (1996) Alzheimer's peptides A beta 1-40 and A beta 1-28 inhibit the plasma cholesterol esterification rate. *Biochem Mol Biol Int* 38: 747-752
- Koudinov AR, Koudinova NV (2001) Brain cholesterol pathology is the cause of Alzheimer's Disease. *Clin Med Health Res Nov*: 1-8
- Koudinova NV, Berezov TT, Koudinov AR (1996) Multiple inhibitory effects of Alzheimer's peptide Abeta1-40 on lipid biosynthesis in cultured human HepG2 cells. *FEBS Lett* 395: 204-206
- Koudinova NV, Koudinov AR, Yavin E (2000) Alzheimer's Abeta1-40 peptide modulates lipid synthesis in neuronal cultures and intact rat fetal brain under normoxic and oxidative stress conditions. *Neurochem Res* 25: 653-660
- Krause BR, Newton RS (1995) Lipid-lowering activity of atorvastatin and lovastatin in rodent species: triglyceride-lowering in rats correlates with efficacy in LDL animal models. *Atherosclerosis* 117: 237-244
- Krause BR, Princen HM (1998) Lack of predictability of classical animal models for hypolipidemic activity: a good time for mice? *Atherosclerosis* 140: 15-24
- Kremer JJ, Pallitto MM, Sklansky DJ, Murphy RM (2000) Correlation of beta-amyloid aggregate size and hydrophobicity with decreased bilayer fluidity of model membranes. *Biochemistry* 39: 10309-10318
- Kuo YM, Emmerling MR, Lampert HC, Hempelman SR, Kokjohn TA, Woods AS, Cotter RJ, Roher AE (1999) High levels of circulating Abeta42 are sequestered by plasma proteins in Alzheimer's Disease. *Biochem Biophys Res Commun* 257: 787-791

Kurt MA, Davies DC, Kidd M, Duff K, Rolph SC, Jennings KH, Howlett DR (2001) Neurodegenerative changes associated with beta-amyloid deposition in the brains of mice carrying mutant amyloid precursor protein and mutant presenilin-1 transgenes. *Exp Neurol* 171: 59-71

Kyle DJ, Schaefer E, Patton G, Beiser A (1999) Low serum docosahexaenoic acid is a significant risk factor for Alzheimer's Disease. *Lipids* 34 (Suppl): 245

LaDu MJ, Falduto MT, Manelli AM, Reardon CA, Getz GS, Frail DE (1994) Isoform-specific binding of apolipoprotein E to beta-amyloid. *J Biol Chem* 269: 23403-23406

LaDu MJ, Pederson TM, Frail DE, Reardon CA, Getz GS, Falduto MT (1995) Purification of apolipoprotein E attenuates isoform-specific binding of apolipoprotein E to beta-amyloid, *J Biol Chem* 270: 9030-9042

Laitinen S, Olkkonen VM, Ehnholm C, Ikonen E (1999) Family of human oxysterol binding protein (OSBP) homologues. A novel member implicated in brain sterol metabolism. *J Lipid Res* 40: 2204-2211

Lambert MP, Barlow AK, Chromy B, Edwards C, Freed R, Liasatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA, Klein WL (1998) Diffusibel, nonfibrillar ligands derived from A β 1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 6448-6453

Lambert MP, Stevens G, Sabo S, Barber K, Wang G, Wade W, Krafft G, Snyder S, Holzman TF, Klein WL (1994) Beta-amyloid-evoked degeneration of differentiated SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J Neurosci Res* 39: 377-385

Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasionowski M, Haass C, Fahrenholz F (1999) Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 3922-3927

Lange Y, Strebel F, Steck TL (1993) Role of the plasma membrane in cholesterol esterification in rat hepatoma cells. *J Biol Chem* 268: 13838-13843

Lange Y, Steck TL (1998) Four cholesterol-sensing proteins. *Curr Opin Struct Biol* 8: 435-439

Laskowitz DT, Lee DM, Schmechel D, Staats HF (2000) Altered immune responses in apolipoprotein E-deficient mice. *J Lipid Res* 41: 613-620

Laskowitz DT, Metthew WD, Bennett ER, Schmechel D, Herbstreith MH, Goel S et al. (1998) Endogenous apolipoprotein E suppresses LPS-stimulated microglial nitric oxide production. *Neuroreport* 9: 615-618

Lauderback CM, Hackett JM, Keller JN, Varadarajan S, Szweda L, Kindy M, Markesbery WR, Butterfield DA (2001) Vulnerability of synaptosomes from apoE knock-out mice to structural and oxidative modifications induced by A beta (1-40): implications for Alzheimer's disease. *Biochemistry* 40: 2548-2554

- Laufs U, Gertz K, Huang P, Nickenig G, Bohm M, Dirnagl U, Endres M (2000) Atorvastatin upregulates type III nitric oxide synthase in thrombocytes, decreases platelet activation, and protects from cerebral ischemia in normocholesterolemic mice. *Stroke* 31: 2442-2449
- Laufs U, La F, V, Plutzky J, Liao JK (1998) Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 97: 1129-1135
- Laufs U, Liao JK (1998) Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J Biol Chem* 273: 24266-24271
- Laufs U, Marra D, Node K, Liao JK (1999) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors attenuate vascular smooth muscle cell proliferation by preventing rho GTPase-induced downregulation of p27(Kip1). *J Biol Chem* 274: 21926-21931
- Law A, Gauthier S, Quirion R (2001) Say NO to Alzheimer's disease: the putative links between nitric oxide and dementia of the Alzheimer's type. *Brain Res Brain Res Rev* 35: 73-96
- Law A, Gauthier S, Quirion R (2003) Alteration of nitric oxide synthase activity in young and aged apolipoprotein E-deficient mice. *Neurobiol Aging* 24: 187-190
- LeBel CP, Bondy SC (1991) Persistent protein damage despite reduced oxygen radical formation in the aging rat brain. *Int J Dev Neurosci* 9: 139-146
- Ledesma MD, Brugger B, Bunning C, Wieland FT, Dotti CG (1999) Maturation of the axonal plasma membrane requires upregulation of sphingomyelin synthesis and formation of protein/lipid-complexes. *EMBO J* 18: 1761-1771
- Ledesma MD, Da Silva JS, Crassaerts K, Delacourte A, De Strooper B, Dotti CG (2000) Brain plasmin enhances APP alpha-cleavage and Abeta degradation and is reduced in Alzheimer's disease brains. *EMBO Rep* 1: 530-535
- Lee SJ, Liyanage U, Bickel PE, Xia W, Lansbury PTJ, Kosik KS (1998) A detergent-insoluble membrane compartment contains A beta in vivo. *Nat Med* 4: 730-734
- Lenaz G, Curatola G, Fiorini RM, Parenti Castelli G (1983) Membrane fluidity and its role in the regulation of cellular processes. *Prog Clin Biol Res* 132: 25-34
- Lenaz G, Esposti MD (1994) Membran-bound enzymes. In: *Biomembranes: Structural and Functional Aspects* (Shinitzky M, ed.), VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, S. 83-198
- Lennernas H, Fager G (1997) Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the HMG-CoA reductase inhibitors. Similarities and differences. *Clin Pharmacokinet* 32: 403-425
- Lentz BR (1988) Membrane fluidity from anisotropy measurements. In: *Spectroscopic Membrane Probes* (Loew LM, ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida. S.13-42
- Lentz BR (1993) Use of fluorescent probes to monitor molecular order and motions within liposome bilayers. *Chem Phys Lipids* 64: 99-116
- Leutner S (2001) Metabolismus reaktiver Sauerstoffspezies im Alter und bei der Alzheimer Demenz. *Dissertation Universität Frankfurt*, Fachbereich Pharmazie

Leutz S (2001) Neuronaler Zelltod bei der Alzheimer Demenz – Einfluss von beta-Amyloid und Amyloid Precursor Protein. *Dissertation Universität Frankfurt*, Fachbereich Pharmazie

Levin-Allerhand J, McEwen BS, Lominska CE, Lubahn DB, Korach KS, Smith JD (2001) Brain region-specific up-regulation of mouse apolipoprotein E by pharmacological estrogen treatments. *J Neurochem* 79: 796-803

Levin-Allerhand JA, Lominska CE, Smith JD (2002) Increased amyloid- levels in APPSWE transgenic mice treated chronically with a physiological high-fat high-cholesterol diet. *J Nutr Health Aging* 6: 315-319

Li YP, Bushnell AF, Lee CM, Perlmutter LS, Wong SK (1996) Beta-amyloid induces apoptosis in human-derived neurotypic SH-SY5Y cells. *Brain Res* 738: 196-204

Li X, Greenwald I (1998) Additional evidence for an eight-transmembrane-domain topology for caenorhabditis and human presenilins. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7109-7114

Lin H, Bhatia R, Lal R (2001) Amyloid beta protein forms ion channels: implications for Alzheimer's disease pathophysiology. *FASEB J* 15: 2433-2444

Lin H, Zhu YJ, Lal R (1999) Amyloid beta protein (1-40) forms calcium-permeable, Zn²⁺-sensitive channel in reconstituted lipid vesicles. *Biochemistry* 38: 11189-11196

Liscum L, Munn NJ (1999) Intracellular cholesterol transport. *Biochim Biophys Acta* 1438: 19-37

Liscum L, Underwood KW (1995) Intracellular cholesterol transport and compartmentation. *J Biol Chem* 270: 15443-15446

Liu Y, Peterson DA, Schubert D (1998) Amyloid beta peptide alters intracellular vesicle trafficking and cholesterol homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 13266-13271

Locatelli S, Lutjohann D, Schmidt HH, Otto C, Beisiegel U, von Bergmann K (2002) Reduction of plasma 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) levels using high-dosage simvastatin in patients with hypercholesterolemia: evidence that simvastatin affects cholesterol metabolism in the human brain. *Arch Neurol* 59: 213-216

Lomnitski L, Oron L, Sklan D, Michaelson DM (1999) Distinct alterations in phospholipid metabolism in brains of apolipoprotein E-deficient mice. *J Neurosci Res* 58: 586-592

Lousberg TR, Denham AM, Rasmussen JR (2001) A comparison of clinical outcome studies among cholesterol-lowering agents. *Ann Pharmacother* 35: 1599-1607

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275

Lütjohann D, Breuer O, Ahlborg G, Nennesmo I, Siden A, Diczfalusy U, Björkhem I (1996) Cholesterol homeostasis in human brain: evidence for an age-dependent flux of 24-S-hydroxycholesterol from the brain into the circulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9799-9804

- Lütjohann D, Björkhem I, Locatelli S, Dame C, Schmolling J, von Bergmann K, Fahnenstich H (2001) Cholesterol dynamics in the foetal and neonatal brain as reflected by circulatory levels of 24-S-hydroxycholesterol. *Acta Paediatr* 90: 652-657
- Lütjohann D, Papassotiropoulos A, Björkhem I, Locatelli S, Bagli M, Oehring RD, Schlegel U, Jessen F, Rao ML, von Bergmann K, Heun R (2000) Plasma 24-S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) is increased in Alzheimer and vascular demented patients. *J Lipid Res* 41: 195-198
- Lund EG, Guileyardo JM, Russell DW (1999) cDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 7238-7243
- Lusa S, Blom TS, Eskelinen EL, Kuusmanen E, Mansson JE, Simons K, Ikonen E (2001) Depletion of rafts in late endocytic membranes is controlled by NPC1- dependent recycling of cholesterol to the plasma membrane. *J Cell Sci* 114: 1893-190
- Ma J, Brewer HB Jr, Potter H (1996) Alzheimer A beta neurotoxicity: promotion by antichymotrypsin, ApoE4; inhibition by A beta-related peptides. *Neurobiol Aging* 17: 773-780
- Mackic JB, Stins M, McComb JG, Calero M, Ghiso J, Kim KS, Yan SD, Stern D, Schmidt AM, Frangione B, Zlokovic BV (1998) Human blood-brain barrier receptors for Alzheimer's amyloid-beta 1- 40. Asymmetrical binding, endocytosis, and transcytosis at the apical side of brain microvascular endothelial cell monolayer. *J Clin Invest* 102: 734-743
- Maltese WA (1990) Post-translational modification of proteins by isoprenoids in mammalian cells. *FASEB J* 4: 3319-3328
- Manser E (2002) Small GTPases take the stage. *Dev Cell*. 3: 323-328
- Markesbery WR (1997) Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 23: 134-147
- Marx J (2001) Alzheimer's disease: bad for the heart, bad for the mind? *Science* 294: 508-509
- Masliah E, Mallory M, Ge N, Alford M, Veinbergs I, Roses AD (1995) Neurodegeneration in the central nervous system of apoE-deficient mice. *Exp Neurol* 136: 107-122
- Mason RP, Estermyer JD, Kelly JF, Mason PE (1996) Alzheimer's disease amyloid beta peptide 25-35 is localized in the membrane hydrocarbon core: x-ray diffraction analysis. *Biochem Biophys Res Commun* 222: 78-82
- Mason RP, Jacob RF, Walter MF, Mason PE, Avdulov NA, Chochina SV, Igbavboa U, Wood WG (1999) Distribution and fluidizing action of soluble and aggregated amyloid beta-peptide in rat synaptic plasma membranes. *J Biol Chem* 274: 18801-18807
- Mason RP, Shoemaker WJ, Shajenko L, Chambers TE, Herbette LG (1992) Evidence for changes in the Alzheimer's disease brain cortical membrane structure mediated by cholesterol. *Neurobiol Aging* 13: 413-419

Mason RP, Shoemaker WJ, Shajenko L, Herbette LG (1993) X-ray diffraction analysis of brain lipid membrane structure in Alzheimer's disease and beta-amyloid peptide interactions. *Ann N Y Acad Sci* 695: 54-58

Mason RP, Trumbore MW, Pettegrew JW (1995) Membrane interactions of a phosphomonoester elevated early in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 16: 531-539

Mato M, Ookawara S, Mashiko T, Sakamoto A, Mato TK, Maeda N, Kodama T (1999) Regional difference of lipid distribution in brain of apolipoprotein E deficient mice. *Anat Rec* 256: 165-176

Matsuzaki K, Horikiri C (1999) Interactions of amyloid beta-peptide (1-40) with ganglioside-containing membranes. *Biochemistry* 38: 4137-4142

McDonald AG, Wahle KW, Cossins AR, Behan MK (1988) Temperature, pressure and cholesterol effects on bilayer fluidity; a comparison of pyrene excimer/monomer ratios with the steady-state fluorescence polarization of diphenylhexatriene in liposomes and microsomes. *Biochim Biophys Acta* 938: 231-242

McLaurin J, Chakrabarty A (1997) Characterization of the interactions of Alzheimer beta-amyloid peptides with phospholipid membranes. *Eur J Biochem* 245: 355-363

McLaurin J, Darabie AA, Morrison MR (2002) Cholesterol, a Modulator of Membrane-Associated Abeta-Fibrillogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 977: 376-383

McLaurin J, Franklin T, Chakrabarty A, Fraser PE (1998) Phosphatidylinositol and inositol involvement in Alzheimer amyloid-beta fibril growth and arrest. *J Mol Biol* 278: 183-194

Mecocci P, Cherubini A, Beal MF, Cecchetti R, Chionne F, Polidori MC, Romano G, Senin U (1996) Altered mitochondrial membrane fluidity in AD brain. *Neurosci Lett* 207: 129-132

Meske V, Albert F, Richter D, Schwarze J, Ohm TG (2003) Blockade of HMG-CoA reductase activity causes changes in microtubule-stabilizing protein tau via suppression of geranylgeranylpyrophosphate formation: implications for Alzheimer's disease. *Eur J Neurosci* 17: 93-102

Methia N, Andre P, Hafezi-Moghadam A, Economopoulos M, Thomas KL, Wagner DD (2001) ApoE Deficiency Compromises the Blood Brain Barrier Especially after Injury. *Mol Med* 7: 810-815

Meyer MR, Tschanz JT, Norton MV, Welsh-Bohmer KA, Steffens DC, Wyse BW, Breitner JCS (1998) APOE genotype predicts when-not whether-one is predisposed to develop Alzheimer Disease. *Nature Genetics* 19: 321-322

Michaelis ML (2003) Drugs targeting Alzheimer's disease: some things old and some things new. *J Pharmacol Exp Ther* 304: 897-904

Michikawa M, Fan QW, Isobe I, Yanagisawa K (2000) Apolipoprotein E exhibits isoform-specific promotion of lipid efflux from astrocytes and neurons in culture. *J Neurochem* 74: 1008-1016

- Michikawa M, Gong JS, Fan QW, Sawamura N, Yanagisawa K (2001) A novel action of Alzheimer's amyloid beta-protein (A β): oligomeric A β promotes lipid release. *J Neurosci* 21: 7226-7235
- Michikawa M, Yanagisawa K (1998) Apolipoprotein E4 induces neuronal cell death under conditions of suppressed de novo cholesterol synthesis. *J Neurosci Res* 54: 58-67
- Michikawa M, Yanagisawa K (1999) Inhibition of cholesterol production but not of nonsterol isoprenoid products induces neuronal cell death. *J Neurochem* 72: 2278-2285
- Mirra SS, Heyman A, McKeel D, Sumi SM, Crain BJ, Brownlee LM, Vogel FS, Hughes JD, von Belle G, Bert L (1991) The consortium to establish a registry for Alzheimer's Disease (CERAD). II. Standardization of the neuropathological assessment of Alzheimer's Disease. *Neurology* 41: 479-486
- Mirzabekov T, Lin MC, Yuan WL, Marshall PJ, Carman M, Tomaselli K, Lieberburg I, Kagan BL (1994) Channel formation in planar lipid bilayers by a neurotoxic fragment of the beta-amyloid peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 202: 1142-1148
- Miyamoto A, Araiso T, Koyama T, Ohshika H (1990) Membrane viscosity correlates with alpha 1-adrenergic signal transduction of the aged rat cerebral cortex. *J Neurochem* 55: 70-75
- Miyata M, Smith JD (1996) Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and beta-amyloid peptides. *Nat Genet* 14: 55-61
- Moghadasian MH, McManus BM, Nguyen LB, Shefer S, Nadji M, Godin DV, Green TJ, Hill J, Yang Y, Scudamore CH, Frohlich JJ (2001) Pathophysiology of apolipoprotein E deficiency in mice: relevance to apo E-related disorders in humans. *FASEB J* 15: 2623-2630
- Mohs RC, Rosen WG, Davis KL (1983) The Alzheimer's Disease Assessment Scale: An instrument for assessing treatment efficacy. *Psychopharmacol Bull* 19: 448-450
- Montine TJ, Montine KS, Olson SJ, Graham DG, Roberts LJ, Morrow JD, Linton MF, Fazio S, Swift LL (1999) Increased cerebral cortical lipid peroxidation and abnormal phospholipids in aged homozygous apoE-deficient C57BL/6J mice. *Exp Neurol* 158: 234-241
- Montine TJ, Montine KS, Swift LL (1997) Central nervous system lipoproteins in Alzheimer's Disease. *Am J Pathol* 151: 1571-1575
- Morell P, Jurevics H (1997) The sources of cholesterol in the rat brain during fetal and postnatal development. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 7: 187-194
- Morishima-Kawashima M, Ihara Y (1998) The presence of amyloid beta-protein in the detergent-insoluble membrane compartment of human neuroblastoma cells. *Biochemistry* 37: 15247-15253
- Müller WE (2002) Neue Therapiestudien zu Antidementiva. *Pharmazie in unserer Zeit* 4 (31. Jahrg.): 382-388
- Müller WE, Eckert GP, Scheuer K, Cairns NJ, Maras A, Gattaz WF (1998) Effects of beta-amyloid peptides on the fluidity of membranes from frontal and parietal lobes of human brain. High potencies of A β 1-42 and A β 1-43. *Amyloid* 5: 10-15

- Müller WE, Kirsch C, Eckert GP (2001) Membrane-disordering effects of beta-amyloid peptides. *Biochem Soc Trans* 29: 617-623
- Müller WE, Koch S, Eckert A, Hartmann H, Scheuer K (1995) beta-Amyloid peptide decreases membrane fluidity. *Brain Res* 674: 133-136
- Mulder M, Blokland A, van den Berg DJ, Schulten H, Bakker AH, Terwel D, Honig W, de Kloet ER, Havekes LM, Steinbusch HW, de Lange EC (2001) Apolipoprotein E protects against neuropathology induced by a high-fat diet and maintains the integrity of the blood-brain barrier during aging. *Lab Invest* 81: 953-960
- Mulder M, Terwel D (1998) Possible link between lipid metabolism and cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer's disease: A role for high-density lipoproteins? *Haemostasis* 28: 174-194
- Murata M, Peranen J, Schreiner R, Wieland F, Kurzchalia TV, Simons K (1995) VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 10339-10343
- Nagy K, Nagy V, Bertoni-Freddari C, Nagy I (1983) Alterations of the synaptosomal membrane 'microviscosity' in the brain cortex of rats during aging and centrophenoxine treatment. *Arch Gerontol Geriatr* 2: 23-39
- Naidu A, Xu Q, Catalano R, Cordell B (2002) Secretion of apolipoprotein E by brain glia requires protein prenylation and is suppressed by statins. *Brain Res* 958: 100-111
- Nakai D, Nakagomi R, Furuta Y, Tokui T, Abe T, Ikeda T, Nishimura K (2001) Human liver-specific organic anion transporter, LST-1, mediates uptake of pravastatin by human hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 297: 861-867
- Nakai M, Tanimukai S, Yagi K, Saito N, Taniguchi T, Terashima A, Kawamata T, Yamamoto H, Fukunaga K, Miyamoto E, Tanaka C (2001) Amyloid beta protein activates PKC-delta and induces translocation of myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) in microglia. *Neurochem Int* 38: 593-600
- Nakai T, Yamasaki A, Sakaguchi M, Kosaka K et al. (1999) Membrane topology of Alzheimer's Disease-related presenilin 1. Evidence for the existence of a molecular species with a seven membrane-spanning and one membrane-embedded structure. *J Biol Chem* 274: 23647-23658
- Nam JH, Yu CH, Hwang KA, Kim S, Ahn SH, Shin JY, Choi WY, Joo YR, Park KY (2002) Application of cDNA microarray technique to detection of gene expression in host cells infected with viruses. *Acta Virol* 46: 141-146
- Namba Y, Tomonaga M, Kawasaki H, Otomo E, Ikeda K (1991) Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's Disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeld-Jakob disease. *Brain Res* 541: 163-166
- Napoli C (2002) Nitric oxide and atherosclerotic lesion progression: an overview. *J Card Surg* 17: 355-362

Naslund J, Thyberg J, Tjernberg LO, Wernstedt C, Karlstrom AR, Bogdanovic N et al. (1995) Characterisation of stable complexes involving apolipoprotein E and the amyloid beta peptide in Alzheimer's Disease brain. *Neuron* 15: 219-228

Nathan BP, Jiang Y, Wong GK, Shen F, Brewer GJ, Struble RG (2002) Apolipoprotein E4 inhibits, and apolipoprotein E3 promotes neurite outgrowth in cultured adult mouse cortical neurons through the low-density lipoprotein receptor-related protein. *Brain Res* 928: 96-105

Nishiyama K, Trapp BD, Ikezu T, Ransohoff RM, Tomita T, Iwatsubo T, Kanazawa I, Hsiao KK, Lisanti MP, Okamoto T (1999) Caveolin-3 upregulation activates beta-secretase-mediated cleavage of the amyloid precursor protein in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 19: 6538-6548

Nitsch RM, Blusztajn JK, Pittas AG, Slack BE, Growdon JH, Wurtman RJ (1992) Evidence for a membrane defect in Alzheimer disease brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 1671-1675

Niwa S, Totsuka T, Hayashi S (1996) Inhibitory effect of fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, on the expression of adhesion molecules on human monocyte cell line. *Int J Immunopharmacol* 18: 669-675

Notkola IL, Sulkava R, Pekkanen J, Erkinjuntti T, Ehnholm C, Kivinen P, Tuomilehto J, Nissinen A (1998) Serum total cholesterol, apolipoprotein E epsilon 4 allele, and Alzheimer's disease. *Neuroepidemiology* 17: 14-20

Ntambi JM (1999) Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *J Lipid Res* 40: 1549-1558

Ntambi JM, Bene H (2001) Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. *J Mol Neurosci* 16: 273-278

Ohkubo N, Mitsuda N, Tamatini M, Yamaguchi A, Lee YD, Ogihara T, Vitek MP, Tohyama M (2001) Apolipoprotein E stimulates cAMP response element-binding protein transcriptional activity through the extracellular kinase signal-regulated kinase pathway. *J Biol Chem* 276: 3046-3053

Ohyagi Y, Yamada T, Nishioka K, Clarke NJ, Tomlinson AJ, Naylor S, Nakabeppu Y, Kira J, Younkin SG (2000) Selective increase in cellular A beta 42 is related to apoptosis but not necrosis. *Neuroreport* 11: 167-171

Ohyama H, Hiramatsu M, Ogawa N, Mori A (1995) Age-related differences in synaptosomal membrane fluidity. *Biochem Mol Biol Int* 37: 133-140

Ohvo-Rekilä H, Ramstedt B, Leppimäki P, Slotte JP (2002) Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Prog Lipid Res* 41: 66-97

Oitzl MS, Mulder M, Lucassen PJ, Havekes LM, Grootendorst J, and de Kloet ER (1997) Severe learning deficits in apolipoprotein E-knockout mice in a water maze task. *Brain Res* 752: 189-196

Oram JF (2002) Molecular basis of cholesterol homeostasis: lessons from Tangier disease and ABCA1. *Trends Mol Med* 8: 168-173

Orso E, Broccardo C, Kaminski WE, Bottcher A, Liebisch G, Drobnik W, Gotz A, Chambenoit O, Diederich W, Langmann T, Spruss T, Luciani MF, Rothe G, Lackner KJ, Chimini G, Schmitz G (2000) Transport of lipids from golgi to plasma membrane is defective in tangier disease patients and Abc1-deficient mice. *Nat Genet* 24: 192-196

Oshima N, Morishima-Kawashima M, Yamaguchi H, Yoshimura M, Sugihara S, Khan K, Games D, Schenk D, Ihara Y (2001) Accumulation of amyloid beta-protein in the low-density membrane domain accurately reflects the extent of beta-amyloid deposition in the brain. *Am J Pathol* 158: 2209-2218

Pahan K, Sheikh FG, Namboodiri AM et al. (1997) Lovastatin and phenylacetata inhibit the induction of nitric oxide synthase and cytokines in rat primary astrocytes, microglia and macrophages. *J Clin Invest* 100: 2671-2679

Panza F, Solfrizzi V, Colacicco AM, Basile AM, D'Introno A, Capurso C, Sabba M, Capurso S, Capurso A (2003) Apolipoprotein E (APOE) polymorphism influences serum APOE levels in Alzheimer's disease patients and centenarians. *Neuroreport* 14: 605-618

Papassotiropoulos A, Streffer JR, Tsolaki M, Schmid S, Thal D, Nicosia F, Iakovidou V, Maddalena A, Lutjohann D, Ghebremedhin E, Hegi T, Pasch T, Traxler M, Bruhl A, Benussi L, Binetti G, Braak H, Nitsch RM, Hock C (2003) Increased Brain beta-Amyloid Load, Phosphorylated Tau, and Risk of Alzheimer Disease Associated With an Intronic CYP46 Polymorphism. *Arch Neurol* 60: 29-35

Pappolla MA, Smith MA, Bryant-Thomas T, Bazan N, Petanceska S, Perry G, Thal LJ, Sano M, Refolo LM (2002) Cholesterol, oxidative stress, and Alzheimer's disease: expanding the horizons of pathogenesis(1). *Free Radic Biol Med* 33: 173-181

Pardridge WM (1991) Advances in cell biology of blood-brain barrier transport. *Semin Cell Biol* 2: 419-422

Petanceska SS, DeRosa S, Olm V, Diaz N, Sharma A, Thomas-Bryant T, Duff K, Pappolla M, Refolo LM (2002) Statin therapy for Alzheimer's disease: will it work? *J Mol Neurosci* 19: 155-161

Pettegrew JW, McClure RJ, Kafner JN, Mason RP, Panchalingam K, Klunk WE (1993) The role of membranes and energetics in Alzheimer's Disease. In: *Alzheimer Disease* (Terry RD, Katzman R, Bick KL, ed.), Raven Press, New York, S. 369-386

Pettegrew JW, Panchalingam K, Hamilton RL, McClure RJ (2001) Brain membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease. *Neurochem Res* 26: 771-782

Pike CJ, Burdick D, Walencewicz AJ, Glabe CG, Cotman CW (1993) Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. *J Neurosci* 13: 1676-1687

Pillot T, Goethals M, Najib J et al. (1999) Beta-amyloid peptide interacts specifically with the carboxy-terminal domain of human apolipoprotein E : relevance to Alzheimer's Disease. *J Neurochem* 72: 230-237

Pirttila T, Soininen H, Heinonen O, Lehtimäki T, Bogdanovic N, Paljarvi L, Kosunen O, Winblad B, Riekkinen P, Sr., Wisniewski HM, Mehta PD (1996) Apolipoprotein E (apoE) levels in brains from Alzheimer disease patients and controls. *Brain Res* 722: 71-77

Pitas RE, Boyles JK, Lee SH, Foss D, Mahley RW (1987) Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E lipoproteins. *Biochem Biophys Acta* 917: 148-161

Plump AS, Breslow JL (1995) Apolipoprotein E and the apolipoprotein E-deficient mouse. *Annu Rev Nutr* 15:495-518: 495-518

Podlinsky MB, Walsh DM, Amarante P, Ostaszewski BL, Stimson ER, Maggio JE, Teplow DB, Selkoe DJ (1998) Oligomerization of endogenous and synthetic amyloid beta-protein at nanomolar levels in cell culture and stabilization of monomer by Congo red. *Biochemistry* 37: 3602-3611

Poduslo JF, Curran GL, Sanyal B, Selkoe DJ (1999) Receptor-mediated transport of human amyloid beta-protein 1-40 and 1-42 at the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis* 6: 190-199

Poirier J (2000) Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. A role in amyloid catabolism. *Ann N Y Acad Sci* 924: 81-90

Poirier J (1994) Apolipoprotein E in animal models of CNS injury and in Alzheimer's Disease. *Trends Neurosci* 17: 525-530

Poirier J (1996) Apolipoprotein E in the brain and its role in Alzheimer's disease. *J Psychiatry Neurosci* 21: 128-134

Poirier J, Baccichet A, Dea D, Gauthier S (1993) Cholesterol synthesis and lipoprotein reuptake during synaptic remodelling in hippocampus in adult rats. *Neuroscience* 55: 81-90

Poirier J, Delisle MC, Quirion R, Aubert I, Farlow M, Lahiri D, Hui S, Bertrand PJ, Nalbantoglu B, Gilfix M, Gauthier S (1995) Apolipoprotein E allele as a predictor of cholinergic deficits and treatment outcome in Alzheimer's Disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 12260-12264

Prasad MR, Lovell MA, Yatin M, Dhillon H, Markesbery WR (1998) Regional membrane phospholipid alterations in Alzheimer's Disease. *Neurochem Res* 23: 81-88

Pratico D, Rokach J, Tangirala RK (1998) Brains of aged apolipoprotein E-deficient mice have increased levels of F2-isoprostanes, in vivo markers of lipid-peroxidation. *J Neurochem* 73: 736-741

Puglielli L, Konopka G, Pack-Chung E, Ingano LA, Berezovska O, Hyman BT, Chang TY, Tanzi RE, Kovacs DM (2001) Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase modulates the generation of the amyloid beta-peptide. *Nat Cell Biol* 3: 905-912

Puglielli L, Tanzi RE, Kovacs DM (2003) Alzheimer's disease: the cholesterol connection. *Nat Neurosci* 6: 345-351

- Racchi M, Baetta R, Salvietti N, Ianna P, Franceschini G, Paoletti R, Fumagalli R, Govoni S, Trabucchi M, Soma M (1997) Secretory processing of amyloid precursor protein is inhibited by increase in cellular cholesterol content. *Biochem J* 322: 893-898
- Ramassamy C, Averill D, Beffert U, Theroux L, Lussier-Cacan S, Cohn JS, Christen Y, Schoofs A, Davignon J, Poirier J (2000) Oxidative insults are associated with apolipoprotein E genotype in Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Dis* 7: 23-37
- Rao AM, Igbavboa U, Semotuk M, Schroeder F, Wood WG (1993) Kinetics and size of cholesterol lateral domains in synaptosomal membranes: modification by sphingomyelinase and effects on membrane enzyme activity. *Neurochem Int* 23: 45-52
- Rapoport SI, Chang MC, Spector AA (2001) Delivery and turnover of plasma-derived essential PUFAs in mammalian brain. *J Lipid Res* 42: 678-685
- Rapoport M, Dawson HN, Binder LI, Vitek MP, Ferreira A (2002) Tau is essential to beta - amyloid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 6364-6369
- Refolo LM, Pappolla MA, LaFrancois J, Malester B, Schmidt SD, Thomas-Bryant T, Tint GS, Wang R, Mercken M, Petanceska SS, Duff KE (2001) A Cholesterol-Lowering Drug Reduces beta-Amyloid Pathology in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Neurobiol Dis* 8: 890-899
- Refolo LM, Pappolla MA, Malester B, LaFrancois J, Bryant-Thomas T, Wang R, Tint GS, Sambamurti K, Duff K (2000) Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol Dis* 7 : 321-331
- Revesz T, Holton JL, Lashley T, Plant G, Rostagno A, Ghiso J, Frangione B (2002) Sporadic and familial cerebral amyloid angiopathies. *Brain Pathol* 12: 343-357
- Riddell DR, Christie G, Hussain I, Dingwall C (2001) Compartmentalization of beta-secretase (Asp2) into low-buoyant density, noncaveolar lipid rafts. *Curr Biol* 11: 1288-1293
- Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, Sacks F, Braunwald E (1999) Long-term effects of pravastatin on plasma concentration of C-reactive protein. The Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. *Circulation* 1999 100: 230-235
- Rikitake Y, Kawashima S, Takeshita S, Yamashita T, Azumi H, Yasuhara M, Nishi H, Inoue N, Yokoyama M (2001) Anti-oxidative properties of fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, contribute to prevention of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 154: 87-96
- Rockwood K, Kirkland S, Hogan DB, MacKnight C, Merry H, Verreault R, Wolfson C, McDowell I (2002) Use of lipid-lowering agents, indication bias, and the risk of dementia in community-dwelling elderly people. *Arch Neurol* 59: 223-227
- Rodrigues CM, Sola S, Brito MA, Brondino CD, Brites D, Moura JJ (2001) Amyloid beta-peptide disrupts mitochondrial membrane lipid and protein structure: protective role of tauroursodeoxycholate. *Biochem Biophys Res Commun* 281: 468-474

Rodriguez EG, Dodge HH, Birzescu MA, Stoehr GP, Ganguli M (2002) Use of Lipid-Lowering Drugs in Older Adults With and Without Dementia: A Community-Based Epidemiological Study. *J Am Geriatr Soc* 50: 1852-1856

Roher AE, Weiss N, Kokjohn TA, Kuo YM, Kalback W, Anthony J, Watson D, Lührs DC, Sue L, Walker D, Emmerling M, Goux W, Beach T (2002) Increased Abeta peptides and reduced cholesterol and myelin proteins characterize white matter degeneration in Alzheimer's Disease. *Biochemistry* 41: 11080-11090

Roman GC, Tatemichi TK, Erkinjuntti T (1993) Vascular dementia: diagnostic criteria for research studies. Report of the NINDS-AIREN international workshop. *Neurology* 43: 250-260

Romas SN, Tang MX, Berglund L, Mayeux R (1999) APOE genotype, plasma lipids, lipoproteins, and AD in community elderly. *Neurology* 53: 517-521

Roth T, Richardson GR, Sullivan JP, Lee RM, Merlotti L, Roehrs T (1992) Comparative effects of pravastatin and lovastatin on nighttime sleep and daytime performance [see comments]. *Clin Cardiol* 15: 426-432

Rudolph IL, Kelley DS, Klasing KC, Erickson KL (2001) Regulation of cellular differentiation and apoptosis by fatty acids and their metabolites. *Nutr Res* 21: 381-393

Rubinsztein DC, Easton DF (1999) Apolipoprotein E genetic variation and Alzheimer's disease. A meta-analysis. *Dement Geriatr Cogn Disord* 10: 199-209

Runz H, Rietdorf J, Tomic I, de Bernard M, Beyreuther K, Pepperkok R, Hartmann T (2002) Inhibition of intracellular cholesterol transport alters presenilin localization and amyloid precursor protein processing in neuronal cells. *J Neurosci* 22: 1679-1689

Ruocco A, Postiglione A, Santillo M, Seru R, Avvedimento EV, Cuda G, Paterno R (2002) New possible role of statins in age-related diseases. *J Am Geriatr Soc* 50: 2099-2100

Russo C, Angelini G, Dapino D, Piccini A, Piombo G, Schettini G et al. (1998) Opposite roles of apolipoprotein E in normal brains and in Alzheimer's Disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 15598-15602

Sacks FM, Ridker PM (1999) Lipid lowering and beyond: results from the CARE study on lipoproteins and inflammation. *Cholesterol and Recurrent Events. Herz* 24: 51-56

Saheki A, Terasaki T, Tamai I, Tsuji A (1994) In vivo and in vitro blood-brain barrier transport of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors. *Pharm Res* 11: 305-311

Saito T, Kijima H, Kiuchi Y, Isobe Y, Fukushima K (2001) beta-amyloid induces caspase-dependent early neurotoxic change in PC12 cells: correlation with H₂O₂ neurotoxicity. *Neurosci Lett* 305: 61-64

Salem Jr N, Niebylski CD (1995) The nervous system has an absolute molecular species requirement for proper function. *Mol Membr Biol* 12: 131-134

Sambamurti K, Greig NH, Lahiri DK (2002) Advances in the cellular and molecular biology of the beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med* 1: 1-31

Sambamurti K, Seveler D, Koothan T, et al. (1999) Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins play an important role in the biogenesis of the Alzheimer's amyloid beta-protein. *J Biol Chem* 274: 26810-26814

Sandhu SK, Kaur G (2002) Alterations in oxidative stress scavenger system in aging rat brain and lymphocytes. *Biogerontology* 3: 161-173

Sani S, Traul D, Klink A, Niaraki N, Gonzalo-Ruiz A, Wu CK, Geula C (2003) Distribution, progression and chemical composition of cortical amyloid-beta deposits in aged rhesus monkeys: similarities to the human. *Acta Neuropathol (Berl)* 105: 145-156

Sano M, Ernesto C, Thomas RG, Klauber MR, Schafer K, Grundman M, Woodbury P, Growdon J, Cotman CW, Pfeiffer E, Schneider LS, Thal LJ (1997) A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. The Alzheimer's Disease Cooperative Study. *N Engl J Med* 336: 1216-1222

Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D (1993) Association of apolipoprotein E allele ϵ 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's Disease. *Neurology* 43: 1467-1472

Sawamura N, Gong JS, Chang TY, Yanagisawa K, Michikawa M (2003) Promotion of tau phosphorylation by MAP kinase Erk1/2 is accompanied by reduced cholesterol level in detergent-insoluble membrane fraction in Niemann-Pick C1-deficient cells. *J Neurochem* 84: 1086-1096

Sawyer WH (1988) Fluorescence spectroscopy in the study of membrane fluidity: model membrane systems. In: *Methods for studying membrane fluidity*. (Aloia RC, Curtain CC, Gordon LM, eds.), Alan R. Liss, Inc., New York, S. 161-192

Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Liao Z, Lieberburg I, Motter R, Mutter L, Soriano F, Shopp G, Vasquez N, Vandeventer C, Walker S, Wogulis M, Yednock T, Games D, Seubert P (1999) Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400: 173-177

Scheuer K, Maras A, Gattaz WF, Cairns N, Forstl H, Müller WE (1996) Cortical NMDA receptor properties and membrane fluidity are altered in Alzheimer's disease. *Dementia* 7: 210-214

Scheuer K, Stoll S, Paschke U, Weigel R, Müller WE (1995) N-methyl-D-aspartate receptor density and membrane fluidity as possible determinants of the decline of passive avoidance performance in aging. *Pharmacol Biochem Behav* 50: 65-70

Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, Crain BJ, Hulette CM, Joo SH, M.A., Goldgaber D, Roses AD (1993) Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 9649-9653

Schmitz G, Orso E (2001) Intracellular cholesterol and phospholipid trafficking: Comparable mechanisms in macrophages and neuronal cells. *Neurochem Res* 26: 1045-1068

- Schönknecht P, Lütjohann D, Pantel J, Bardenheuer H, Hartmann T, von Bergmann K, Beyreuther K, Schroeder J (2002) Cerebrospinal fluid 24S-hydroxycholesterol is increased in patients with Alzheimer's disease compared to healthy controls. *Neurosci Lett* 324: 83-85
- Schönknecht P, Pantel J, Klinga K, Jensen M, Hartmann T, Salbach B, Schroeder J (2001) Reduced cerebrospinal fluid estradiol levels are associated with increased beta-amyloid levels in female patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 307: 122-124
- Schroeder F (1988) Use of fluorescence spectroscopy in the assessment of biological membrane properties. In: *Methods for studying membrane fluidity* (Aloia RC, Curtain CC, Gordon LM, eds.), Alan R. Liss, Inc., New York, S.193-217
- Schroeder F (1981) Use of a fluorescent sterol to probe the transbilayer distribution of sterols in biological membranes. *FEBS Lett* 135: 127-130
- Schroeder F, Barenholz Y, Gratton E, Thompson TE (1987) A fluorescence study of dehydroergosterol in phosphatidylcholine bilayer vesicles. *Biochemistry* 26: 2441-2448
- Schroeder F, Frolov AA, Murphy EJ, Atshaves BP, Jefferson JR, Pu L, Wood WG, Foxworth WB, Kier AB (1996) Recent advances in membrane cholesterol domain dynamics and intracellular cholesterol trafficking. *Proc Soc Exp Biol Med* 213: 150-177
- Schroeder F, Gallegos AM, Atshaves BP, Storey SM, McIntosh AL, Petrescu AD, Huang H, Starodub O, Chao H, Yang H, Frolov A, Kier AB (2001) Recent advances in membrane microdomains: rafts, caveolae, and intracellular cholesterol trafficking. *Exp Biol Med* (Maywood) 226: 873-890
- Schroeder F, Kier AB, Sweet WD (1990) Role of polyunsaturated fatty acids and lipid peroxidation in LM fibroblast plasma membrane transbilayer structure. *Arch Biochem Biophys* 276: 55-64
- Schroeder F, Morrison WJ, Gorka C, Wood WG (1988) Transbilayer effects of ethanol on fluidity of brain membrane leaflets. *Biochim Biophys Acta* 946: 85-94
- Schroeder F, Nemezc G, Wood WG, Joiner C, Morrot G, Ayrault-Jarrier M, Devaux PF (1991) Transmembrane distribution of sterol in the human erythrocyte. *Biochim Biophys Acta* 1066: 183-192
- Scott J (2002) The pathogenesis of atherosclerosis and new opportunities for treatment and prevention. *J Neural Transm Suppl.* 63: 1-17
- Selkoe DJ (1994) Alzheimer's disease: a central role for amyloid. *J Neuropathol Exp Neurol* 53: 438-447
- Selkoe DJ (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81: 741-766
- Selkoe DJ (2000) Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *Ann N Y Acad Sci.* 924: 17-25.

Selkoe DJ, Yamazaki T, Citron M, Podlisny MB, Koo EH, Teplow DB, Haass C (1996) The role of APP processing and trafficking pathways in the formation of amyloid beta-protein. *Ann N Y Acad Sci* 777: 57-64

Serruys PW, De Feyter PJ, Benghozi R, Hugenholtz PG, Lesaffre E (2001) The Lescol(R) Intervention Prevention Study (LIPS): a double-blind, placebo-controlled, randomized trial of the long-term effects of fluvastatin after successful transcatheter therapy in patients with coronary heart disease. *Int J Cardiovasc Intervent* 4: 165-172

Sever N, Yang T, Brown MS, Goldstein JL, DeBose-Boyd RA (2003) Accelerated degradation of HMG CoA reductase mediated by binding of insig-1 to its sterol-sensing domain. *Mol Cell* 11: 25-33

Sheehy N, Vaughan CJ, Delanty N (2001) Statins and neuroprotection. *Expert Opin Invest Drugs* 10: 1847-1853

Shepherd J (1998) Preventing coronary artery disease in the West of Scotland: implications for primary prevention. *Am J Cardiol* 82: 57T-59T

Shibata M, Yamada S, Kumar SR, Calero M, Bading J, Frangione B, Holtzman DM, Miller CA, Strickland DK, Ghiso J, Zlokovic BV (2000) Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *J Clin Invest* 106: 1489-1499

Shie FS, LeBoeur RC, Jin LW (2003) Early intraneuronal Abeta deposition in the hippocampus of APP transgenic mice. *Neuroreport* 14: 123-129

Shie FS, Jin LW, Cook DG, Leverenz JB, LeBoeuf RC (2002) Diet-induced hypercholesterolemia enhances brain Abeta accumulation in transgenic mice. *Neuroreport* 13: 455-459

Shinitzky M (1987) Patterns of lipid changes in membranes of the aged brain. *Gerontology* 33: 149-154

Sidera C, Frimpong-Manso J, Liu C, Austen BM (2002) The role of cholesterol in the processing of beta-secretase Asp-2. In: *Proceedings of the 2nd International Congress on Vascular Dementia, Salzburg, Austria* (Amos D Korczyn, ed.), Monduzzi Editore, International Proceedings Division, S. 147-153

Simes RJ, Marschner IC, Hunt D, Colquhoun D, Sullivan D, Stewart RA, Hague W, Keech A, Thompson P, White H, Shaw J, Tonkin A; The LIPID Study Investigators (2002) Relationship between lipid levels and clinical outcomes in the Long-term Intervention with Pravastatin in Ischemic Disease (LIPID) Trial: to what extent is the reduction in coronary events with pravastatin explained by on-study lipid levels? *Circulation* 105: 1162-1169

Simmons LK, May PC, Tomaselli KJ, Rydel RE, Fuson KS, Brigham EF, Wright S, Lieberburg I, Becker GW, Brems DN et al. (1994) Secondary structure of amyloid beta peptide correlates with neurotoxic activity in vitro. *Mol Pharmacol* 45: 373-379

Simons K, Eehalt K (2002) Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J Clin Invest* 110: 597-603

- Simons K, Ikonen E (2000) How cells handle cholesterol. *Science* 290: 1721-1726
- Simons K, Toomre D (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 31-39
- Simons M, Keller P, De Strooper B, Beyreuther K, Dotti CG, Simons K (1998) Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 6460-6464
- Simons M, Keller P, Dichgans J, Schulz JB (2001) Cholesterol and Alzheimer's disease: Is there a link? *Neurology* 57: 1089-1093
- Simons M, Schwarzler F, Lutjohann D, von Bergmann K, Beyreuther K, Dichgans J, Wormstall H, Hartmann T, Schulz JB (2002) Treatment with simvastatin in normocholesterolemic patients with Alzheimer's disease: A 26-week randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Ann Neurol* 52: 346-350
- Singer SJ, Nicolson GL (1972) The fluid mosaic model of structure of cell membranes. *Science* 175: 720-731
- Singh IN, Sorrentino G, Kanfer JN (1997) Amyloid beta protein (25-35) stimulation of phospholipase C in LA-N-2 cells. *J Neurochem* 69: 252-258
- Sinha S, Lieberburg I (1999) Cellular mechanisms of beta-amyloid production and secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 11049-11053
- Sirtori CR (1993) Tissue selectivity of hydroxymethylglutaryl coenzyme A (HMG CoA) reductase inhibitors. *Pharmacol Ther* 60: 431-459
- Skoog I (2000) Vascular aspects in Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl* 59: 37-43
- Slotte JP (1997) Cholesterol-sphingomyelin interactions in cells - effects on lipid metabolism. *Subcell Biochem* 28: 277-293
- Slotte JP, Bierman EL (1988) Depletion of plasma-membrane sphingomyelin rapidly alters the distribution of cholesterol between plasma membranes and intracellular cholesterol pools in cultured fibroblasts. *Biochem J* 250: 653-658
- Smart EJ, Ying YS, Donzell WC, Anderson RGW (1996) A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J Biol Chem* 271: 29427-29435
- Smith MA, Sayre LM, Monnier VM, Perry G (1995) Radical AGEing in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 18: 172-176
- Soto C, Golabek A, Wisniewski T, Castano EM (1996) Alzheimer's beta-amyloid peptide is conformationally modified by apolipoprotein E in vitro. *Neuroreport* 7: 721-725
- Sparks DL (1997) Coronary artery disease, hypertension, ApoE, and cholesterol: a link to Alzheimer's disease? *Ann N Y Acad Sci* 826: 128-146

Sparks DL, Connor DJ, Browne PJ, Lopez JE, Sabbagh MN (2002) HMG-CoA reductase inhibitors (statins) in the treatment of Alzheimer's disease and why it would be ill-advised to use one that crosses the blood-brain barrier. *J Nutr Health Aging* 6: 324-331

Sparks DL, Liu H, Gross DR, Scheff SW (1995) Increased density of cortical apolipoprotein E immunoreactive neurons in rabbit brain after dietary administration of cholesterol. *Neurosci Lett* 187: 142-144

Sparks DL, Martin TA, Gross DR, Hunsaker JC, III (2000) Link between heart disease, cholesterol, and Alzheimer's disease: a review. *Microsc Res Tech* 50: 287-290

Sparks DL, Scheff SW; Hunsaker JC, Liu H, Landers T, Gross DR (1994) Induction of Alzheimer-like beta-amyloid immunoreactivity in the brains of rabbits with dietary cholesterol. *Exp Neurol* 126: 88-94

Spector AA (2001) Plasma free fatty acid and lipoproteins as sources of polyunsaturated fatty acid for the brain. *J Mol Neurosci* 16: 159-165

Staffa JA, Chang J, Green L (2002) Cerivastatin and reports of fatal rhabdomyolysis. *N Engl J Med* 346: 539-540

Stamer K, Vogel R, Thies E, Mandelkow E, Mandelkow EM (2002) Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *J Cell Biol* 156: 1051-1063

Stan RV (2002) Structure and function of endothelial caveolae. *Microsc Res Tech* 57: 350-364

Steiner H, Winkler E, Edbauer D, Prokop S, Basset G, Yamasaki A, Kostka M, Haass C (2002) PEN-2 is an integral component of the gamma-secretase complex required for coordinated expression of presenilin and nicastrin. *J Biol Chem* 277: 39062-39065

Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD (1993a) Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 1977-1981

Strittmatter WJ, Saunders AM, Goedert M, Weisgraber KH, Dong LM, Jakes R, Huang DY, Pericak-Vance M, Schmechel D, Roses AD (1994) Isoform-specific interactions of apolipoprotein E with microtubule-associated protein tau: implications for Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 11183-11186

Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Huang DY, Dong LM, Salvesen GS, Pericak-Vance M, Schmechel D, Saunders AM, Goldgaber D, Roses AD (1993b) Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 8098-8102

Stroznajder JB, Zambrzycka A, Kacprzak MD, Strosznajder RP (1999) Amyloid beta-peptide (25-35) modulates hydrolysis of phosphoinositides by membrane phospholipases C of adult brain cortex. *J Mol Neurosci* 12: 101-109

Stryer L (1995) *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

- Stulnig TM, Berger M, Sigmund T, Stockinger H, Horejsi V, Waldhausl W (1997) Signal transduction via glycosyl phosphatidylinositol-anchored proteins in T cells is inhibited by lowering cellular cholesterol. *J Biol Chem* 272: 19242-19247
- Stulnig TM, Huber J, Leitinger N, Imre EM, Angelisova P, Nowotny P, Waldhausl W (2001) Polyunsaturated eicosapentaenoic acid displaces proteins from membrane rafts by altering raft lipid composition. *J Biol Chem* 276: 37335-37340
- Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold KH, Mistl C, Rothacher S, Ledermann B, Burki K, Frey P, Paganetti PA, Waridel C, Calhoun ME, Jucker M, Probst A, Staufenbiel M, Sommer B (1997) Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 13287-13292
- Subasinghe S, Unabia S, Barrow CJ, Mok SS, Aguilar MI, Small DH (2003) Cholesterol is necessary both for the toxic effect of Abeta peptides on vascular smooth muscle cells and for Abeta binding to vascular smooth muscle cell membranes. *J Neurochem* 84: 471-479
- Sugawa M, Coper H, Schulze G, Yamashina I, Krause F, Dencher NA (1996) Impaired plasticity of neurons in aging. Biochemical, biophysical and behavioral studies. *Ann N Y Acad Sci USA* 786: 274-282
- Sun YX, Crisby M, Lindgren S, Janciauskiene S (2003) Pravastatin inhibits pro-inflammatory effects of Alzheimer's peptide Abeta (1-42) in glioma cell culture in vitro. *Pharmacol Res* 47: 119-126
- Svennerholm L, Gottfries CG (1994) Membrane lipids, selectively diminished in Alzheimer brains, suggest synapse loss as a primary event in early-onset form (type I) and demyelination in late-onset form (type II). *J Neurochem* 62:1039-1047
- Sviridov D (1999) Intracellular cholesterol trafficking. *Histol Histopathol* 14:305-319
- Sweet WD, Schroeder F (1986) Charged anaesthetics alter LM-fibroblast plasma-membrane enzymes by selective fluidization of inner or outer membrane leaflets. *Biochem J* 239: 301-310
- Takemoto M, Liao JK (2001) Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 1712-1719
- Tokuda T, Calero M, Matsubara E, Vidal R, Kumar A, Permanne B et al. (2000) Lipidation of apolipoprotein E influences its isoform-specific interaction with Alzheimer's amyloid beta peptides. *Biochem J* 348: 359-365
- Tandon A, Rogaeva E, Mullan M, St George-Hyslop PH (2000) Molecular genetics of Alzheimer's disease: the role of beta-amyloid and the presenilins. *Curr Opin Neurol* 13: 377-384
- Tang MX, Jacobs D, Stern Y, Marder K, Schofield P, Gurland B, Andrews H, Mayeux R (1996) Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease. *Lancet* 348: 429-432

- Tang Z, Scherer PE, Okamoto T, Song K, Chu C, Kohtz DS, Nishimoto I, Lodish HF, Lisanti MP (1996) Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J Biol Chem* 271: 2255-2261
- Tansey TR, Shechter I (2000) Structure and regulation of mammalian squalene synthase. *Biochim Biophys Acta* 1529: 49-62
- Taraboulos A, Scott M, Semenov A, Avrahami D, Laszlo L, Prusiner SB, Avraham D (1995) Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform. *J Cell Biol* 129: 121-132
- Terracina L, Brunetti M, Avellini L, de Medio GE, Trovattelli G, Gaiti A (1992) Arachidonic and palmitic acid utilization in aged rat brain areas. *Mol Cell Biochem* 115: 35-42
- Terwel D, Dewachter L, Van Leuven F (2002) Axonal transport, tau protein, and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med* 2: 151-165
- Terzi E, Holzemann G, Seelig J (1997) Interaction of Alzheimer beta-amyloid peptide (1-40) with lipid membranes. *Biochemistry* 36: 14845-14852
- Tesseur I, Van Dorpe J, Spittaels K, Van den Haute C, Moechars D, Van Leuven F (2000) Expression of human apolipoprotein E4 in neurons causes hyperphosphorylation of protein tau in the brains of transgenic mice. *Am J Pathol* 156: 951-964
- Tienari PJ, Ida N, Ikonen E, Simons M, Weidemann A, Multhaup G, Masters CL, Dotti CG, Beyreuther K (1997) Intracellular and secreted Alzheimer beta-amyloid species are generated by distinct mechanisms in cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 4125-4130
- Tierney MC, Fisher RH, Lewis AJ, Zorzitto ML, Snow WG, Reid DW, Nieuwstraten P (1988) The NINCDS-ADRDA work group criteria for the clinical diagnosis of probable Alzheimer's Disease: A clinicopathologic study of 57 cases. *Neurology* 38: 359-364
- Todd PA, Goa KL (1990) Simvastatin. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in hypercholesterolaemia. *Drugs* 40: 583-607
- Trommsdorff M, Gotthardt M, Hiesberger T (1999) Reeler/disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and apoE receptor 2. *Cell* 97: 689-701
- Tschäpe JA, Hammerschmied C, Muhlig-Versen M, Athenstaedt K, Daum G, Kretschmar D (2002) The neurodegeneration mutant lochrig interferes with cholesterol homeostasis and Appl processing. *EMBO J* 21: 6367-6376
- Tsuji A, Saheki A, Tamai I, Terasaki T (1993) Transport mechanism of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors at the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther* 267: 1085-1090
- Tun H, Marlow L, Pinnix I, Kinsey R, Sambamurti K (2002) Lipid rafts play an important role in A beta biogenesis by regulating the beta-secretase pathway. *J Mol Neurosci* 19: 31-35

- Turley SD, Burns DK, Dietschy JM (1998) Preferential utilization of newly synthesized cholesterol for brain growth in neonatal lambs. *Am J Physiol* 274: E1099-E1105
- Uittenbogaard A, Ying Y, Smart EJ (1998) Characterisation of a cytosolic heat shock protein-caveolin chaperone complex. *J Biol Chem* 273: 6525-6532
- Urmoneit B, Prikulis I, Wihl G, Dürso D, Frank R, Heeren J, Beisiegel U, Prior R (1997) Cerebrovascular smooth muscle cells internalize Alzheimer amyloid beta protein via a lipoprotein pathway: Implications for cerebral amyloid angiopathy. *Lab Invest* 77: 157-166
- Urmoneit B, Turner J, Dyrks T (1998) Cationic lipids (lipofectamine) and disturbance of cellular cholesterol and sphingomyelin distribution modulates gamma-secretase activity within amyloid precursor protein in vitro. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 55: 331-343
- Van Blitterswijk WJ, Van Hoeven RP, Van der Meer BW (1981) Lipid structural order parameters (reciprocal of fluidity) in biomembranes derived from steady-state fluorescence measurements. *Biochim Biophys Acta* 644: 323-332
- Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarente P, Loeloff R et al. (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286: 735-741
- Vekrellis K, Ye Z, Qiu WQ, Walsh D, Hartley D, Chesneau V, Rosner MR, Selkoe DJ (2000) Neurons regulate extracellular levels of amyloid beta-protein via proteolysis by insulin-degrading enzyme. *J Neurosci* 20: 1657-1665
- Veinbergs I, Mallory M, Sagara Y, Masliah E (2000) Vitamin E supplementation prevents spatial learning deficits and dendritic alterations in aged apolipoprotein E-deficient mice. *Eur J Neurosci* 12: 4541-4546
- Veinbergs I, Mallory M, Mante M, Rockenstein E, Gilbert JR, Masliah E (1999) Differential neurotrophic effects of apolipoprotein E in aged transgenic mice. *Neurosci Lett* 265 : 218-222
- Veinbergs I, Masliah E (1999) Synaptic alterations in apolipoprotein E knockout mice. *Neuroscience* 91: 401-403
- Veinbergs I, Jung MW, Young SJ, Van Uden E, Groves PM, Masliah E (1998) Altered long-term potentiation in the hippocampus of apolipoprotein E-deficient mice. *Neurosci Lett* 249: 71-74
- Vgontzas AN, Kales A, Bixler EO, Manfredi RL, Tyson KL (1991) Effects of lovastatin and pravastatin on sleep efficiency and sleep stages. *Clin Pharmacol Ther* 50: 730-737
- Viani P, Cervato G, Fiorilli A, Cestaro B (1991) Age-related differences in synaptosomal peroxidative damage and membrane properties. *J Neurochem* 56: 253-258
- Vohra BP, Sharma SP, Kansal VK (2001) Age-dependent variations in mitochondrial and cytosolic antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different regions of central nervous system of guinea pigs. *Indian J Biochem Biophys* 38: 321-326

Volpe JJ, Goldberg RI, Bhat NR (1985) Cholesterol biosynthesis and its regulation in dissociated cell cultures of fetal rat brain: developmental changes and the role of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J Neurochem* 45: 536-543

Wahrle S, Das P, Nyborg AC, McLendon C, Shoji M, Kawarabayashi T, Younkin LH, Younkin SG, Golde TE (2002) Cholesterol-dependent gamma-secretase activity in buoyant cholesterol-rich membrane microdomains. *Neurobiol Dis* 9: 11-23

Walker LC, Parker CA, Lipinski WJ, Callahan MJ, Carroll RT, Gandy SE, Smith JD, Jucker M, Bisgaier CL (1997) Cerebral lipid deposition in aged apolipoprotein-E-deficient mice. *Am J Pathol* 151: 1371-1377

Walter J, Fluhrer R, Hartung B, Willem M, Kaether C, Capell A, Lammich S, Multhaup G, Haass C (2001b) Phosphorylation regulates intracellular trafficking of beta-secretase. *J Biol Chem* 276: 14634-14641

Walter J, Kaether C, Steiiner H, Haass C (2001a) The cell biology of Alzheimer's Disease: uncovering the secrets of secretases. *Curr Opin Neurobiol* 11: 585-590

Wang SS, Rymer DL, Good TA (2001) Reduction in cholesterol and sialic acid content protects cells from the toxic effects of beta-amyloid peptides. *J Biol Chem* 276: 42027-42034

Wang X, Luebke P, Gruenstein E, Zemlan F (1998) Apolipoprotein E (ApoE) peptide regulates tau phosphorylation via two different signaling pathways. *J Neurosci Res* 51: 658-665

Wang YX, Martin-McNulty B, Huw LY, da C, V, Post J, Hinchman J, Vergona R, Sullivan ME, Dole W, Kauser K (2002) Anti-atherosclerotic effect of simvastatin depends on the presence of apolipoprotein E. *Atherosclerosis* 162: 23-31

Wang E, Casciano CN, Clement RP, Johnson WW (2001) HMG-CoA reductase inhibitors (statins) characterized as direct inhibitors of P-glycoprotein. *Pharm Res* 18: 800-806

Waschuk S, Elton EA, Darabie AA, Fraser PE, McLaurin J (2001) Cellular membrane composition defines Amyloid-beta lipid interactions. *J Biol Chem* 276: 33561-33568

Wassmann S, Laufs U, Baumer AT, Muller K, Konkol C, Sauer H, Bohm M, Nickenig G (2001) Inhibition of geranylgeranylation reduces angiotensin II-mediated free radical production in vascular smooth muscle cells: involvement of angiotensin AT1 receptor expression and Rac1 GTPase. *Mol Pharmacol* 59: 646-654

Weber G (1952) Resolution of heterogeneous fluorescence from proteins and aromatic amino acids by phase-sensitive detection of fluorescence. *Biochem J* 51: 145-167

Weisgraber KH, Innerarity TL, Mahley RW (1982) Abnormal lipoprotein receptor-binding activity of the human E apoprotein due to cysteine-arginine interchange at a single site. *J Biol Chem* 257: 2518-2521

Wells K, Farooqui AA, Liss L, Horrocks LA (1995) Neural membrane phospholipids in Alzheimer disease. *Neurochem Res* 20: 1329-1333

- Werner N, Nickenig G, Laufs U (2002) Pleiotropic effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Basic Res Cardiol* 97: 105-116
- Williams D, Feely J (2002) Pharmacokinetic-pharmacodynamic drug interactions with HMG-CoA reductase inhibitors. *Clin Pharmacokinet* 41: 343-370
- Williams RO, Mahaguna V, Sriwongjanya M (1998) Characterization of an inclusion complex of cholesterol and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Eur J Pharm Biopharm* 46: 355-360
- Wisniewski T, Castano E, Golabek A, Vogel T, Frangione B (1994) Acceleration of Alzheimer's fibril formation by apolipoprotein E in vitro. *Am J Pathol* 145: 1030-1035
- Wisniewski T, Frangione B (1992) Apolipoprotein E: a pathological chaperone protein with cerebral and systemic amyloid. *Neurosci Lett* 135: 235-238
- Wollmer MA, Streffer JR, Lutjohann D, Tsolaki M, Iakovidou V, Hegi T, Pasch T, Jung HH, Bergmann K, Nitsch RM, Hock C, Papassotiropoulos A (2003) ABCA1 modulates CSF cholesterol levels and influences the age at onset of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 24: 421-426
- Wolozin B (2001) A fluid connection: cholesterol and A beta. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 5371-5373
- Wolozin B (2002) Cholesterol and Alzheimer's disease. *Biochem Soc Trans* 30: 525-529
- Wolozin B (2003) Cyp46 (24S-Cholesterol Hydroxylase): A Genetic Risk Factor for Alzheimer Disease. *Arch Neurol* 60: 16-18
- Wolozin B, Kellman W, Rousseau P, Celesia GG, Siegel G (2000) Decreased prevalence of alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch Neurol* 57: 1439-1443
- Wood WG, Eckert GP, Igbavboa U, Müller WE (2003) Amyloid beta-peptide interactions with membranes and cholesterol: Causes and causalities of Alzheimer's Disease. *Biochim Biophys Acta* 1610: 281-290
- Wood WG, Rao AM, Igbavboa U, Semotuk M (1993) Cholesterol exchange and lateral cholesterol pools in synaptosomal membranes of pair-fed control and chronic ethanol-treated mice. *Alcohol Clin Exp Res* 17: 345-350
- Wood WG, Schroeder F, Adibhatla RM, Igbavboa U, Avdulov NA (1996) Membranes and ethanol: Lipid domains and lipid protein interactions. In: *Effects of Ethanol on Central Nervous System* (Dietrich R, Erwin VG, eds), Boca Raton, FL: CRC Press, S. 13-27
- Wood WG, Schroeder F, Avdulov NA, Chochina SV, Igbavboa U (1999) Recent advances in brain cholesterol dynamics: transport, domains, and Alzheimer's disease. *Lipids* 34: 225-234
- Wood WG, Schroeder F, Igbavboa U, Avdulov NA, Chochina SV (2002) Brain membrane cholesterol domains, aging and amyloid beta-peptides. *Neurobiol Aging* 23: 685-694

Wood WG, Strong R, Williamson LS, Wise RW (1984) Changes in lipid composition of cortical synaptosomes from different age groups of mice. *Life Sci* 35: 1947-1952

Wood WG, Sun GY, Schroeder F (1989) Membrane properties of dolichol in different age groups of mice. *Chem Phys Lipids* 51: 219-226

Xie C, Burns DK, Turley SD, Dietschy JM (2000) Cholesterol is sequestered in the brains of mice with Niemann-Pick type C disease but turnover is increased. *J Neuropathol Exp Neurol* 59: 1040-1052

Yamada T, Kadokaru H, Matsumoto S, Inada H, Tanabe M, Moriguchi EH, Moriguchi Y, Ishikawa P, Ishikawa AG, Taira K, Yamori Y (2002) Prevalence of dementia in the older Japanese-Brazilian population. *Psychiatry Clin Neurosci* 56: 71-75

Yamada K, Tanaka T, Han D, Senzaki K, Kameyama T, Nabeshima T (1999) Protective effects of idebenone and alpha-tocopherol on beta-amyloid-(1-42)-induced learning and memory deficits in rats: implication of oxidative stress in beta-amyloid-induced neurotoxicity in vivo. *Eur J Neurosci* 11: 83-90

Yamaguchi H, M.L., van Duinen SG, Prins FA, Neeskens P, Natta R, Roos RA (2000) Amyloid beta protein (A β) starts to deposit as plasma membrane-bound form in diffuse plaques of brains from hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis-Dutch type, Alzheimer disease and nondemented aged subjects. *J Neuropathol Exp Neurol* 59: 723 -732

Yamazaki T, Chang TY, Haass C, Ihara Y (2001) Accumulation and aggregation of amyloid beta-protein in late endosomes of Niemann-pick type C cells. *J Biol Chem* 276: 4454-4460

Yanagisawa K (2002) Cholesterol and pathological processes in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 70: 361-366

Yanagisawa K, Matsuzaki K (2002) Cholesterol-Dependent Aggregation of Amyloid beta-Protein. *Ann N Y Acad Sci* 977: 384-386

Yanagisawa K, Odaka A, Suzuki N, Ihara Y (1995) GM1 ganglioside-bound amyloid beta-protein (A β): a possible form of preamyloid in Alzheimer's disease. *Nat Med* 1: 1062-1066

Yang AJ, Chandswangbhuvana D, Shu T, Henschen A, Galbe CC (1999a) Intracellular accumulation of insoluble, newly synthesized A- β 1-42 in amyloid precursor protein - transfected cells that have been treated with A β 1-42. *J Biol Chem* 274: 20650-20656

Yang DS, Small DH, Seydel U, Smith JD, Hallmayer J, Gandy SE, Martins RN (1999b) Apolipoprotein E promotes the binding and uptake of beta-amyloid into Chinese hamster ovary cells in an isoform specific manner. *Neuroscience* 90: 1217-1226

Yao ZX, Brown RC, Teper G, Greeson J, Papadopoulos V (2002) 22R-Hydroxycholesterol protects neuronal cells from beta-amyloid- induced cytotoxicity by binding to beta-amyloid peptide. *J Neurochem* 83: 1110-1119

Yao ZX, Papadopoulos V (2002) Function of beta-amyloid in cholesterol transport: a lead to neurotoxicity. *FASEB J* 16: 1677-1679

- Yasojima K, McGeer EG, McGeer PL (2001) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase mRNA in Alzheimer and control brain. *Neuroreport* 12: 2935-2938
- Yeagle PL (1985) Cholesterol and the cell membrane. *Biochim Biophys Acta*. 822: 267-287
- Yeagle PL (1991) Modulation of membrane function by cholesterol. *Biochimie* 73: 1303-1310
- Yehuda S, Rabinovitz S, Carasso L, Mostofsky I (2002) The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neuronal membrane. *Neurobiol Aging* 23: 843-853
- Yip CM, Elton EA, Darabie AA, Morrison MR, McLaurin J (2001) Cholesterol, a modulator of membrane-associated abeta-fibrillogenesis and neurotoxicity. *J Mol Biol* 311: 723-734
- Yokoyama S (1998) Mechanism of cellular cholesterol removal: a communication system between extracellular cholesterol transport and intracellular cholesterol homeostasis. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 111: 77-85
- Yu BP, Suescun EA, Yang SY (1992) Effect of age-related lipid peroxidation on membrane fluidity and phospholipase A2: modulation by dietary restriction. *Mech Ageing Dev* 65: 17-33
- Yu G, Nishimura M, Arawaka S, Levitan D, Zhang L, Tandon A, Song YQ, Rogaeva E, Chen F, Kawarai T, Supala A et al. (2000) Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing. *Nature* 2000 407: 48-54
- Zajchowski LD, Robbins SM (2002) Lipid rafts and little caves. *Eur J Biochem* 269: 737-752
- Zhang Y, Appelkvist EL, Kristensson K, Dallner G (1996) The lipid compositions of different regions of rat brain during development and aging. *Neurobiol Aging* 17: 869-875
- Zheng H, Xu H, Wang H, Uljon SN, Gross R, Hardy K, Simpkins J, Refolo LM, Petanceska S, Duff K (2002) *J Neurochem* 80: 191-196
- Zhou Y, Richardson JS (1996) Cholesterol protects PC12 cells from beta-amyloid induced calcium disordering and cytotoxicity. *Neuroreport* 7: 2487-2490
- Zubenko GS (1986) Hippocampal membrane alteration in Alzheimer's disease. *Brain Res* 385: 115-121

Publikationen

Teile dieser Dissertation sind vorab veröffentlicht worden.

Originalarbeiten

Kirsch C, Eckert GP, Koudinov AR, Müller WE (2003) Brain cholesterol, statins and Alzheimer's disease. *Pharmacopsychiatry (Suppl)*; in press

Kirsch C, Eckert GP, Müller WE (2003) Statin effects on cholesterol micro-domains in brain plasma membranes. *Biochem Pharmacol* 65: 843-856

Kirsch C, Eckert GP, Müller WE (2002) Cholesterol attenuates the membrane-perturbing properties of beta-amyloid peptides. *Amyloid* 9: 149-159

Eckert GP, Kirsch C, Müller WE (2003) Brain-membrane cholesterol in Alzheimer's disease. *J Nutr Health Aging* 7: 18-23

Eckert GP, Kirsch C, Müller WE (2000) Differential effects of lovastatin treatment on brain cholesterol levels in normal and apoE-deficient mice. *Neuroreport* 12: 883-887

Eckert GP, Kirsch C, Leutz S, Wood WG, Müller WE (2003) Cholesterol modulates A β 's membrane interactions. *Pharmacopsychiatry (Suppl)*; in press

Müller WE, Kirsch C, Eckert GP (2001) Membrane disordering effects of beta-amyloid peptides. *Biochem Soc Trans* 29: 617-623

Übersichtsartikel

Eckert GP, Kirsch C (2002) Cholesterol: Schlecht für das Herz, auch schlecht für den Geist? Neues von einem altbekannten Molekül. *Forschung Frankfurt* 1-2: 62-64

Kongreßbeiträge mit Abstracts

Kirsch C, Eckert GP, Müller WE (2000) Cholesterol modulates the effects of Alzheimer's disease β -amyloid peptide on neuronal membranes. 41st International Conference on the Biochemistry of Lipids, Halle, Germany.

Chem Phys Lipids 2000; 107(1): 47

Eckert GP, Kirsch C, Müller WE (2001) Differential effects of lovastatin treatment on brain cholesterol levels in normal and apoE-deficient mice. 42. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Mainz, Germany.

Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2001; 363 (Suppl 1): R23

Publikationen

Kirsch C, Eckert GP, Müller WE (2001) Effects of lovastatin treatment on brain cholesterol levels in normal and apoE-knock-out mice. 22. Symposium der Arbeitsgemeinschaft für Neuropsychopharmakologie und Pharmakopsychiatrie (AGNP), Nürnberg, Germany.
Pharmacopsychiatry 2001; 34(5): 182

Kirsch C, Eckert GP, Müller WE (2002) Cholesterol diminishes A β 's membrane disturbing properties in brain synaptic plasma membranes of mice. Conference on Cholesterol and Alzheimer's Disease, Frankfurt, Germany.
Neurobiol Lipids 2002; 1(4): 8

Kirsch C, Eckert GP, Müller WE (2002) Statins affect SPM transbilayer cholesterol distribution - new pharmacological insights for the prevention of Alzheimer's disease? Conference on Cholesterol and Alzheimer's Disease, Frankfurt, Germany.
Neurobiol Lipids 2002; 1(4): 8

Leutz S, Kirsch C, Eckert A, Müller WE, Eckert GP (2002) MTT-reduction a valid tool to detect A β -mediated cytotoxicity? Impacts of cholesterol. Conference on Cholesterol and Alzheimer's Disease, Frankfurt, Germany.
Neurobiol Lipids 2002; 1(4): 9

Kirsch C, Eckert GP, Müller WE (2003) Statins induce alterations in SPM transbilayer cholesterol distribution - new pharmacological insights for the prevention of Alzheimer's disease? 44. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Mainz, Germany.
Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2003; 367 (Suppl 1): R7

Lebenslauf

Zur Person

Christopher Kirsch, Apotheker
Familienstand: ledig
Nationalität: Deutsch
Geburtsdatum: 17.03.1975
Geburtsort: Hanau

Promotion

02/00 - 08/03

Doktorarbeit am Pharmakologischen Institut für Naturwissenschaftler der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt unter der Leitung von Herrn Professor Dr. W. E. Müller

Dissertations-Thema: *„Einfluß einer in vitro und in vivo Cholesterol-Modulation in Hirnmembranen auf die zellulären Effekte von Amyloid beta-Peptid.“*

Studium

10/94 - 11/99

Studium der Pharmazie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt, Biozentrum Niederursel
1. Prüfungsabschnitt: 09/96
2. Prüfungsabschnitt: 10/98
3. Prüfungsabschnitt: 11/99
Erteilung der Approbation: 03/00

Praktische Tätigkeiten

10/95, 03/96

1. und 2. Abschnitt der Famulatur in der Sonnen-Apotheke, Erlensee

11/98 - 05/99

Praktische Ausbildung im Dritten Ausbildungsabschnitt der Approbationsordnung für Apotheker bei der ASTA Medica AG, Abteilung Onkologie, Frankfurt am Main

05/99 - 11/99

Praktische Ausbildung im Dritten Ausbildungsabschnitt der Approbationsordnung für Apotheker in der Apotheke und Drogerie Petri, Gelnhausen

Schulischer Werdegang

08/81 - 07/85

Grundschule I, Erlensee

08/85 - 07/87

Förderstufe der Gebrüder Grimm Schule, Hanau

08/87 - 07/94

Hohe Landesschule, Gymnasium in Hanau; Abitur 1994

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde am Pharmakologischen Institut für Naturwissenschaftler der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt in der Zeit von Februar 2000 bis August 2003 angefertigt. Wissenschaftlich betreut und geleitet wurde die Arbeit von Herrn Prof. Dr. W. E. Müller, dem ich für seine Unterstützung und sein reges Interesse an meiner Tätigkeit recht herzlich danken möchte. Die Arbeit wurde durch die Hanna Bragard-Stiftung unterstützt. Die Stifterin, Frau Hanna Bragard, habe ich als sehr interessierte und engagierte Dame kennengelernt, die sich mit ihren Mitteln in großzügiger Weise für die Alzheimer-Forschung einsetzt. Ich möchte mich für Ihre Förderung an dieser Stelle ausdrücklich bedanken.

Herrn Prof. Dr. T. Dinger mann sage ich danke für die freundliche Begutachtung meiner Dissertation.

Ein besonderer Dank gilt meinem direkten Betreuer Gunter, der mir über all die Jahre mit fachlichen Ratschlägen und Erfahrungswerten zur Seite stand, wenn die Labortätigkeit einmal ins Trudeln zu geraten drohte. Das Arbeiten in seinem direkten persönlichen Umfeld hat mir stets viel Freude bereitet und mich für weitere Anstrengungen motiviert. Von ihm habe ich während meiner gesamten Doktorandenzeit die größte fachliche Unterstützung erhalten und in einer sehr freundschaftlichen Atmosphäre viele neue Fähigkeiten erworben.

Bedanken möchte ich mich weiterhin bei Claudi, die in den zurückliegenden drei Jahren sicherlich in meinem Labor kein leichtes Los gezogen hat. Sie hat die Laborwelt erst so richtig bunt gemacht und mit erstaunlicher Gelassenheit meine „chauvinistischen Einlagen“ und „Macho-Sprüche“ ertragen. Ihre Anwesenheit wird mir in Zukunft sicherlich fehlen. Aber eins noch, Claudi: Dich kenn ich doch. Du bist doch der Jeff, der Jango, der Gringo, der Slim.....

Ein Dank geht auch an Frau Bozyk, die sich in aufopferungsvoller Weise und stets mit 100%iger Zuverlässigkeit unseren kleinen Nagern widmet, von denen ich ja doch so einige auf dem Gewissen habe. Ich hoffe, sie wird es mir verzeihen.

Ein großen Dank möchte ich meinem Arbeitskreis aussprechen. Das persönliche Arbeitsklima war bei meiner Entscheidungsfindung für ein Dissertationsthema ein ausschlaggebender

Punkt, und ich habe mich in meinem Empfinden nicht getäuscht. Ich blicke auf eine sehr lustige, lockere, freundschaftliche und vertraute Zusammenarbeit zurück, die mir den Abschied wirklich schwer macht. Jeder einzelne hat seinen Beitrag dazu geleistet. Viel Freude hatte ich auch an den zeitweise auflebenden Doko-Abenden mit Kristina und Co., wobei Kristina fast immer „drunter blieb“.

Vielen Dank sage ich meiner Freundin Heike, die mir unermüdlich neue Denkansätze und Ideen aus ihrer Sicht der Dinge unterbreitet hat, von denen allerdings die wenigsten praktisch durchführbar waren (eigentlich keine). Sie war stets geduldig und einfühlsam und will auch jetzt noch wissen, was ich herausgefunden habe. Darüber muß ich selbst noch einmal nachdenken.

Mein abschließender Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern. Sie haben mich zu jeder Zeit privat und finanziell unterstützt und mir somit überhaupt erst die Möglichkeit zu einer derart reibungslosen Promotion gegeben. Auch haben sie sich mit der Durchsicht meiner Arbeit gequält und noch den einen oder anderen Dreckfuhrer ausgemerzt. Für all das ein großes DANKESCHÖN!