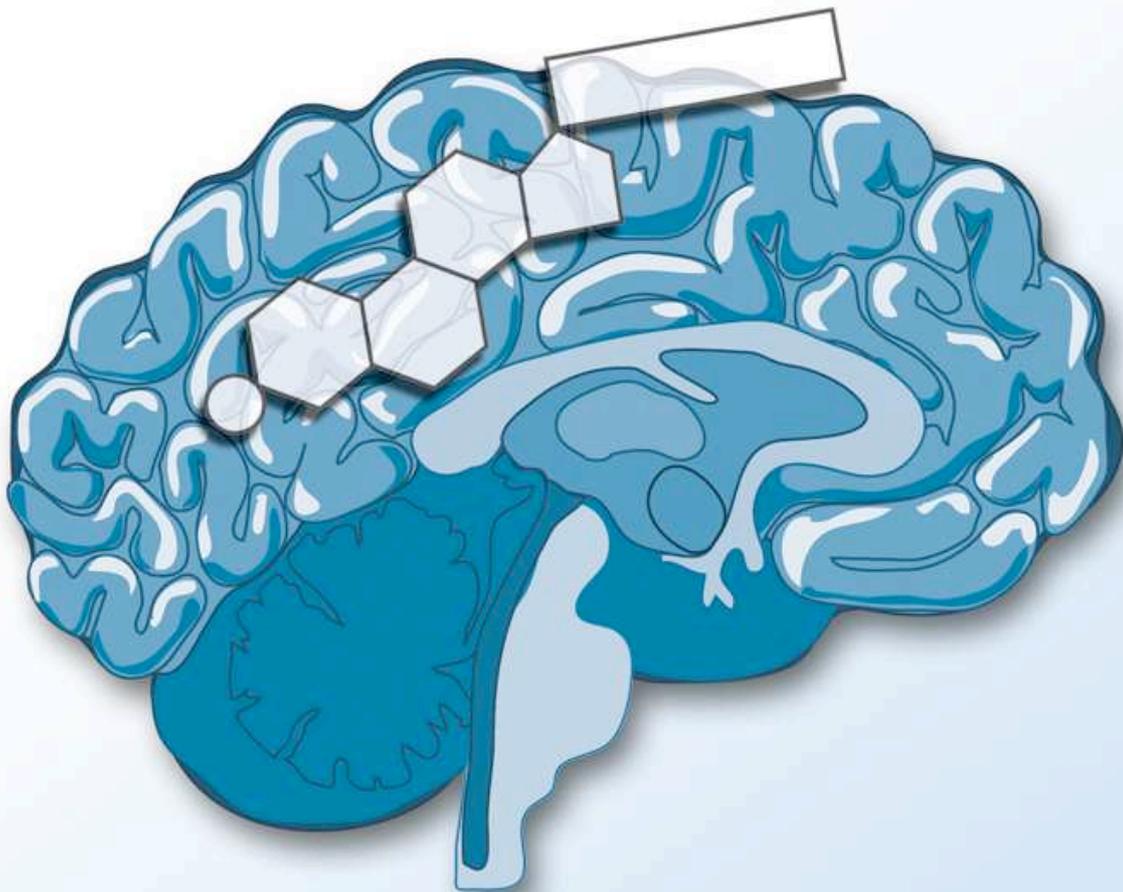


Habilitationsschrift

Untersuchungen zur pharmakologischen Beeinflussung der zentralen Lipidhomöostase durch Statine



von

Dr. phil. nat. Gunter P. Eckert

Goethe-Universität Frankfurt am Main

(Januar 2009)

Untersuchungen zur pharmakologischen Beeinflussung der zentralen Lipidhomöostase durch Statine

Habilitationsschrift

zum Nachweis der Lehrbefähigung im Fach Pharmakologie und Toxikologie

vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Goethe-Universität
Frankfurt am Main

von

Dr. phil. nat. Gunter P. Eckert

Staatl. gepr. Lebensmittelchemiker & Fachpharmakologe DGPT
aus Worms

Frankfurt (2009)

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. VORWORT	1
1.2. ZENTRALE CHOLESTEROLHOMÖOSTASE.....	2
1.2.1. Biosyntheseweg.....	3
1.2.1.2. Isoprenoide.....	5
1.2.2.1 Oxysterole	6
1.2.2. <i>Unterschiede zwischen peripherer und zentraler Cholesterolhomöostase</i>	6
1.2.3. <i>Transport von Cholesterol im Gehirn - Apolipoproteine</i>	7
1.3. CHOLESTEROLVERTEILUNG IN BIOLOGISCHEN MEMBRANEN.....	9
1.3.1 <i>Grundstruktur und physiologische Aufgaben von Zellmembranen</i>	9
1.3.2. <i>Cholesterol Verteilung innerhalb von Lipiddoppelschichten</i>	11
1.3.3 <i>Lipid Rafts und Caveole</i>	12
1.4. ZENTRALE CHOLESTEROLHOMÖOSTASE UND ALTERN	14
1.5. CHOLESTEROL UND PATHOPHYSIOLOGISCHE PROZESSE IM GEHIRN	15
1.5.1. <i>Smith-Lemli-Opitz Syndrom</i>	15
1.5.2. <i>Niemann-Pick Typ C Krankheit</i>	15
1.5.3. <i>Huntington`sche Krankheit</i>	16
1.5.4. <i>Alzheimer Krankheit</i>	16
1.6. STATINE	18
1.6.1. <i>Indikationen</i>	19
1.6.2. <i>Physiko-Chemische Eigenschaften</i>	19
1.6.3. <i>Pharmakokinetik</i>	20
1.6.4. <i>Pharmakologie</i>	20
1.6.4.1. <i>Pharmakodynamik</i>	20
1.6.4.1.1. <i>Wirkungen im zentralen Nervensystem</i>	22
1.6.4.2. <i>Unerwünschte Wirkungen</i>	24
1.6.4.2.1. <i>Interaktionen</i>	25
1.6.4.2.3. <i>Kontraindikationen</i>	26
2. ZIELSETZUNG	26
3. DISKUTIERT E PUBLIKATIONEN.....	27
4. DISKUSSION	29
4.1. UNTERSUCHUNGEN ZUR ZENTRALEN CHOLESTEROLHOMÖOSTASE - EINFLUSS VON STATINEN	33
4.1.1. <i>Effekte von Lovastatin auf den Cholesterolgehalt im Gehirn von normalen und Apo E-defizitären Mäusen</i>	33
4.1.3. <i>Altersabhängig veränderte Protein- und Lipidkomposition von synaptosomalen Lipid rafts der Maus - Einfluss von humanem Apo E</i>	36
4.1.4. <i>Statine beeinflussen Cholesterol-Mikrodomänen in synaptosomalen Plasmamembranen</i>	40
4.1.5. <i>Membranständiges Cholesterol - Kopplung zwischen Mikrodomänen und ABC-Transporteraktivität</i>	44
4.1.6. <i>Regulation der zentralen Cholesterolhomöostase durch den Leber-X-Rezeptor Agonist TO-901317</i>	46
4.1.7. <i>Die Bildung von Beta-Amyloid Protein ist prinzipiell nicht von Cholesterol abhängig</i>	47
4.1.8. <i>Presenilin-1 beeinflusst die physiko-chemischen Eigenschaften von neuronalen Membranen</i>	50
4.1.9. <i>Schlussfolgerung</i>	52
4.2. INTERMEDIÄRPRODUKTE DES MEVALONAT-BIOSYNTHESEWEGES - ISOPRENOIDE	52
4.2.1. <i>Entwicklung und Etablierung einer validierten Methode zur Bestimmung von FPP und GGPP in menschlichem Gehirngewebe</i>	53
4.2.2. <i>Erhöhte FPP und GGPP Gehalte im Gehirngewebe von Alzheimer Patienten</i>	54
4.2.3. <i>Statine senken die zerebralen Gehalte von FPP und GGPP</i>	55

4.2.4. Schlussfolgerung.....	57
4.3. DIE BEEINFLUSSUNG DER APOPTOSE - EIN NEUARTIGER WIRKUNGSMECHANISMUS VON SIMVASTATIN IM GEHIRN.....	57
4.3.1. Bcl-2-Protein - Ein neues Target für Statine im Gehirn	57
4.3.2. Simvastatin induziert die Expression von Bcl-2 und schützt neuronale Zellen in vitro... 59	
4.3.3. Simvastatin vermittelt über Bcl-2 neuroprotektive Wirkungen in vivo	60
4.3.5. Schlussfolgerung.....	61
5. ZUSAMMENFASSUNG	63
6. REFERENZEN	67
7. ANHANG	96
7.1. CURRICULUM VITAE	96
7.2. LITERATURVERZEICHNIS	100
7.2.1. Originalarbeiten	100
7.2.2. Übersichtsarbeiten	103
7.2.3. Buchkapitel.....	105
7.2.3.1. Lehrbuchkapitel.....	105
7.2.4. Popularwissenschaftliche Veröffentlichungen.....	105
7.2.5. Zitationsanalyse.....	106
7.3. VORTRÄGE UND POSTERPRÄSENTATIONEN.....	106
7.3.1. Publierte Abstracts	106
7.3.2. Nicht publizierte Abstracts.....	108
7.3.3. Vorträge	112
7.3.3.1. Vorträge auf Einladung.....	112
7.3.3.2. nicht publizierte Vorträge	114
7.3.4. Patente.....	115
8. DANKSAGUNG.....	116

1. Einleitung

1.1. Vorwort

Poullietier de la Salle entdeckte 1769 eine Substanz in der Galle und in Gallensteinen, die 1815 von M. E. Chevreul identifiziert und als Cholesterol benannt wurde. Er leitete den Namen aus dem Griechischen ab, von Khole für Galle und Stereos für fest. Seit jener Zeit, und speziell in den letzten hundert Jahren, wurden intensive Anstrengungen unternommen, um die Cholesterolregulation und deren physiologische Bedeutung für die zelluläre Funktion zu verstehen. In ihrer Rede im Rahmen der Verleihung des Nobelpreises für die Erforschung der Cholesterolhomöostase im Jahre 1985 beschrieben Michael Brown und Joseph Goldstein die Faszination, die Cholesterol auf Forscher ausübt und kennzeichneten Cholesterol als „janusköpfiges Molekül“. Dieses besitze positive aber auch negative Eigenschaften für die menschliche Gesundheit. Cholesterol hat als Grundbaustein für die Synthese zahlreicher Stoffwechselintermediate, wie Steroidhormone, Gallensäuren oder Cholecalciferol fundamentale Bedeutung für die Physiologie des menschlichen Organismus. Aber auch das Molekül selbst ist an zahlreichen physiologischen Prozessen beteiligt. So stabilisiert Cholesterol biologische Membranen und ist Teil von Membranmikrodomänen, die für an Membranen ablaufenden Signaltransduktionsmechanismen Bedeutung haben. Andererseits ist Cholesterol auch an pathophysiologischen Prozessen beteiligt. Neben Defekten, die im Rahmen der Biosynthese, Speicherung, Verteilung oder dem Metabolismus von Cholesterol auftreten und zu meist genetisch determinierten Krankheiten führen, wie dem Hans-Schüller-Christian- oder dem Smith-Lemli-Opitz-Syndrom, wird ein chronisch erhöhter Serumcholesterolspiegel vor allem mit Herz-Kreislaufkrankungen in Zusammenhang gebracht. Vor diesem Hintergrund wurde die periphere Cholesterolhomöostase in den letzten 50 Jahren intensiv erforscht und brachte Medikamente hervor, mit denen sich erhöhte Serumcholesterolspiegel behandeln lassen. Im Gegensatz dazu ist das heutige Wissen um die Bedeutung von Cholesterol für das zentrale Nervensystem noch sehr begrenzt. Wichtig ist an dieser Stelle anzumerken, dass die periphere und zentrale Cholesterolhomöostase grundsätzlich unabhängig voneinander reguliert sind.

Auch im Gehirn erweist sich Cholesterol als Janus-köpfiges Molekül. Sorgt es auf der einen Seite etwa in Form von Myelin für die Isolierung von Nervenfasern, so stehen neben Hirnalterungsprozessen auch zahlreiche neurologische Krankheiten, wie die Nieman-Pick-Typ C- oder die Huntington Krankheit in Zusammenhang mit Cholesterol. Zu Beginn der wissenschaftlichen Arbeiten zu der vorliegenden Schrift war das Wissen über die pharmakologischen Eingriffsmöglichkeiten in die zentrale Cholesterolhomöostase praktisch nicht existent. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Beitrag zum Füllen dieser Wissenslücke zu leisten – gerade vor dem Hintergrund, dass epidemiologische Untersuchungen eine positive Wirkung von spezifischen Cholesterol-senkenden Medikamenten für die Alzheimer Krankheit nahe legten. Die vorliegende Arbeit fokussiert sich mit Blick auf die Zielsetzung auf die Cholesterolhomöostase und ihre pharmakologische Beeinflussung im zentralen Nervensystem.

1.2. Zentrale Cholesterolemöostase

Im Vergleich mit anderen Organen lassen sich, bezogen auf das Feuchtgewicht, bei den meisten Spezies die höchsten Cholesterolkonzentrationen im Gehirn messen (Dietschy, 2004). Cholesterolem ist ein integraler Bestandteil des Gehirns und trägt zur Stabilität neuronaler Membranen bei. Es ist essentiell für Proteinfunktionen und dient als Prekursor für Steroide. Neben Analogien zu Funktionen außerhalb des Gehirns existieren deutliche Unterschiede in der Dynamik des Sterols im zentralen Nervensystem, welche die besonderen Eigenschaften von Cholesterolem im Gehirn bedingen und die es zu beachten gilt. Diese Unterschiede betreffen unter anderem das Verhältnis von verestertem zu unverestertem Cholesterolem, die Apolipoprotein- und Lipoproteinverteilung oder das Vorkommen von Oxysterolen (Dietschy, 2001).

Etwa 25 % des körpereigenen Cholesterols entfällt auf das Gehirn, in dem es zum größten Teil in Myelin gebunden ist. Daneben findet sich Cholesterolem in den Plasmamembranen von Neuronen und Astrozyten (Dietschy, 1997).

Frühe Arbeiten postulierten, dass die Cholesterolsynthese nur im immaturren Gehirn abläuft (Srere, 1950; Waelsch, 1940). Studien von Kabara und anderen in den 1960 und 1970 Jahren zeigten allerdings, dass Cholesterolem auch im adulten Gehirn synthetisiert wird (Kabara, 1973). Folgeuntersuchungen haben gezeigt, dass die Biosyntheserate von Cholesterolem im Gehirn von Föten und neugeborenen Tieren sehr hoch ist. Im adulten Gehirn ist diese wesentlich schwächer ausgeprägt. Beim Menschen steigt der Cholesterolemgehalt des Gehirns von 6 mg/g bei Geburt auf 23 mg/g beim juvenilen Erwachsenen an (Dietschy, 2004). Der Cholesterolumsatz im Gehirn unterscheidet sich deutlich von anderen Organen. Die Halbwertszeit von zerebralem Cholesterolem adulter Ratten wurde in mehreren Studien mit 2-6 Monate angegeben (Andersson, 1990; Bjorkhem, 1997; Serougne-Gautheron, 1973). Im Gehirn der Maus beträgt der Cholesterolumsatz ca. 0,4% pro Tag, verglichen mit ca. 8% im Rest des Körpers. Im Vergleich mit der Maus fällt der Cholesterolumsatz mit 0,03% am Tag im Gehirn und 0,7% für den gesamten menschlichen Körper wesentlich niedriger aus. Die Halbwertszeit des Sterol-Pools im adulten menschlichen Gehirn wird auf 4,6 Jahre geschätzt (Dietschy, 2004).

Im Gehirn bestehen regionale Unterschiede bezüglich der Cholesterolsyntheserate (Keller et al., 2004), der Expression Cholesterolem-spezifischer Enzyme (Bae, 1999; Runquist, 1995) und des Cholesterolemgehalts (Kennedy, 2004; Quan, 2003) (Zhang, 1996).

Für das Neuritenwachstum von Neuronen (Handelmann, 1992), für die Bildung und Funktion von Synapsen (Goritz, 2005; Mauch, 2001) sowie für die synaptische Plastizität und Neurotransmission (Koudinov, 2005) erweist sich Cholesterolem als essentiell. Die Produktion an Cholesterolem ist in Astrozyten 2-3mal höher als in Neuronen. Neurone scheinen Cholesterolem in ihren Soma oder den proximalen Axonen zu synthetisieren, aber nicht in den distalen Axonen (Vance, 1994). Außerdem exprimieren Neuronen und Astrozyten Lipoprotein-Rezeptoren (Beffert, 1998b).

Es scheint eine besondere Form der Arbeitsteilung zwischen Neuronen und Astrozyten zu bestehen (Nieweg, 2009). Es wurde postuliert, dass Neuronen zunächst im embryonalen Stadium ihren Cholesterolembedarf über Eigensynthese decken. Postnatale Neurone reduzieren allerdings aus energetischen Gründen die in situ Synthese und beziehen dann zusätzlich Cholesterolem von Astrozyten. Cholesterolem-reiche Lipoproteine, die von Astrozyten freigesetzt werden, fungieren dabei als Transporter (Pfrieger, 2003).

Diese Lipoproteine enthalten Apolipoprotein E (Apo E), das die endozytotische Aufnahme der Lipoproteine über den LDL- bzw. den LDL verwandten- Rezeptor in Neuronen vermittelt. Die Synapsen-Bildung von Neuronen hängt von der Cholesterolsynthese der Astrozyten ab, was an retinalen Ganglienzellen der Ratte gezeigt wurde (Mauch, 2001). Neurone sezernieren überschüssiges Cholesterol über ABC-Transporter an Apo AI-haltige Lipoproteine oder bilden über CYP-Enzyme Oxysterole wie 24S-OH-Cholesterol, das ebenfalls sezerniert werden kann (Lutjohann, 1996).

Der größte Teil unseres Wissens über die Eigenschaften von Cholesterol im Gehirn basiert auf Untersuchungen zum Gesamtgehalt des Sterols im Gewebe. Es wird aber immer deutlicher, dass nicht die Gesamtmenge an Cholesterol, sondern seine Verteilung in diskreten Domänen entscheidende Bedeutung für seine zellulären Funktionen hat. Wie in der Peripherie kann es auch im Gehirn zu Dysregulation der Cholesterolhomöostase kommen, die sich in Fehlfunktionssyndromen, angeborenen Defekten oder Krankheiten wie der Niemann-Pick Typ C Krankheit manifestiert (Porter, 2002; Vance, 2005). Weiterhin deuten Evidenzen auf eine Rolle von Cholesterol bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Chorea Huntington oder Alzheimer Demenz und bei Gehirnalterungsprozessen hin (Burns, 2002; Valenza, 2006; Wood, 2002).

Die folgenden Betrachtungen zur zentralen Cholesterolhomöostase beleuchten die Rolle von Cholesterol im Gehirn, vergleichen die Dynamik von zentralem und peripherem Cholesterol, beschreiben Cholesterol-Domänen und stellen den Beitrag von Cholesterol zu pathophysiologischen Prozessen im Gehirn dar. Weiterhin wird den Cholesterolmetaboliten, den Oxysterole sowie Intermediärprodukten des Mevalonat-Stoffwechsels, speziell den Isoprenoiden, Aufmerksamkeit geschenkt.

1.2.1. Biosyntheseweg

Die Biosynthese von Cholesterol erfolgt über viele Zwischenstufen aus der aktivierten Essigsäure, dem Acetyl-Coenzym A. Acetyl-CoA und Acetoacetyl-CoA werden durch das Enzym HMG-CoA Synthase zu 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) umgewandelt, das dann mit Hilfe der HMG-CoA Reduktase und dem Ko-Faktor NADPH zu Mevalonat reduziert wird. Diese Reaktion stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Cholesterolbiosynthese dar (Abb. 1.1.). Über eine Reihe von Schritten wird Mevalonat zu Isopentylpyrophosphat (IPP), Geranylpyrophosphat (GPP) und weiter zu Farnesylpyrophosphat (FPP) konvertiert (Brown, 1973).

Letzteres ist nicht nur ein Prekursor für Cholesterol, sondern auch für Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP). An dieser Stelle spaltet sich der Isoprenoidseitenweg des Mevalonat-Biosynthesepfads ab. FPP und GGPP haben entscheidende Funktionen bei der Prenylierung von kleinen GTP-bindenden Proteinen, wie Rho, Rac und Ras. Die Prenylierung verleiht diesen Proteinen die Fähigkeit, sich in biologischen Membranen zu verankern. FPP ist ebenfalls ein Prekursor für Ubichinon, Dolichol und Squalen (Dietschy, 1983).

Die Umwandlung von Squalen in vielen weiteren Schritten führt letztlich zur Bildung von Cholesterol.

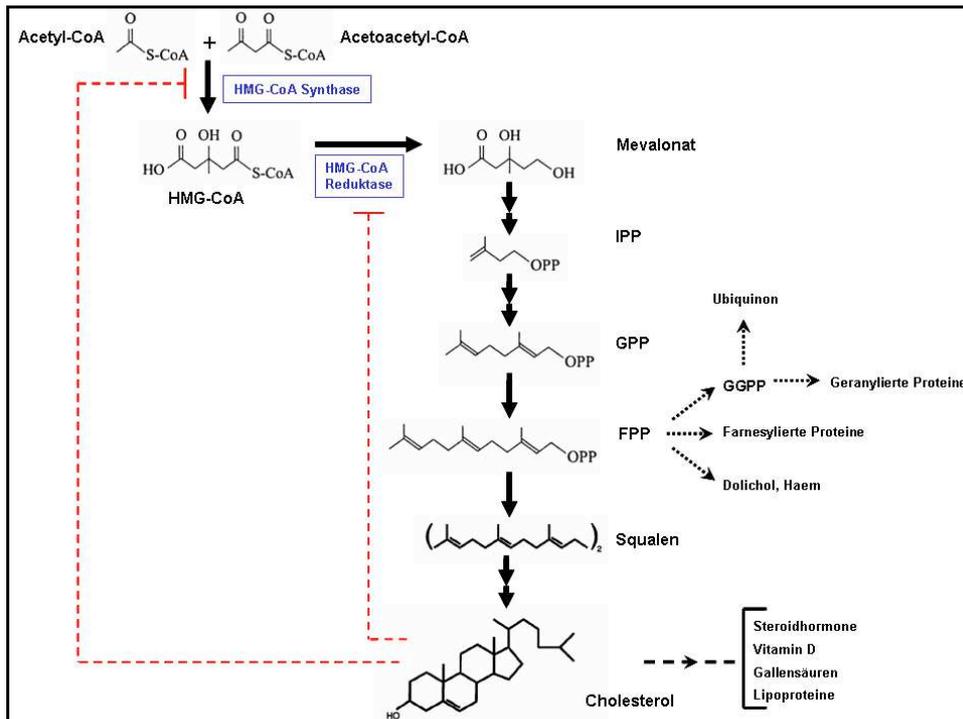


Abb. 1.1. Die Biosynthese von Cholesterin. Ausgehend von aktivierter Essigsäure entsteht in einer durch die HMG-CoA Synthase katalysierten Reaktion 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA (HMG-CoA). Diese wird mit Hilfe der HMG-CoA Reduktase zu Mevalonat umgewandelt. Über Isopentenyl- (IPP) und Geranylpyrophosphat (GPP) entsteht zunächst Farnesylpyrophosphat (FPP). FPP ist zu einem Precursor für Squalen, aus dem in vielen weiteren Schritten Cholesterin synthetisiert wird. Zum anderen wird aus FPP Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) synthetisiert. Die Isoprenoide FPP und GGPP dienen als lipophile Reste, mit denen kleine G-Proteine wie Ras-, Rho-, oder Rac-Proteine in zelluläre Membranen verankert werden. Aus FPP entstehen aber auch andere Biomoleküle wie Dolichol. Cholesterin dient unter anderem als Vorläuferverbindung für die Synthese von Gallensäuren, Vitamin D oder Steroidhormonen und limitiert seine eigene Synthese über einen negativen Rückkopplungsmechanismus auf HMG-CoA Synthase und -Reduktase. Modifiziert nach (Duncan, 2005).

Ausgehend von einer Cytochrom-P450- induzierten Produktion von Pregnenolon kann Cholesterin selbst in Neurosteroiden umgewandelt werden (Tsutsui, 2003). Cholesterin wird im zentralen Nervensystem unter anderem durch das Enzym Cholesterin-24-Hydroxylase zu 24S-Hydroxycholesterin metabolisiert (Bjorkhem, 1998).

Das Gleichgewicht zwischen Cholesterinbedarf und in situ Synthese wird über vielfältige Mechanismen reguliert. Als wichtig kann dabei die Hemmung der HMG-CoA-Synthase und -Reduktase durch Cholesterin und Lanosterin, einer Vorstufe von Cholesterin, gelten. Somit wird die Cholesterinsynthese über eine negative Rückkopplung gesteuert. Es gibt noch viele andere, weniger direkte Regulationsmechanismen, die auf transkriptioneller Ebene ablaufen. Hier sind die Proteine SCAP (sterol regulatory element-binding protein-cleavage activating protein), Insig-1 und -2 wichtig, die in Anwesenheit von Cholesterin, für welches sie eine Bindungsstelle besitzen, über die proteolytische Aktivierung von SREBPs (sterol regulatory element-binding Proteins) die Aktivität einer größeren Anzahl Gene regulieren (Brown, 1980; Matsuda, 2001).

1.2.1.2. Isoprenoide

Der Biosyntheseweg von Cholesterol beinhaltet eine Familie von Molekülen, die wichtige physiologische Funktionen besitzen (siehe Abbildung 1.1.). Zu dieser Familie gehören Ubichinon (Coenzym Q), Vitamin D, Dolichol, Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) und Farnesylpyrophosphat (FPP). In diesem Abschnitt soll der Blick auf GGPP, FPP und Dolichol gerichtet werden. Es besteht wachsendes Interesse an der Bedeutung der Isoprenoide an zellulären Funktionen. Die aus Mevalonat entstehenden Verbindungen FPP und GGPP sind essentiell für die Prenylierung von GTP-bindenden Proteine wie Ras, Rac und Rho (Holstein, 2004). Die Prenylierung versieht die Proteine mit einem lipophilen Anker, der der Anheftung an Membranen dient. Größtes Interesse rufen diese Isoprenoide im Zusammenhang mit der Wirkung der HMG-CoA Reduktase Inhibitoren, den Statinen, hervor. Es wird vermutet, dass die Statine neben ihren Cholesterol-reduzierenden Effekten auch die zellulären Isoprenoid-Gehalte senken (McFarlane, 2002). In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass Atorvastatin die GGPP-abhängige Prenylierung von Rac-1-Protein hemmt, was zu anti-apoptischen Effekten in Muskelzellen führte (Wassmann, 2001). Die Induktion von Apoptose durch Membran-gebundenes Rac-1 scheint über einen NADPH-Oxidase-abhängigen Mechanismus vermittelt zu werden (Chung, 2003). Die Inhibition der Geranylgeranylierung von Rac-1 durch Atorvastatin reduziert die Anzahl der Membran-gebundenen Rac-1 Moleküle und vermindert dadurch die Angiotensin II vermittelte Produktion von freien Radikalen in Muskelzellen (Wassmann, 2001).

Isoprenoide scheinen auch eine wichtige Rolle für die zellulären Funktionen im zentralen Nervensystem zu spielen. Dabei wurde der Frage nach den Gehalten dieser Moleküle im Gehirn sowohl unter normalen Bedingungen als auch nach pharmakologischer Manipulation bisher kaum Beachtung geschenkt. Für das Endprodukt des Mevalonat-Stoffwechsels, Cholesterol, konnten eigene Untersuchungen zeigen, dass sich die Gehalte mit dem Alter der Tiere ändern und dass Statine die Gehirnspiegel des Sterols senken (Eckert, 2001b) (Eckert, 2001a). Falls die pharmakologische Intervention mit Statinen auch die Isoprenoid-Gehalte im Gehirn beeinflussen sollte, stellt sich die Frage, in welcher Größenordnung sich die Basalspiegel bewegen und inwieweit sich diese beeinflussen lassen. Weiterhin ist die Quantifizierung von Basalgehalten an Isoprenoiden auch in Zellkulturen notwendig, da die zur Erforschung von Cholesterol-unabhängigen Effekten in vitro eingesetzten Isoprenoidkonzentrationen möglicherweise weit über den natürlich vorkommenden Gehalten liegen. Fibroblasten weisen pikomolaren Isoprenoidgehalte auf (Tong, 2005), die in in vitro Studien extern zugesetzte Isoprenoidmenge liegt allerdings oft im mikromolaren Bereich.

Isoprenoidmoleküle, deren Gehirngehalte gut dokumentiert wurden sind Dolichole (Andersson, 1990; Pullarkat, 1982; Wood, 1989b). Dolichole sind langkettiges Polyprenole, die sich von FPP ableitet. Sie finden sich ubiquitär im menschlichen Körper mit den höchsten Konzentrationen in den Hoden, den Nieren, dem Gehirn und zahlreichen exokrinen Drüsen (Rip, 1985). Dolichole kommen in freier Form oder phosphoryliert vor. Phosphorylierte Dolichole stellen Intermediärprodukte für die Synthese von Oligosaccharidgruppen von Glykoproteinen dar. Die zelluläre Funktion von freiem Dolichol ist dagegen noch unklar. Dolichol erhöht die Fluidität von synaptosomalen Plasmamembranen (SPM) (Wood, 1986). Gleichzeitig steigen die Gehalte an Dolichol im humanen Gehirngewebe altersbedingt deutlich an (Andersson, 1990; Pullarkat, 1982). Auch in SPM, die aus dem Gehirn von alten C57/BJ6 Mäusen (18

bzw. 24 Monate alt) isoliert wurden, zeigten sich zwischen fünf- und elffach erhöhte Dolicholwerte, im Vergleich zu jungen, sechs Monate alten Mäusen (Wood, 1989b). In der gleichen Studie wurde gefunden, dass Dolichol einen größeren Effekt auf die Fluidität von SPM aus dem Gehirn junger Mäuse aufweist. Erhöhte Dolicholgehalte wurden auch in Gehirnproben von Alzheimer Patienten oder von Patienten die an Lipofuchsinose litten detektiert (Ng Ying Kin, 1983; Wolfe, 1982). Ob erhöhte Dolicholgehalte die Zellfunktion beeinträchtigen, oder eine physiologische Reaktion auf Alterungs- oder neurodegenerative Prozesse darstellen, ist nicht bekannt.

1.2.2.1 Oxysterole

Oxysterole sind oxidierte Derivate des Cholesterols, die am Cholesterolmetabolismus, der Apoptose oder inflammatorischen Prozessen beteiligt sind (Bjorkhem, 1998). Ein Metabolit des Cholesterols, der vermehrt im Gehirn vorkommt ist das Oxysterol 24-Hydroxycholesterol (24-OH-Chol) (Lutjohann, 1996). Es existieren Evidenzen, dass Cholesterol über diesen Metaboliten aus dem Zentralnervensystem in das periphere System geschleust wird. Das für die Metabolisierung von Cholesterol zu 24-OH-Chol zuständige Enzym ist die Cholesterol-24-Hydroxylase (CYP46A1) (Lund, 1999). CYP46A1 wurde als Risikofaktor für die Alzheimer Krankheit identifiziert (Papassotiropoulos, 2005), allerdings existieren auch widersprüchliche Daten (Ingelsson, 2004). Die Bedeutung von CYP46A1 im Gehirn ist auch deshalb unklar, weil seine transkriptionelle Regulierung weitgehend unabhängig von Veränderungen der Cholesterolhomöostase erfolgt (Ohyama, 2005). Interessanterweise sind die Oxysterole 25- und 27-Hydroxy-Cholesterol potente Repressoren der SREBP-Prozessierung und Aktivatoren der Cholesterol-Veresterung. Des Weiteren sind einige Oxysterole Agonisten des nukleären Leber X Rezeptors, der transkriptionell in die Cholesterolhomöostase eingebunden ist (Abildayeva, 2006; Cao, 2007).

1.2.2. Unterschiede zwischen peripherer und zentraler Cholesterolhomöostase

Es existieren deutliche Unterschiede in der Cholesterolhomöostase innerhalb und außerhalb des Gehirns. Bemerkenswert sind unter anderem Unterschiede im Verhältnis von verestertem zu unverestertem Cholesterol, in der Verteilung von Apolipoproteinen und Lipoproteinen und der Produktion von 24-Hydroxycholesterol. In der LDL-Fraktion des Plasmas liegt Cholesterol zu ungefähr 70% verestert vor. In der Literatur herrscht weitgehender Konsensus darüber, dass im Gehirn, mit Ausnahme des Myelins, kaum verestertes Cholesterol vorkommt (Dietschy, 2001; Kabara, 1973; Ramsey, 1972). Allerdings wurden erhöhte Cholesterolstergehalte während der frühen Gehirnentwicklung, bei Krankheiten, die mit einer Demyelinisierung einhergehen und bei neuroepithelialen Gehirntumoren gefunden (Kabara, 1973; Quarles, 1989; Tosi, 2003). Die wissenschaftliche Grundlage für die erhöhten Gehalte an Cholesterolestern unter den genannten Bedingungen ist unklar. Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) verhindert als Endothel-Barriere eine Aufnahme von peripherem Cholesterol ins Gehirn. In Patienten, die an bestimmten astrozytären Tumoren leiden, wurde eine Übertritt von Cholesterolestern aus dem Plasma über die BHS festgestellt (Crisby, 2004). Allerdings deuten Daten darauf hin, dass bei der Gehirnreifung Cholesterol ausschließlich aus *in situ* Synthese stammt. Es gibt bis dato keine Beweise für einen Cholesterol-Transport vom Blut in das Gehirn oder in das Rückenmark (Dietschy, 2004). Bei der Betrachtung des Cholesterolstoffwechsels im Gehirn stellt sich die Frage, ob sich zwischen Gehirn und Plasma ein Gleichgewicht einstellt. Hirn-Endothelzellen besitzen zwar die Fähigkeit über den LDL-Rezeptor LDL-Cholesterol aufzunehmen, aber unter normalen

Bedingungen scheint diese Transportmöglichkeit keine Bedeutung zu haben (Dehouck, 1997). Daher geht man allgemein davon aus, dass das Gehirn seinen Cholesterolbedarf ausschließlich durch in-situ Synthese deckt (Jurevics, 1995). Allerdings wurde gefunden, dass Veränderungen der peripheren 27-OH-Cholesterolspiegel zu Genexpressionsvariationen im Gehirn führt (Mateos, 2008). Dies würde ein funktionelles Korrelat zu Beobachtungen darstellen, dass 24S-Hydroxy-Cholesterol (24S-OH-Cholesterol) und 27S-Hydroxy-Cholesterol (27-OH-Cholesterol) in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. 24S-OH-Cholesterol wird ausschließlich im Gehirn synthetisiert (Papassotiropoulos, 2000). 27S-OH-Cholesterol hingegen stammt vorwiegend aus peripheren Geweben (Heverin, 2005), so dass es im Plasma in höheren Konzentrationen nachweisbar ist als im Gehirn (Lutjohann, 1996). Allerdings liegen die Gehalte an Oxysterolen im Plasma und Gehirn im nanomolaren Bereich und damit sehr weit unter denen von Cholesterol (Wood, 2005). Die Verschiebung des Verhältnisses 24S-OH-Cholesterol zu 27S-OH-Cholesterol im Plasma wird daher als Indiz für Defekte der Blut-Hirn-Schranke angesehen (Leoni, 2003). Auch in einem kürzlich erschienenen Übersichtsartikel wird vorgeschlagen, dass Cholesterol möglicherweise die Bluthirnschranke überschreitet (Vance, 2005). Diese Schlussfolgerung basierte auf Veränderungen des Alzheimer-relevanten APP-Metabolismus im Gehirn eines murinen Krankheitsmodells. Allerdings waren die Variationen der Cholesterolspiegel im Gehirn der Tiere nach einer Cholesterol-reichen Diät minimal.

In einer weiteren Studie wurden apoE-null Mäuse neun Monate lang mit einer Cholesterol-reichen Diät gefüttert. Den apoE-null Mäusen fehlt das Gen, das für Apolipoprotein E (Apo E) kodiert, welches eine wichtige Rolle für den Cholesteroltransport im Plasma und im Gehirn spielt. Das Fehlen von Apo E resultiert in extrem hohen Cholesterol-Plasmawerten. Die Cholesterolfütterung über neun Monate führte zu einer Aktivierung von Gliazellen und zu einer Erhöhung der Gehalte an antioxidativer NADPH/Chinon-Oxidoreduktase im Gehirn der apoE-null Mäuse (Crisby, 2004). Allerdings versäumten die Autoren Gehirn-Cholesterolgehalte anzugeben. Somit ändert zwar die hochdosierte Cholesteroldiät die Neurochemie in den untersuchten Gehirnen, der Rückschluss auf eine veränderte Cholesterolhomöostase im Gehirn ist in dieser Studie allerdings nicht gesichert. Eigene Daten zeigen, dass sich kein Gleichgewicht zwischen peripherem und zentralem Cholesterol einstellt: Obgleich apoE-null Mäuse sechsfach erhöhte Plasma-Cholesterol Spiegel im Vergleich zu Kontrolltieren aufweisen, waren die Gehirn-Cholesterinspiegel nicht verändert (Eckert, 2001a). Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit einer früheren Veröffentlichung (Igbavboa, 1997). Eine Arbeit berichtet, dass die Fütterung von Meerschweinchen mit einer hohen Dosis an Cholesterol zwar die Serum-Cholesterolwerte um das zweifache erhöht, die Cholesterolgehalte im Gehirn aber nicht beeinflusst (Lutjohann, 2004). Weitere Argumente gegen die These, dass peripheres Cholesterol über die BHS in das Gehirn gelangt, wurden kürzlich in einer Übersichtsarbeit zusammengefasst (Dietschy, 2004). Somit beeinflussen erhöhte Plasma-Cholesterolwerte oder das Fehlen von Apolipoprotein E nicht das Vorkommen von Cholesterol im Gehirn. Allerdings scheinen Diäten mit hohem Cholesterolgehalten die Neurochemie des Gehirns zu beeinflussen, jedoch ohne die Gehalte an Cholesterol in diesem Kompartiment zu verändern. Ein Mechanismus, der dies erklären könnte, ist nicht bekannt.

1.2.3. Transport von Cholesterol im Gehirn - Apolipoproteine

Apolipoproteine wie Apo A-I, Apo A-II, Apo B oder Apo E komplexieren mit Cholesterol, Cholesterolestern, Phospholipiden und Triglyceriden und bilden so Lipoproteine. Diese

sind im Wesentlichen für den systemischen Transport von Cholesterol verantwortlich. Im Gehirn unterscheidet sich die Zusammensetzung der Apolipoproteinen und der Lipoproteine im Vergleich zur Peripherie. Apolipoproteine, die im humanen Gehirn identifiziert wurden, sind Apo A-I, Apo A-IV, Apo D, Apo E und Apo J (Harr, 1996). Apo B, Apo A-II und Apo C-II wurden nicht im Gehirn gefunden. Apo B wurden auch nicht in der Cerebrospinalflüssigkeit nachgewiesen (Pitas, 1987; Roheim, 1979). Die Abwesenheit von Apo B ist deshalb interessant, weil es die Hauptproteinkomponente in LDL darstellt und deshalb rückgeschlossen wurde, dass im Gehirn kein Apo B enthaltendes LDL vorkommt. Es wurde weiterhin berichtet, dass sich die Lipoproteinfraktionen in der Cerebrospinalflüssigkeit deutlich von denen des Plasmas unterscheiden. Cerebrospinale Lipoproteine enthalten im Vergleich zur Plasmafraktion weniger Cholesterol und Phospholipide (Koch, 2001).

Apo E und Apo J stellen die Hauptapolipoproteine des Gehirns dar (Boyles, 1989; Pitas, 1987; Xu, 2000). Im Fall von Apo E herrscht in der Wissenschaft starkes Interesse an seiner Funktion im ZNS, vor allem was seine Rolle in der Pathogenese der Alzheimer Demenz betrifft. Forschungsergebnisse hierzu wurden kürzlich zusammengefasst (Poirier, 2005). Apo E ist ein 34 kDa schweres Protein, welches als Ligand an Rezeptoren der LDL-Familie bindet (Fagan, 2000; Mahley, 1988). Es wurde gezeigt, dass Astrozyten die primäre Cholesterolquelle im Gehirn darstellen und dass dieses mit Hilfe von Apo E transportiert wird (Mauch, 2001). Das von Astrozyten gelieferte Cholesterol ist notwendig für die Bildung von Synapsen im Gehirn (Mauch, 2001). So induzieren Apo E und Cholesterol reiche Partikel von Astrozyten das axonale Wachstum in retinalen Ganglienzellen (Hayashi, 2004). Hierbei stellen distale Axone und nicht die Zellkörper die Zielstrukturen für die Apo E-haltigen Partikel dar. Astrozyten stellen Neuronen auch ungesättigte Fettsäuren zur Verfügung (Moore, 1991). In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass sich die Fettsäurezusammensetzung der Phospholipide von neuronalen Membranen aus apo E-null Mäusen deutlich vom Wildtyp unterscheidet (Igbavboa, 2002). Apo E scheint auch ein wichtiger Faktor für die Aufrechterhaltung der neuronalen Funktionen während Alterungsprozessen und nach Gehirnschädigung zu sein. Unterstützt wird diese These durch Befunde, dass apo E-null Mäuse im Vergleich zu Wildtyptieren weniger Nervenenden aufweisen und dass mit fortschreitendem Alter der gentechnisch veränderten Tiere ein verstärkter Verlust an Nervenenden zu beobachten ist (Masliah, 1995). Nach Läsionen des Hippokampus lässt sich eine erhöhte apo E Expression und eine verstärkte Bindung von fluoreszenz-markiertem LDL an hippokampalen Schnitten nachweisen (Poirier, 1993). Diese Studie kam zu dem Schluss, dass sowohl LDL Rezeptoren als auch Apo E für die Wiederverwertung von neuronalem Cholesterol zur Membranbiosynthese notwendig sind.

Apo E kommt beim Menschen in den drei Isoformen E2, E3 und E4 vor, die sich in ihrer Aminosäurekomposition an Position 112 und 158 unterscheiden (Rall, 1982; Weisgraber, 1981). Apo E2 besitzt an beiden Positionen einen Cystein-Rest, Apo E3 an Position 112 einen Cystein-Rest und an Position 158 einen Arginin-Rest, Apo E4 besitzt an beiden Positionen Arginin-Reste. Die Expression dieser Isoformen geht mit spezifischen Unterschieden in der Freisetzung von Lipiden von Astrozyten, im Neuritenwachstum von Neuronen, in der Plastizität, in oxidativen Insulten, in der Asymmetrie von Cholesterol in neuronalen Membranen und in der Interaktion mit Alzheimer-relevantem A β -Protein einher (Fagan, 2000; Wood, 2003). Es wurde gezeigt, dass Apo E4 im Gegensatz zu Apo E3 das Neuritenwachstum von Neuronen der Maus inhibiert (Nathan, 2002). Ähnliche Befunde wurden auch an hippokampalen Schnitten von Mäusen, die humanes apo E4 oder apo E3 exprimieren erhoben (Teter, 2002). Die

über das LRP (low-density lipoprotein receptor-related protein) von Neuronen aufgenommen Apo E-Isoformen unterscheiden sich in ihrer neuronalen Verteilung (DeKroon, 2001). Im Gegensatz zu Apo E4 zeigt Apo E3 nur eine geringe Lokalisation im späten Endosom, was möglicherweise die Cholesterolverteilung innerhalb des Neurons beeinflusst. So setzten murine Astrozyten, die das menschliche Apo E3 exprimieren mehr Cholesterol frei als entsprechende Apo E4 exprimierende Zellen (Gong, 2002). Allerdings berichtet eine andere Studie, dass sich Lipoproteine, die von Astrozyten aus Apo E3 und Apo E4 Mäusen sezerniert wurden, nicht in ihrer Lipidzusammensetzung oder der freigesetzten Menge an Apo E unterscheiden (Fagan, 1999). Astrozyten, die aus Mäusen gewonnen wurden, welche Apo E3 exprimieren induzierten im Vergleich zu Astrozyten aus Apo E4 Mäusen ein stärkeres Neuritenwachstum (Sun, 1998). Mäuse die Apo E4 bilden zeigten nach einer entorhinalen Läsion des Kortex eine geringere Immunfärbung für Synaptophysin, was auf eine geringere Regenerationsfähigkeit hindeutet (White, 2001). Cholesterol bindet Synaptophysin (Thiele, 2000) und es wurde berichtet, dass die Interaktion mit dem Synaptophysin/Synaptobrevin Komplex Cholesterol-abhängig ist. Hierbei stammt das Cholesterol von Astrozyten (Mauch, 2001; Mitter, 2003).

Die Verteilung von Cholesterol zwischen den Blättern der synaptosomalen Plasmamembranen (SPM) unterscheidet sich signifikant bei Mäusen, die das humane Apo E4 bilden (Hayashi, 2002). Im Vergleich zu Apo E3 exprimierenden Tieren, ist eine Verdopplung des Cholesterolgehaltes im exofazialen Blatt von SPM aus Apo E4 Tieren festzustellen. Dieser Unterschied entspricht der in alten versus jungen Apo E-null Mäusen gefundenen Differenz (Igbavboa, 1997; Igbavboa, 1996). Die Modifikation der Transbilayer Verteilung von Cholesterol kann die Aktivität von membrangebundenen Proteinen, den Cholesteroltransport und die Fluidität der Membranblätter verändern, was letztlich in zellulärer Dysfunktion resultieren kann. Das Vorhandensein des Apo E4 Allels stellt einen Risikofaktor für die Alzheimer Demenz dar (Saunders, 1993). Weitere Befunde stellen Apo E in einen Kontext mit der Alzheimer Demenz: Es wurde gezeigt, dass Apo E abhängig von seiner Isoform die zytotoxischen Eigenschaften von Alzheimer-relevantem A β -Proteinen in der Reihenfolge E2>E3>E4 abzuschwächen vermag (Ma, 1996a; Miyata, 1996; Titov, 1997). Dazu passend wurde gezeigt, dass im Gegensatz zu Apo E4, Apo E3 Zellen vor A β -Toxizität schützt (Subramaniam, 1998). Apo E4 stimuliert die Produktion von A β in Neuroblastomazellen der Ratte, die mit humanem APP696 transfiziert waren (Ye, 2005). Bei Mäusen, die humanes APP und Apo E3 exprimierten, treten synaptische Defizite später auf als bei Mäusen, die APP und Apo E4 bilden (Buttini, 2002).

1.3. Cholesterolverteilung in biologischen Membranen

1.3.1 Grundstruktur und physiologische Aufgaben von Zellmembranen

Biologische Membranen bestehen aus einer Lipiddoppelschicht, wobei zwei hydrophile (polare) Oberflächenschichten eine hydrophobe (unpolare) Mittelschicht einbetten. Die Membranbestandteile haben die Aufgabe, diese grundlegende Struktur zu formen und aufrecht zu erhalten. Die Grundeinheit ist 5-8 nm dick und besteht aus drei Hauptkomponenten: Lipide, Proteine und Kohlenhydrate (Graham, 1998). Für die Grundstruktur von Membranen sind im Wesentlichen die Phospholipide verantwortlich. Die Membranphospholipide besitzen einen charakteristischen Aufbau: Die drei alkoholischen Gruppen eines Glycerol-Moleküls sind jeweils mit zwei Fettsäureresten und mit einem Phosphatrest verestert. Über eine anorganische Esterbrücke sind

verschiedene Karbonylhydrate wie etwa Cholin oder Serin mit dem Phosphatrest verknüpft. Membranphospholipide sind somit amphiphile Moleküle, die über einen hydrophoben und einen hydrophilen Anteil verfügen. Die wichtigsten Membranlipide sind Phosphoglyceride, Sphingomyeline, Glykolipide und das zu den unverseifbaren Fettbestandteilen gehörende Cholesterol. Die Membranlipide richten sich von selbst so aus, dass sich jeweils die hydrophoben Molekülanteile gegenüberstehen. Für die Bildung der Lipiddoppelschicht sind somit vor allem hydrophobe Kräfte verantwortlich. Die Lipiddoppelschicht erfüllt zwei Aufgaben: Sie dient zum einen als Raum für integrale Membranproteine und zum anderen als Permeabilitätsbarriere. Membranassoziierte Proteine erfüllen zahlreiche physiologische Aufgaben. So bilden transmembranäre Proteine Ionenkanäle und Rezeptoren. In Einzelschichten eingelagerte Proteine fungieren als Enzyme. Somit spielen Membranen eine wichtige Rolle für den Zellstoffwechsel und die Signaltransduktion. Ein Teil der Membranlipide steht in spezifischer Wechselwirkung mit bestimmten Membranproteinen und ist möglicherweise für deren Funktion unerlässlich (Lenaz, 1994).

Nach dem Fluid-Mosaik-Modell können Membranproteine lateral in der Lipidmatrix diffundieren (de Laat, 1980; Singer, 1972). Der Grad dieser Diffusion ist abhängig von der Fluidität der Membran. Der fluide Zustand von Lipiddoppelschichten wird durch den Anteil an ungesättigten Fettsäuren und dem Cholesterolgehalt bestimmt. Daher erhöhen ungesättigte Fettsäuren die Fluidität, während das starre, hydrophobe Cholesterol die Fluidität der Membran erniedrigt (Lenaz, 1983). In jüngerer Zeit wurde dieses Membranmodell modifiziert und um spezifische Kluster innerhalb der Membran ergänzt. Man geht heute davon aus, dass sich in der Membran Mikrodomänen bilden, die eine wichtige Rolle für Protein-Lipid-Interaktionen besitzen (Vereb, 2003).

Membranlipide sind aktiv am Prozess der Signaltransduktion und an Proteinfunktionen beteiligt. Veränderungen der Membranlipidkomposition können zu entsprechenden Störungen führen. Eukaryontische Zellen weisen eine enorme Diversität der Lipidzusammensetzung auf. Die Lipidzusammensetzung der einzelnen Zelle ist auf mehreren Ebenen organisiert und ist für einen Zelltyp einheitlich. Organe und Gewebe, wie auch die vielfältigen subzellulären Membranen eukaryontischer Zellen, besitzen charakteristische Lipidzusammensetzungen. So lässt sich in Zellen ein Cholesterol- und Sphingomyelin-Gradient nachweisen: Die höchsten Konzentrationen findet man in der Plasmamembran, während die beiden Lipide in Kern- und Mitochondrienmembranen kaum vorkommen. Cardiolipin scheint ausschließlich in Mitochondrienmembranen vorzukommen. Phosphatidylethanolamin kommt ebenfalls hoch angereichert in diesen Membranen vor (Graham, 1998). Einen weiteren Organisationsgrad stellt die asymmetrische Verteilung der Lipide zwischen den beiden Membranschichten dar. Die äußere Membranschicht von Plasmamembranen ist reich an Cholin- und arm an Amino-Phospholipiden. Diese finden sich in deutlich höherer Konzentration in der zytosolischen Seite der Membrandoppelschicht. So befinden sich Sphingomyelin und Phosphatidylcholin vorwiegend in der äußeren, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin in der inneren, dem Zytosol zugewandten Seite. Glykolipide sind ausschließlich auf der extrazellulären Membranseite lokalisiert (Graham, 1998). Der unterschiedlichen Verteilung von Cholesterol innerhalb der Membrandoppelschicht widmet sich der nächste Abschnitt. Die Asymmetrie der Membrandoppelschicht scheint für die biologische Funktion von Membranen wesentlich zu sein.

1.3.2. Cholesterol Verteilung innerhalb von Lipiddoppelschichten

In biologischen Membranen ist Cholesterol nicht homogen verteilt, sondern befindet sich in diskreten Domänen. Zwei wichtige Domänen stellen das exofaziale und das zytofaziale Membranblatt dar. Diese Membranblätter unterscheiden sich in ihrer Fluidität, ihrer Lipid-Komposition, ihrer Ladung und in ihrer Proteinzusammensetzung (Kirsch, 2003b; Schroeder, 1995; Wood, 2003; Wood, 2002). Das zytofaziale Membranblatt weist etwa sieben mal mehr Cholesterol auf und ist deutlich weniger fluide (Kirsch, 2003b; Wood, 2002). Die beiden Membranschichten unterscheiden sich auch in ihrer Anfälligkeit gegenüber Schädigungen: So fluidisieren 25 mM Ethanol das exofaziale Membranblatt deutlich, das zytofaziale Blatt zeigt selbst bei einer 16-fach höheren Alkoholkonzentration keine Veränderung der Fluidität (Schroeder, 1988 ; Wood, 1989a).

Die Verteilung von Cholesterol in den beiden Blättern von synaptosomalen Plasmamembranen (SPM) ist nicht statisch und lässt sich *in vitro* und *in vivo* manipulieren. Zum Beispiel weisen SPM von 25-Monate alten Mäusen einen Cholesterolgehalt im exofazialen Blatt von ca. 30% auf, im Gegensatz zu 14-15 Monate alten oder 3-4 Monate alten Mäusen, bei denen ca. 23% bzw. 14% Cholesterol im exofazialen Blatt vorhanden ist (Igbavboa, 1996). Bei dieser Studie unterschied sich der Gesamtcholesterolgehalt der SPM in den Altersgruppen nicht. Eigene Arbeiten zeigten eine altersbedingte Zunahme der Cholesterolkonzentrationen in SPM von C57/BJ6 Mäusen (Eckert, 2001b; Kirsch, 2002). Die Cholesterolverteilung in SPM von C57/BJ6 Mäusen lässt sich zum Beispiel auch durch eine orale Therapie mit Statinen oder mit Ethanol manipulieren. So führt eine dreiwöchige Behandlung mit den lipophilen Wirkstoffen Lova- und Simvastatin zu einer signifikanten Reduktion des Cholesterolgehaltes im zytofazialen Membranblatt (Kirsch, 2003b). Ethanol hingegen verdoppelt den Cholesterolgehalt im exofazialen Membranblatt, ohne den Gesamtcholesterolgehalt zu ändern (Wood, 1990).

Sowohl die Erhöhung als auch die Erniedrigung des membranären Cholesterolgehaltes hat Konsequenzen für die Funktion von membrangebunden Proteinen. So wurde etwa gezeigt, dass eine Reduktion der Cholesterolgehalte die GABA Aufnahme an Gehirnmembranen reduziert. Dieser Effekt lässt sich durch die Zugabe von Cholesterol zur Membranpräparation aufheben (North, 1983). In dieser Studie zeigte sich, dass die Manipulation des Cholesterolgehaltes keinen Einfluss auf die Aufnahme von Azetylcholin hat. Die Beeinflussung der Cholesterolgehalte in Membranpräparationen ändert nicht nur den Gesamtgehalt an Sterol, sondern selektiv auch die Verteilung von Cholesterol im exofazialen Membranblatt (Kirsch, 2003a). Eine andere Arbeit zeigt, dass die Erhöhung des Cholesterolgehaltes im exofazialen Blatt von isolierten Erythrozytenmembranen die Präsentation von Sulfhydrylgruppen und Antigenen erhöht (Schachter, 1983). Wird Cholesterol im exofazialen Membranblatt oxidiert, reduziert sich die Ca^{2+}/Mg^{2+} -ATPase Aktivität, wobei die Na^{+}/K^{+} -ATPase Aktivität unbeeinflusst bleibt (Wood, 1995). Bisher wurde der Bedeutung von Cholesterolverteilung in den Membranblättern für die Funktion von membranären Proteinen nur wenig Beachtung geschenkt. Die Mechanismen, die die Verteilung von Cholesterol zwischen exofazialem und zytofazialem Membranblatt regeln sind bisher nur schlecht verstanden. Im Gegensatz ist die Regulation der Phospholipidverteilung zwischen den Membranblättern gut erforscht, für die zahlreiche spezifische Proteine identifiziert wurden (Connor, 1990; Diaz, 1996; Zachowski, 1993). Kandidaten für eine Regulation der transmembranären Cholesterolverteilung (tCV) sind unter anderem das Fettsäurebindungsprotein (FABP)

und das Steroltransportprotein-2 (Wood, 1999). Andere mögliche Regulatorproteine sind Apo E, LDLR und P-Glykoprotein. Die exofazialen Membranblätter von SPM, welche aus dem Gehirn von Mäusen gewonnen wurden, denen gentechnisch das apoE Gen ausgeschaltet wurde (apoE null-Mäuse), weisen gegenüber Kontroll-Mäusen eine Verdopplung der Cholesterolgehalte auf (Igbavboa, 1997). Da SPM von apoE null- und Kontroll-Mäusen die gleichen Gesamt-Cholesterolgehalte aufweisen, müssen andere Faktoren für die beobachteten Unterschiede verantwortlich sein. Das Apo E Protein ist für die Cholesterolhomöostase essentiell. Es transferiert über die Interaktion mit dem LDLR und anderen Rezeptoren Cholesterol zur Nervenzelle bzw. transportiert überschüssiges Cholesterol von Nervenzellen ab. Diese beiden Vorgänge können in der Tat die tCV in Nervenzellmembranen beeinflussen. Ein weiteres Protein, das die tCV beeinflussen könnte stellt das P-Glykoprotein (P-Gp; ABCA1) dar, welches zu der Familie der ATP-bindenden Kassetten-Transporter (ABC-Transporter) gehört (Schinkel, 1997). Experimente mit Cholesterol-Oxidase legen den Schluss nahe, dass ABCA1 Cholesterol von der zytofazialen zur exofazialen Membranseite transferiert. Dieser Vorgang ist ATP-abhängig (Garrigues, 2002). Der zugrunde liegende Mechanismus ist noch nicht genau bekannt, es wird diskutiert, dass Cholesterol mit ABCA1 komplexiert (Garrigues, 2002). Andererseits spricht gegen diese These, dass Statine die Cholesterolverteilung zwischen den Membranblättern beeinflussen (siehe oben). In vitro Befunde zeigen, dass Statine und Cholesterol Substrate für ABCA1 darstellen und um die Bindung am Protein konkurrieren (Bogman, 2001). Untersuchungen an *mdr1a/b* null-Mäusen, die kein ABCA1 exprimieren, deuten zudem darauf hin, dass ABCA1 die Gehirngängigkeit von Statinen limitiert (Chen, 2007).

Eigene Arbeiten haben gezeigt, dass der Abtransport von Cholesterol bei kultivierten CHO-Zellen sowohl von der Aktivität von ABC-Transportern, als auch von der Anwesenheit von Apolipoprotein im Kulturmedium abhängt (Eckert, 2007a).

Weitere Evidenzen sprechen dafür, dass auch Sphingomyelin an der Regulation der tCV beteiligt ist (Porn, 1991; Slotte, 1988; Slotte, 1989). In Leyding-Tumorzellen und in Fibroblasten wurde gezeigt, dass die Hydrolyse von Sphingomyelin Cholesterol von der Plasmamembran in das Zellinnere rekrutiert, wo es verestert wird. Falls Sphingomyelin die Cholesterolverteilung in der Membran beeinflusst, so ist hier vor allem das exofaziale Membranblatt beteiligt, wobei Sphingomyelin etwa 2-4 Prozent des Phospholipid-Gesamtgehaltes von SPM ausmacht. Im zytofazialen Blatt von SPM kommt Sphingomyelin fast nicht vor (Rao, 1993; Verkleij, 1973; Wood, 1993). Im Gegensatz dazu bestehen Erythrozyten-Membranen zu fast einem Viertel aus Sphingomyelin (Dougherty, 1987). Der Gehalt im exofazialen Membranblatt beträgt bei Erythrozyten etwa 85 % (Verkleij, 1973). Der prozentuale Cholesterol-Gehalt im exofazialen Blatt von SPM beträgt rund 13 bis 15% (Igbavboa, 1997; Kirsch, 2003b). Der Cholesterolgehalt im exofazialen Blatt von Erythrozyten-Membranen beträgt rund 25% (Schroeder, 1991). Folglich sind im exofazialen Membranblatt steigende Sphingomyelingealte positiv mit erhöhten Cholesterolwerten korreliert. Allerdings beinhaltet das zytofaziale Membranblatt die niedrigsten Sphingomyelin- und die höchsten Cholesterol-Gehalte. Höchstwahrscheinlich sind an der biochemischen Regulation der tCV mehrere der genannten, aber auch noch unbekannte Mechanismen beteiligt.

1.3.3 Lipid Rafts und Caveole

Neben dem exo- und dem zytofazialen Blatt ist Cholesterol in weiteren diskreten Membranbereichen verteilt. Hierzu zählen Lipid rafts und Caveole. Lipid rafts sind

Strukturen innerhalb der Membran, die reich an Cholesterol und Glykosphingolipiden sind und Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerte Proteine enthalten. Im Gegensatz zu Caveole enthalten Lipid rafts kein Caveolin-Protein (Graham, 1998; Quest, 2004). Synonym zu Lipid rafts werden die Begriffe glykolipidreiche Membranen oder Detergent-resistente Membranen verwendet (Simons, 2000b). Es gibt Hinweise, dass Cholesterol die Packungsdichte der Sphingolipid-Moleküle innerhalb von Lipid rafts erhöht und somit eine separate, geordnete Lipid-Phase im exofazialen Membranblatt schafft (Brown, 1998b; Simons, 2000b). Es wird angenommen, dass Lipid rafts sowohl an der Signaltransduktion als auch an der intrazellulären Sortierung von Proteinen beteiligt sind (Brown, 1998a). Weiterhin scheinen Lipid rafts an diversen Krankheitsprozessen beteiligt zu sein (Simons, 2002). Es existiert ein markantes Interesse an der Rolle von Lipid rafts im Gehirn sowohl hinsichtlich der physiologischen Funktion als auch bei pathophysiologischen Vorgängen im Rahmen von neurodegenerativer Erkrankungen. Es wurde berichtet, dass Lipid rafts essentiell für die Aufrechterhaltung der normalen neuronalen Struktur und Funktion sind (Hering, 2003). In diesem Zusammenhang wurde in einer anderen Studie gezeigt, dass SNARE Proteine, wie beispielsweise das Cholesterol-bindende Protein Synaptophysin, in Lipid rafts konzentriert sind (Chamberlain, 2001). Lipid rafts beherbergen zelluläres Prion-Protein und seine Scarpie-Isoform (Naslavsky, 1997), sowie das Alzheimer-relevante APP und A β Protein (Wahrle, 2002).

Sowohl der Apo E Genotyp als auch zunehmendes Alter führen zu strukturellen Veränderungen von synaptosomalen Lipid rafts (Igbavboa, 2005). Im Vergleich zu Cholesterol und Sphingomyelin sind die Lipid raft-Markerproteine alkalische Phosphatase und Flotillin-1 von diesen Veränderungen besonders betroffen. So sind die alkalische Phosphataseaktivität und der Gehalt an Flotillin-1 in synaptosomalen Lipid rafts von jungen und alten Apo E4 Mäusen vergleichbar. Dagegen unterscheiden sich Lipid rafts von jungen Apo E3 Mäusen deutlich. Bei beiden Genotypen steigt der Cholesterolgehalt der Lipid rafts mit zunehmendem Alter an (Igbavboa, 2005). Die zugrunde liegenden Mechanismen, die zur Ausbildung von Lipid rafts führen sind noch nicht verstanden. Es wird spekuliert, dass für die Bildung von Lipid rafts die Präferenz von Cholesterol für die gesättigten Acyl-Ketten der Sphingolipide und dynamische Protein-Lipid und Protein-Protein Interaktionen bedeutsam sind (Shohami, 2003). Möglicherweise spielt auch die physikochemische Konsistenz der in Lipid rafts enthaltenen Proteine eine entscheidende Rolle (Anderson, 2002).

Obwohl sich eine Vielzahl von Studien mit Lipid rafts beschäftigt, sind noch etliche Fragen bezüglich dieser Lipid-Domänen offen. Es gibt keine Übereinkunft über die Dimension oder die Lebenszeit von Lipid rafts in vivo (Shohami, 2003). Im Gegensatz zu Caveole wurden Lipid rafts bisher noch nicht in Zellen visualisiert. Allerdings konnten eigene, in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für Biophysik Frankfurt durchgeführte Untersuchungen erstmals Lipid rafts in Zellmembranen von BHK-Zellen elektronenmikroskopisch nachweisen (Raunser, 2006). Weiterhin liefern neuere biophysikalische Techniken, wie FRET, Fluoreszenz Anisotropie oder EPR, Informationen zu Lipid rafts, insbesondere zu Parametern wie Viskosität oder Diffusion. Die Größe von Lipid rafts wird auf 10 bis 100 nm beziffert (Edidin, 2003; Shohami, 2003). Eine verblüffende Entdeckung beschreiben Subczynski et al. Sie berichten, dass Lipid rafts sehr instabil sind und nur eine Lebenszeit von weniger als einer Millisekunde aufweisen (Subczynski, 2003). Falls Lipid rafts wirklich nur eine so geringe Lebensdauer haben, stellt sich die Frage, ob über eine Dichte-Gradienten-Zentrifugation überhaupt real existierende Lipid rafts isoliert werden können. In der Tat herrscht in der

Wissenschaft ein Disput über die angewendeten Methoden zur Isolierung von Lipid rafts (Brown, 2000; Edidin, 2003; Hooper, 1999; Lichtenberg, 2005; Shohami, 2003). Die Standardmethode isoliert Lipid rafts nach der Behandlung von Membranen oder Gewebeproben mit eiskalten Detergentien, wie z.B. Triton X-100, über eine Dichte-Gradienten-Zentrifugation. Es wurde argumentiert, dass eine Detergenzbehandlung möglicherweise selbst die Bildung von Lipid Raft induziert und somit diese Strukturen nicht die physiologische Situation abbilden (Lichtenberg, 2005). Untersuchungen haben weiterhin gezeigt, dass die Natur des Ausgangsmaterials und unterschiedliche Detergentien die Lipid-Verhältnisse und den Lipid- und Proteingehalt von Lipid rafts beeinflussen, was einen Vergleich von Studien untereinander wesentlich erschwert (Edidin, 2003). Als Ausweg wurde die Verwendung von Methoden vorgeschlagen, die kein Detergenz beinhalten (Brown, 2000). Eigene Untersuchungen an Synaptosomen aus dem Gehirn der Maus zeigen im Vergleich zur Isolierung von Lipid rafts mit Titon X-100 in der Tat frappierende Unterschiede hinsichtlich der Protein- und Lipidzusammensetzung (Eckert, 2003).

Caveole wurden schon vor über 50 Jahren als 50–100 nm große Einschlüsse in Plasmamembranen elektronenmikroskopisch nachgewiesen (Palay, 1955; Yamada, 1955). Caveole sind kolbenförmige Strukturen in Membranen, die reich an Cholesterol und Sphingolipiden sind. Charakteristischerweise enthalten sie das Protein Caveolin. Caveole sind funktionell an endozytotischen Prozessen, an der Signaltransduktion und der Cholesterolhomöostase beteiligt (Anderson, 2002; Fielding, 2003). Die Proteinfamilie der Caveoline besteht aus den Proteinen Caveolin-1, -2 und -3, wobei die beiden Erstgenannten in vielen Zelltypen exprimiert werden. Caveolin-3 kommt hauptsächlich in Muskelzellen vor (Anderson, 1993; Lisanti, 1994). Caveolin-1 wurde in Astrozyten der Ratte nachgewiesen, elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen Caveole in Membranen von Astrozyten (Cameron, 1997; Teixeira, 1999). Es wird noch debattiert, ob Caveolin auch in Neuronen vorkommt. Caveolin mRNA wurde zwar in hippokampalen Neuronen detektiert (Cameron, 1997), allerdings findet sich kein Caveolin-1 Protein in SPM, die aus dem Vorderhirn der Ratte isoliert wurden (Wu, 1997). Allerdings fanden andere Studien sowohl Caveolin-1 mRNA als auch Caveolin-1 Protein in primären hippokampalen Neuronen der Maus (Bu, 2003; Gaudreault, 2004). Möglicherweise ist die Präsenz von Astrozyten in primären neuronalen Kulturen für die augenscheinliche Diskrepanz zwischen den Studien verantwortlich.

1.4. Zentrale Cholesterolhomöostase und Altern

Altern ist mit normalen physiologischen Vorgängen verbunden, die den Organismus vom Zeitpunkt der Geburt an stetig beeinflussen. Obwohl Altern somit keine Krankheit darstellt, erfolgen gerade mit fortschreitendem Alter deutliche Veränderungen der Gehirnstruktur und -funktion (Teter, 2004). Eine der wohl deutlichsten altersbedingten Änderungen betrifft den Cholesterolgehalt von synaptosomalen Membranen. Eigene und Untersuchungen von Anderen zeigen neben einer Zunahme des Gesamt-Cholesterolgehaltes im Hirngewebe eine signifikante Steigerung der Cholesterolmenge in synaptosomalen Plasmamembranen (Cutler, 2004; Eckert, 2001b; Kirsch, 2003a). Aber nicht nur die Menge an Cholesterol verändert sich, sondern auch dessen Verteilung zwischen den Membranblättern der Membrandoppelschicht. Der prozentuale Cholesterol-Gehalt im exofazialen Blatt von SPM aus dem Gehirn junger Mäuse beträgt rund 13 bis 15% (Igbavboa, 1997; Kirsch, 2003b). Mit zunehmendem Alter der Mäuse steigt der Cholesterolgehalt im exofazialen Blatt um fast das Doppelte an (Igbavboa, 1997). Weiterhin zeigen eigene Ergebnisse, dass der Cholesterolgehalt von Lipid rafts,

die aus Gehirnen von 24-Monate alten Mäusen gewonnen wurden wesentlich höher ist im Vergleich zu 12- oder 2-Monate alten Mäusen (Igbavboa, 2005). Cholesterol ist ein potenter Modulator der Membranfluidität. Die hier beschriebenen altersabhängigen Veränderungen wirken sich somit auf die Regulation membrangebundener Proteine, wie Ionenkanäle oder Rezeptoren aus (Gimpl, 1997; Scheuer, 1995).

Eine weitere altersabhängige Veränderung betrifft die im Mevalonat-Stoffwechselweg entstehenden Isoprenoide. So sind die Dolicholgehalte im Gehirn alter Tiere deutlich erhöhet (Wood, 1989b). Dolichol beeinflusst die Fluidität neuronaler Membranen (Schroeder, 1987), was Konsequenzen für die Struktur und Funktion von membrangebunden Proteinen hat (siehe oben). Die Ursachen und physiologische Konsequenzen der erhöheten Dolicholgehalte im Gehirn alter Tiere sind noch nicht bekannt. Unbekannt ist auch, wie sich das Alter auf die Gehalte von anderen Isoprenoiden, wie Farnesylpyrophosphat oder Geranylgeranylpyrophosphat auswirkt.

1.5. Cholesterol und Pathophysiologische Prozesse im Gehirn

Cholesterol ist an diversen Stoffwechselfvorgängen im Gehirn beteiligt und essentiell für die optimale Funktion des zentralen Nervensystems. Wie fatal sich Fehlregulationen der Cholesterolhomöostase auswirken können, zeigen vorwiegend genetisch bedingte Krankheiten wie die Niemann-Pick Typ C Krankheit oder das Cholesterol-Fehlbildungssyndrom. Letzteres umfasst mindestens fünf Syndrome, bei denen es durch angeborene Fehler in der zellulären Cholesterol synthese zu Entwicklungsstörungen kommt (Porter, 2002).

1.5.1. Smith-Lemli-Opitz Syndrom

Das Smith-Lemli-Opitz Syndrom (SLOS) ist eines der am besten untersuchten Cholesterol-Fehlbildungssyndrome. Das SLOS wirkt sich auf diverse physiologische Parameter aus. Charakteristisch sind unter anderem mentale Retardation und Mikrozephalie, die sich in einem vergleichsweise kleinen Kopf mit tief angesetzten Ohren zeigt. Der Pathologie des SLOS liegt eine defizitäre Cholesterol synthese zugrunde, die durch Mutationen im Gen, das für die 3β -Hydroxysterol- Δ^7 -Reduktase (DHCR7) codiert ausgelöst wird (Porter, 2002). Dieses Protein katalysiert die Umwandlung von 7-Dehydrocholesterol zu Cholesterol. Das aus der DHCR7-Dysfunktion resultierende Cholesteroldefizit bewirkt strukturelle und funktionelle Zellstorungen. Auch dem akkumulierenden Prekursor 7-Dehydrocholesterol wird ein Beitrag zur Pathophysiologie des SLOS zugeschrieben (Porter, 2002).

1.5.2. Niemann-Pick Typ C Krankheit

Bei der Niemann-Pick Typ C Krankheit (NPC) handelt es sich um eine autosomal rezessiv vererbte Lipid-Speicher-Krankheit, die durch Mutationen im NPC-1 Gen verursacht wird (Vance, 2005). Man geht davon aus, dass ca. 95% der Patienten mit NPC dysfunktionelles NPC-1 Protein aufweisen, während ca. 5% der Patienten Mutationen im NPC-2 Gen haben. Charakteristisch für die Krankheit ist die Akkumulation von Lipiden, wie Cholesterol oder Gangliosid, im Rahmen von endozytotischen Prozessen (Blanchette-Mackie, 1988; Vanier, 1983). Die Akkumulation von Cholesterol tritt sowohl in peripheren als auch in zentralen Nervenzellen auf. Pathophysiologisch am bedeutendsten sind allerdings die Krankheitsprozesse im Gehirn (Suresh, 1998). Es

wird angenommen, dass NPC-1 eine Rolle beim intrazellulären Cholesteroltransport spielt. Allerdings sind die Funktionen von NPC-1 und NPC-2 bislang nicht genau verstanden. Ein aktueller Übersichtsartikel weist darauf hin, dass die im Rahmen der NPC vermutete Assoziation zwischen Cholesterolanreicherung im endosomalen Stoffwechsel und Neurodegeneration als nicht gesichert angesehen werden kann (Vance, 2005). Alternativ wurde ein Cholesteroldefizit in anderen Zellorganellen propagiert, das aus der Akkumulation im Endosom resultiert (Vance, 2005).

1.5.3. Huntington'sche Krankheit

Die Huntington'sche Krankheit (HD) steht im Zusammenhang mit Fehlfunktionen des zentralen Cholesterolstoffwechsels. Prominent scheinen hier Veränderungen im Huntingtin-Protein zu sein (Sipione, 2002; Valenza, 2006; Valenza, 2005). Neuere Arbeiten zur Veränderungen der Genexpression in klonalen striatalen Zellen, die unterschiedliche Fragmente des Huntingtins bilden, weisen Veränderungen in der Expression von Genen nach, die an der Lipidhomöostase und speziell am Cholesterolstoffwechsel beteiligt sind (Sipione, 2002). In post-mortem Gewebe aus dem Striatum und dem zerebralen Kortex von HD Patienten wurde, im Vergleich zu Kontrollpersonen, eine verminderte mRNA Expression für HMG-CoA Reduktase, Cytochrom-P450 Lanosterol 14 α -Demethylase und DHCR7 gefunden. Ähnliche Befunde wurden für ein HD-Mausmodell beschrieben (Valenza, 2005). Der Grund für die Reduktion der Gen-Aktivität wird in einer Verminderung des Transkriptionsfaktors SREBP gesehen. Allerdings haben frühe Arbeiten in Gehirngewebe und Fibroblasten von HD Patienten keine Veränderungen in der Cholesterolsynthese (Norton, 1978) oder den Cholesterolgehalten (Maltese, 1984) gesehen. Weitere Arbeiten sind nötig, um die Verbindung von zentraler Cholesterolhomöostase und HD zu sichern.

1.5.4. Alzheimer Krankheit

Eine ganze Reihe von Evidenzen deuten auf eine Verbindung zwischen Cholesterolhomöostase und Alzheimer'sche Krankheit hin (Burns, 2002; Michikawa, 2003; Wolozin, 2004; Wood, 2003). So weist eine Mehrzahl epidemiologischer Studien darauf hin, dass Patienten, die Cholesterol-senkende Statine einnehmen, ein geringeres Risiko haben an Alzheimer zu erkranken (Jick, 2000; Rockwood, 2002; Shepherd, 2002; Wolozin, 2000; Zamrini, 2004). Weiterhin stellt Apo E das wichtigste Transportmolekül für Cholesterol im Gehirn dar (Mahley, 1988; Mauch, 2001; Pitas, 1987). Das Auftreten des Apo E ϵ 4 Allels repräsentiert einen gesicherten Risikofaktor für Alzheimer. Eine Vielzahl an in vitro und in vivo Studien weisen auf eine Verbindung zwischen Cholesterol und dem Alzheimer-relevanten Beta-Amyloid Peptid (A β) hin. So moduliert Cholesterol die zelluläre Expression von Amyloid-Prekursor-Protein (APP) (Bodovitz, 1996; Howland, 1998; Runz, 2002). Andererseits beeinflusst neurotoxisches A β die Dynamik von Cholesterol in der Zelle, speziell wird der Cholesteroltransport in Astrozyten und Neuronen beeinträchtigt, was einen Einfluss auf die zelluläre Funktion ausüben kann (Beffert, 1998a; Igbavboa, 2003; LaDu, 2000; Liu, 1998; Puttfarcken, 1997). Es wurde berichtet, dass eine Cholesterol-reiche Diät die Menge an A β im Gehirn von transgenen Mäusen erhöht, die humanes APP und Presenelin-1 Protein (PS-1) exprimieren (Refolo, 2000). Eine Cholesterol-reiche Diät führte bei diesen Mäusen zu leicht erhöhten Cholesterolspiegeln im Gehirn. Die Differenz betrug 1.92 mg/g zwischen beiden Gruppen. Im Plasma war der Unterschied in den Cholesterolspiegeln mit 101.81 mg/dl wesentlich stärker ausgeprägt. Wie weiter oben diskutiert, stehen die Cholesterolgehalte in Gehirn und Blut nicht im Gleichgewicht, was durch die

vorliegenden Daten unterstrichen wird. Weiterhin wurde an Meerschweinchen gezeigt, dass die Applikation von Simvastatin zwar die Gehirnspiegel an A β senkt, aber den Cholesterolgehalt im Gehirn nicht beeinflusst (Fassbender, 2001), was darauf hinweist, dass Veränderungen des Cholesterolgehaltes die Bildung von APP nicht beeinflusst.

Da diätetische Maßnahmen keinen Einfluss auf den Gesamtgehalt an zentralem Cholesterol haben, stellt sich die Frage, welche Mechanismen für die beobachteten Veränderungen im APP-Stoffwechsel verantwortlich sind. Möglicherweise haben Variationen in Cholesteroldomänen entscheidenden Einfluss auf die Bildung von A β . So induzieren Statine Veränderungen der Cholesterolverteilung zwischen den Blättern synaptosomaler Membranen (Burns, 2006a; Kirsch, 2003b), was mit einer veränderten APP-Prozessierung einhergeht (Burns, 2006a). Sowohl APP als auch A β und Komponenten der Gamma-Sekretase, wie PS-1, wurden in Lipid Raft-Fraktionen nachgewiesen (Bouillot, 1996; Hayashi, 2000; Lee, 1998; Morishima-Kawashima, 1998). Weiterhin ist die gliale Expression von Caveolin-3 in der Nähe von senilen Plaques in Gehirngewebe von Alzheimer Patienten, als auch im Gehirn von transgenen Mäusen, die humanes APP mit einer „schwedischen Mutation“ exprimieren, erhöht (Nishiyama, 1999). Dies weist auf eine mögliche Beteiligung von Caveole bei der APP-Prozessierung hin. Allerdings sprechen andere Befunde gegen eine Lokalisation von APP in Lipid rafts, die zeigen, dass APP und BACE1 in mehr fluiden Regionen der Membran vorkommen (Abad-Rodriguez, 2004). In dieser Studie wurde spekuliert, dass der Verlust an Neuronen und nicht die Akkumulation von Cholesterol entscheidend für die amyloidogene Prozessierung von APP ist. Die meisten Erklärungen für einen Einfluss von Cholesterol auf die zentralen A β -Spiegel stehen im Kontext mit der Menge an Cholesterol im Gehirn. Allerdings könnten auch Mediatoren außerhalb des Gehirns Einfluss auf APP und A β nehmen. Solcher Mediatoren wurden bislang nicht eindeutig identifiziert - mögliche Kandidaten stellen die Cholesterolmetabolite Oxysterole dar (Heverin, 2005). Unter normalen Umständen sind nur Spuren von Oxysterolen im Gehirn nachweisbar. Es ist aber vorstellbar, dass eine hohe diätetische Aufnahme von Cholesterol die Präsenz von Oxysterolen erhöht. Im Gegensatz zu Cholesterol können Oxysterole Membranen, einschließlich die der Blut-Hirn-Schranke penetrieren. So wurde kürzlich gezeigt, dass 27-Hydroxy-Cholesterol aus der peripheren Zirkulation in das Gehirn von Ratten und Menschen übergeht (Heverin, 2005). Ob periphere Oxysterole für die beobachteten Effekte einer Cholesterol-reichen Diät auf die Bildung von A β im Gehirn von Versuchstieren verantwortlich sind, bleibt zu zeigen. Obwohl diese Moleküle möglicherweise die Dynamik von A β beeinflussen, erklären sie jedoch nicht die Erniedrigung von APP und A β durch Statine. Statine zeichnen sich auch durch Cholesterol-unabhängige Effekte aus. So reduzieren Statine die Menge an Isoprenoiden, was in der Folge zu einer Abnahme an isoprenylierten Proteinen führt, für die eine Rolle im APP-Metabolismus angenommen wird (Cole, 2005). Statine inhibieren weiterhin die inflammatorischen Effekte von A β , was ebenfalls auf eine Verminderung der Isoprenoide zurückgeführt wurde (Cordle, 2005b).

Die experimentellen Befunde zu den Interaktionen zwischen Cholesterol und APP bzw. A β sind insgesamt inkonsistent. Dies gilt auch für epidemiologische Studien. Einige kamen zum Schluss, dass erhöhte Serum-Cholesterolspiegel einen Risikofaktor für Alzheimer darstellen (Puglielli, 2003; Sparks, 2002). Allerdings kommt eine eigene Literaturschau zu diesem Thema zu dem Schluss, dass es keine durchgehende Unterstützung für diese These gibt (Wood, 2005). Dies verwundert auch auf dem

Hintergrund der Fallzahlen für Hypercholesterolämie- und Alzheimer Patienten nicht. Es wird geschätzt, dass in den USA ca. 4,5 Millionen Patienten an Alzheimer leiden (Hebert, 2003). Demgegenüber stehen ca. 105 Millionen Amerikaner, die an Hypercholesterolämie leiden, 37 Millionen davon mit sehr hohen Serum-Cholesterolspiegeln. Wenn erhöhte Serumcholesterol-Spiegel einen Risikofaktor für Alzheimer darstellen sollte, dürfte mit mehr Demenz-Patienten gerechnet werden. Allerdings ist diese Schlussfolgerung stark generalisiert und bezieht nicht unterschiedliche Faktoren, wie das Alter, Lipoproteinprofile und andere Krankheiten, die mit einer Hypercholesterolämie assoziiert sind mit ein. Möglicherweise besitzt eine bestimmte Patientengruppe mit Hypercholesterolämie ein gewisses Risiko an Alzheimer zu erkranken: Es wurde berichtet, dass erhöhte Serum-Cholesterolspiegel im Alter von 40 – 55 Jahren prädikativ für eine spätere Alzheimer Krankheit sein könnten (Pappolla, 2003). In dieser Altersgruppe wurde eine signifikante Assoziation zwischen cerebralem Amyloidgehalt und erhöhten Serumcholesterolspiegeln beobachtet. Bei älteren Personen wurde diese Verbindung nicht festgestellt. Es wurde geschlussfolgert, dass womöglich eine Hypercholesterolämie in jüngeren Jahren bedeutsamer für die Ausbildung einer Alzheimer Demenz ist, als in späteren Lebensjahren. Interessanterweise fand eine Studie, dass hohe Serumcholesterolspiegel im höheren Lebensalter mit Alzheimer assoziiert sind (Mielke, 2005). Es wurde angemerkt, dass möglicherweise der Zeitpunkt der Cholesterolbestimmung ein wichtiger Faktor in Verbindung von Cholesterolspiegel und Demenz ist.

1.6. Statine

Statine gehören zu den am häufigsten verordneten Medikamenten zur Prävention von kardiovaskulären Erkrankungen. Sie repräsentieren lipidsenkende Pharmaka, die Serum-Cholesterolspiegel reduzieren. Ihre Wirkung kommt dadurch zustande, dass Statine in nanomolaren Konzentrationen kompetitiv und reversibel die HMG-CoA Reduktase (HMGR) und damit den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Cholesterolbiosynthese hemmen (siehe Abbildung 1.1. -1.3.). Statine werden auch als Cholesterolsynthese-Hemmer oder als HMG-CoA-Reduktase- Inhibitoren bezeichnet. Ursprünglich wurden Statine, wie das Mevastatin, aus dem Schimmelpilz *Penicillium citrinum* isoliert (Endo, 1976). Mittlerweile werden Statine teil- oder vollsynthetisch hergestellt. Statine der ersten Generation sind Lovastatin, Pravastatin und Fluvastatin, Statine der zweiten Generation sind Simvastatin und Atorvastatin und Rosuvastatin repräsentiert ein Statin der dritten Generation (Kapur, 2008). Statine weisen neben ihren vaskulären Effekten, wie die Stabilisierung von arteriosklerotischen Plaques und der Verminderung der Intima-Media-Dicke der Carotiden zusätzliche Wirkungen auf. Hierzu zählt der über das NO-System vermittelte Schutz des Endothels sowie antioxidative und anti-inflammatorische Eigenschaften (Bellosta, 2000; Corsini, 1998). Weiterhin reduzieren Statine die Aktivierung von Thrombozyten, hemmen die Gerinnungskaskade und erhöhen die Fibrinolyse. Diese, über die reine Senkung der Serumcholesterolspiegel hinausgehenden Eigenschaften, sind möglicherweise für die positiven Effekte von Statinen bei neurologischen Erkrankungen, wie Schlaganfall, Multipler Sklerose oder Hirntumoren mitverantwortlich (Bellosta, 2000; Rajanikant, 2007; Steinberg, 2008).

1.6.1. Indikationen

Statine sind bei diätresistenter primärer Hypercholesterolämie indiziert. Diese Indikation gründet auf den Ergebnissen großer Interventionsstudien mit Simvastatin und Pravastatin von durchschnittlich fünf Jahren Dauer, in denen die koronare Morbidität und Mortalität sowie die Gesamtmortalität sowohl in der Sekundär- als auch in der Primärprävention der Atherosklerose erheblich reduziert werden konnten. Auch die Zahl koronarer Interventionen, wie Gefäßdilataationen oder Bypass-Operationen, konnte deutlich vermindert werden. Die Datenlage für Atorvastatin und Fluvastatin ist deutlich geringer (Keller, 2005).

Die Erkenntnisse über die Behandlung von Kinder und Jugendliche mit heterozygoter familiärer Hypercholesterolämie sind bislang spärlich. Eine doppelblinde randomisierte Studie an 173 Jugendlichen mit 48 Wochen Dauer (Simvastatin 20 bis 40 mg/Tag) ergab gute Ergebnisse und keine unerwünschten Wirkungen, jedoch sollte die Verordnung bislang noch restriktiv gehandhabt werden. Atorvastatin ist für die homozygote familiäre Hypercholesterolämie zugelassen. Die Zahl der behandelten Kinder und die Dauer der Behandlung sind bisher minimal (Keller, 2005).

1.6.2. Physiko-Chemische Eigenschaften

Alle Statine weisen eine HMG-CoA-ähnliche Struktur auf (siehe Abbildung 1.2.). Lovastatin, Pravastatin und Simvastatin besitzen eine substituierte Decalin-Ringstruktur und leiten sich vom natürlich vorkommenden Mevastatin ab. Diese drei Statine werden als Typ I Statine bezeichnet. Die Typ II Statine Fluvastatin, Cerivastatin, Atorvastatin und Rosuvastatin sind vollsynthetische HMGR-Inhibitoren mit größeren Fluorophenylseitengruppen.

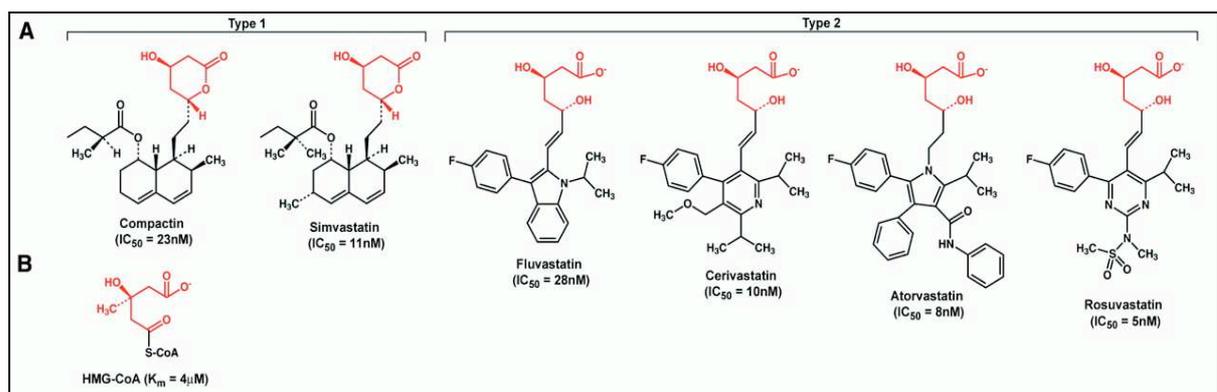


Abb 1.2. Struktur und mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) von Statinen A. Beispiele für Typ 1 und Typ 2 Statine. B. Strukturformel von HMG-CoA (aus (Istvan, 2001); mit Erlaubnis des Verlages).

Die Seitengruppen der Ringe definieren die Löslichkeit und die pharmakologischen / pharmakokinetischen Eigenschaften der Statine. Mit Hilfe der Bestimmung der Verteilung der Stoffe an der Oktanol/Wasserphase lässt sich das Löslichkeitsverhalten der Statine charakterisieren. Aufgrund des Logarithmus der Penetrationskoeffizienten sind Simvastatin, Lovastatin, Cerivastatin, Fluvastatin, Pitavastatin und Atorvastatin als lipophil und Pravastatin als hydrophil anzusehen. Rosuvastatin besitzt eine polare Methansulfonamid-Gruppe und ist hinsichtlich seiner Lipophilie zwischen Cerivastatin

und Pravastatin einzuordnen (Eckert, 2007b). Die Unterschiede in der Lipophilie reflektieren das Potential der Statine, zelluläre Membranen durch passive Diffusion zu durchdringen. Das erklärt, warum Pravastatin kaum, Lovastatin und Simvastatin hingegen zelluläre Membranen gut durchqueren. Pravastatin zum Beispiel weist eine polare Hydroxyl-Seitengruppe auf, die das Molekül hydrophil macht. Somit ist für die Penetration von Pravastatin in Zellen ein aktives Transportsystem notwendig. Im Gegensatz dazu weist zum Beispiel Atorvastatin im Zentrum des Moleküls einen Pyrrolring auf, welcher kovalent mit aromatischen Strukturen verbunden ist. Dies sorgt für die hohe Lipophilie von Atorvastatin und vermittelt seine hydrophoben Wechselwirkungen mit membranären Phospholipid-Acyl-Ketten. Fluvastatin stellt trotz seiner zahlreichen Wasserstoffbindungen einen hoch permeablen Arzneistoff dar. Es wird davon ausgegangen, dass Fluvastatin auf Grund seines amphiphilen Charakters intra-molekulare Wasserstoffbrücken aufbaut, die dem Molekül eine scheinbare Lipophilie und die Fähigkeit zur Penetration von Zellmembranen verleihen (Rajanikant, 2007). Allerdings durchdringen Fluvastatin und Pravastatin auf Grund ihres hydrophilen Hydroxysäurerestes kaum die Blut-Hirnschranke (Guillot, 1993).

1.6.3. Pharmakokinetik

Alle Statine werden nach oraler Zufuhr schnell aus dem Magen-Darm-Trakt resorbiert. Während bei Simvastatin die Bioverfügbarkeit von der Nahrung unabhängig ist, wird die Bioverfügbarkeit von Pravastatin, Fluvastatin und Atorvastatin durch gleichzeitige Nahrungsaufnahme um etwa 37%, 22% bzw. 13% vermindert. Dagegen wird die Bioverfügbarkeit von Lovastatin um 50% gesteigert. Die maximale Plasmakonzentration von Simvastatin, Pravastatin, Fluvastatin und Atorvastatin wird schon nach weniger als 2 Stunden erreicht, die von Lovastatin nach 4 Stunden. Die Eiweißbindung im Plasma beträgt für Lovastatin, Simvastatin, Fluvastatin und Atorvastatin über 95%, für Pravastatin 55 bis 60%. Lovastatin und Simvastatin besitzen einen Laktonring, der bei der ersten Passage durch die Leber in die zugehörige Hydroxysäure überführt wird, wodurch aus der inaktiven Vorstufe das wirksame Pharmakon entsteht. Gleichzeitig werden Lovastatin und Simvastatin bei der ersten Leberpassage zu mehreren aktiven Metaboliten umgebaut und biliär ausgeschieden, so dass ihre Konzentration in anderen Körpergeweben wie Niere, Nebenniere, Milz oder Testes gering ist. Den großen Kreislauf erreichen weniger als 5% der Ausgangsdosis. Aus Atorvastatin entstehen durch First-pass-Metabolismus zwei hoch aktive Metaboliten, was die sehr lange Eliminationshalbwertszeit von etwa 30 Stunden erklärt (Keller, 2005).

Pravastatin und Fluvastatin werden nicht als Prodrugs, sondern in aktiver Form verabreicht. Pravastatin findet sich in erheblich niedriger Konzentration in der Leber als Lovastatin, aber in höherer Konzentration in extrahepatischen Geweben. Für die neuen Substanzen liegen nur wenige Daten vor, im Lebergewebe wird Atorvastatin in hoher Konzentration gefunden (Keller, 2005).

1.6.4. Pharmakologie

1.6.4.1. Pharmakodynamik

Statine hemmen die HMG-CoA Reduktase und damit die Umwandlung von HMG-CoA zu Mevalonat und somit einen der ersten Schritte der Cholesterolsynthese (Abbildung 1.1.).

Die im Statinmolekül mit der HMG-CoA-ähnlichen Einheit kovalent verbundene, sperrige hydrophobe Gruppe besetzt (Abbildung 1.2.) die Hydroxymethylglutaryl-Bindungstasche und einen Teil der Bindungsoberfläche für das Co-Enzym A und verhindert so sterisch die Bindung des natürlichen Substrates im Enzym (Abbildung 1.3.) (Istvan, 2001). Dadurch hemmen Statine kompetitiv den Umsatz von HMG-CoA zu Mevalonsäure. Dabei ersetzt die O₅-Gruppe des HMG-Moduls den ortständigen Thioester-Sauerstoff. Statine binden nicht an die NADP(H) –Bindungsstelle (Keller, 2005). Gleichzeitig wird die Substrat-Bindungstasche einer Konformationsänderung unterworfen, so dass sich die rigiden hydrophoben Ringstrukturen der Statine anlagern können und die Bindungsstelle überlagern. Man geht davon aus, dass die Bindung der Statine an das aktive Zentrum der HMG-CoA Reduktase über zahlreichen von-der-Waals-Bindungen zustande kommt (siehe Abbildung 1.3.) (Istvan, 2001). Hydrophobe Wechselwirkungen sind für die nanomolaren K_i-Werte der Statine verantwortlich (Keller, 2005).

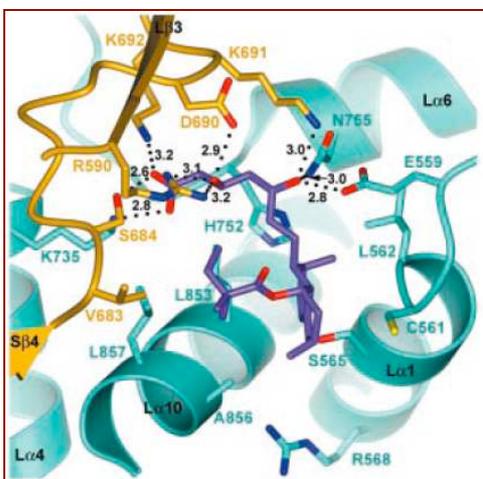


Abb. 1.3. Bindung von Simvastatin an die humane HMGR. Die Interaktionen zwischen dem Statin und den Resten der HMGR sind größtenteils polar und für alle Statine sehr ähnlich (gestrichelte Linien). Die rigiden hydrophoben Gruppen der Statine befinden sich in einer oberflächlichen Furche zwischen den Helices La1 und La10. (aus (Istvan, 2001); mit Erlaubnis des Verlages).

Da die Nicotinamid-(NADP[H])-Bindungsstelle am Enzym von Statinen nicht okkupiert wird, schließen die Forscher Istvan und Deisenhofer, die das Bindungsverhalten der Statine aufgeklärt haben, dass die cholesterolsenkende Potenz der Statine möglicherweise dadurch gesteigert werden kann, wenn eine nicotinamidähnliche Struktur angefügt wird (Istvan, 2001; Keller, 2005).

Der durch die Wirkung der Statine induzierte Mangel an intrazellulärem Cholesterol führt zu einer gesteigerten Transkription des LDL-Rezeptor-Gens. Die Zahl der LDL-Rezeptoren auf der Zelloberfläche und die fraktionelle katabole Rate für LDL nehmen zu. Die Zellen decken ihren Cholesterolbedarf durch gesteigerte Aufnahme von LDL-Cholesterol aus dem Plasma. Die intrazelluläre Neusynthese von LDL wird vermindert (Keller, 2005).

In vitro Untersuchungen zur Wirkung von Lovastatin an Rattenlebern zeigten, dass 36 Proteine signifikant in ihrer Funktion verändert wurden. Die wichtigsten Ergebnisse waren: 1. Die Suppression der HMG-CoA-Reduktase führte zu einer Aktivitätssteigerung der zytosolischen HMG-CoA-Synthase und der Isopentyl-Diphosphat-delta-Isomerase. Weiterhin nahm die Synthese von Apolipoprotein AI zu. 2. Die Schlüsselenzyme der Glukoneogenese, Fruktose-1,6-Diphosphatase und Ketoheksokinase wurden in ihrer Aktivität reduziert, Glucose-6-Phosphat-1-Dehydrogenase, das erste Enzym des Pentosephosphatzyklus wurde stimuliert. Als Zeichen von Toxizität werteten die Autoren, dass Veränderungen in Proteinen zu erkennen waren, die für die Funktion des

Zytoskeletts, der Kalziumhomöostase, Proteaseinhibition, Signalübertragung und Apoptose zuständig waren (Steiner, 2000).

Die Mevalonat-regulierte Replikation der DNA ist von Isopentyladenin abhängig und wird in vitro von Mevastatin gehemmt. In vitro Studien an kultivierten Gliazellen zeigten eine Hemmung der Dolichol-vermittelten Glykoprotein- und DNA-Synthese. Jedoch werden in vivo die von Mevalonat ausgehende Synthese von Isopentyladenin und die von Farnesylpyrophosphat ausgehenden Synthesen von Dolichol und Ubichinon durch die Therapie mit Statinen nicht verändert. Es gibt bisher keinen Hinweis, dass die DNA-Replikation beim Menschen nach Einnahme dieser Arzneimittel gehemmt wird (Keller, 2005).

Die Einnahme von Statinen führt zu einer dosisabhängigen Reduktion von Gesamt- und LDL-Cholesterol im Plasma zwischen 16 und 63 Prozent. Es sinken sowohl die Zahl der LDL-Partikel als auch der Cholesterolgehalt der einzelnen Partikel. Gleichzeitig kommt es zu einer Senkung der Triglyzeridspiegel um 6 bis 53 Prozent und zu einer Erhöhung der HDL-Cholesterol von 2 bis 6 Prozent abhängig vom jeweiligen Statin (Kapur, 2008). Umsatzstudien von Cholesterol am Menschen zeigen, dass während einer Therapie mit Lovastatin die Synthese von Cholesterol nicht so stark unterdrückt wird, dass lebensnotwenige Speicher von Cholesterol entleert werden. Nach einer Einzeldosis von Lovastatin kehrt die Ausscheidung von Mevalonat im Urin in weniger als 24 Stunden zum Ausgangswert zurück (Keller, 2005).

Untersuchungen zur Funktion der Nebennieren und der Testes ergaben keine Einschränkung der Hormonproduktion während einer Therapie mit Lovastatin, Simvastatin, Pravastatin oder Fluvastatin. Für Atorvastatin liegen diesbezüglich keine Daten vor (Keller, 2005).

Triglyceride werden in einzelnen Studien um bis zu fünfundzwanzig Prozent reduziert. In VLDL wird der Cholesterolgehalt mäßig gesenkt, der Triglyceridgehalt deutlicher. HDL steigen oft nur mäßig an. Mit den Lipiden werden auch die Apolipoproteine B und E gesenkt. In Zellkulturexperimenten bewirken Statine über eine Stimulation des Peroxisomen-Proliferator-aktivierten Rezeptors alpha (PPARalpha) eine Zunahme an HDL, die sowohl durch Mevalonat als auch durch Gernaylgeranylpyrophosphat kompensiert werden (Keller, 2005).

Es gibt Hinweise darauf, dass das Ausmaß der Cholesterolsenkung individuell von der genetischen Prädisposition abhängt. So wies eine Amsterdamer Arbeitsgruppe nach, dass das Vorkommen eines häufigen Polymorphismus im CETP-Gen (Taq1B) unabhängig von der Höhe des HDL-Cholesterospiegels im Plasma und der Aktivität der lipolytischen Enzyme mit der Progression der koronaren Atherosklerose und einem schlechten Ansprechen auf Pravastatin assoziiert war (Boekholdt, 2005; Mohrschladt, 2005; Regieli, 2008).

Über die eigentliche Cholesterolsenkung hinaus werden den Statinen eine Reihe zusätzlicher, pleiotroper Wirkungen zugeschrieben, die ihren Einsatz in der Behandlung atherosklerotischer Komplikationen sinnvoll erscheinen lassen: Sie wirken antioxidativ, antithrombotisch, vaskuloprotektiv, begünstigen die Angiogenese, nehmen positiv Einfluss auf die Kontraktilität der Kardiomyozyten durch Modulation der sarkolemmalen Na⁺/K⁺-ATPase und hemmen die Reifung und die antigenpräsentierende Funktion dendritischer Zellen in arthereosklerotischen Plaques (Keller, 2005).

1.6.4.1.1. Wirkungen im zentralen Nervensystem

Damit Statine überhaupt im zentralen Nervensystem Wirkungen vermitteln können, müssen sie das Rückenmark und das Gehirn erreichen. Bislang ist lediglich bekannt,

dass Lovastatin und nicht Pravastatin in der humanen Zerebrospinalflüssigkeit in pharmakologisch relevanten Konzentrationen nachweisbar ist (Botti, 1991).

In den vergangenen Jahren gab es im Zusammenhang mit der Einnahme von Statinen immer wieder vereinzelte Berichte über unerwünschte Wirkungen, die über das zentrale Nervensystem vermittelt wurden und pharmakologische Effekte im Gehirn nahe legen. Diese betreffen das Auftreten von Depressionen, Erinnerungsverlust, Schwindel, Verwirrtheit, aggressivem Verhalten und Schlafstörungen (Ehrenberg, 1999; Tatley, 2007). Ausgehend von Berichten, dass geringe Serumcholesterolspiegel mit Depressionen und suizidalem Verhalten assoziiert sein könnten, wurde befürchtet, dass Statine diese Phänomäne noch verstärken, was sich mittlerweile aber als unbegründet herausstellte (Callreus, 2007; Huffman, 2007; Manfredini, 2000; Yang, 2003). Zahlreich systematische Untersuchungen und Metaanalysen konnten ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen Einnahme von Statinen und unerwünschten zentralen Wirkungen herstellen (Harrison, 1994; Tuccori, 2008; Xiong, 2005). In einer Studie wurde sogar von einem geringeren Risiko für Depressionen nach Statinegabe berichtet, was möglicherweise mit einer erhöhten Freisetzung von BDNF in Verbindung stehen könnte (Tsai, 2007; Yang, 2003).

Weitere indirekte Hinweise auf erwünschte Wirkungen im zentralen Nervensystem liefern klinische Studien, die für Statinegabe eine Abnahme der Inzidenz von Schlaganfällen berichten (Amarengo, 2007; Riepe, 2008). Statine scheinen auch bei Gehirntraumata hilfreich zu sein, wie in einem in vivo Modell gezeigt wurde (Pannu, 2007). Die pleiotropen Eigenschaften der Statine, wie endothelialer Schutz über das NO-Synthesystem oder die antioxidativen und anti-inflammatorischen Eigenschaften legen Effekte dieser Wirkstoffklasse bei zahlreichen neurologischen Krankheiten, wie Alzheimer, Parkinson, Multipler Sklerose oder Hirntumoren nahe (Bifulco, 2008; Weber, 2006b). Allerdings befinden sich die präklinischen und klinischen Forschungen zu diesen Einsatzgebieten noch in ihren Anfängen.

1.6.4.1.2. Statine als Alzheimer-Therapeutika

Zahlreiche retrospektive Studien belegen, dass Statine das Risiko an Alzheimer zu erkranken signifikant senken (Haag, 2009; Hajjar, 2002; Jick, 2000; Rockwood, 2002; Wolozin, 2000; Zamrini, 2004). In der Folge initiierte prospektive Studien konnten überwiegend keinen positiven Effekt auf die Inzidenz der Alzheimer Krankheit nachweisen (Arvanitakis, 2008; Li, 2004; Rea, 2005; Rosenberg, 2008; Shepherd, 2002; Zandi, 2005). Auch eine kürzlich erschienene Meta-Analyse konnte keine krankheitsmodulierende Effektivität feststellen (Rockwood, 2006). Möglicherweise verlangsamen Statine allerdings die Progression der Krankheit, worauf neuere Studien hindeuten (Sparks, 2006b; Sparks, 2005). Dabei scheint der Nutzen einer Therapie bei AD-Patienten vom ApoE-Genotyp, den Plasmacholesterolsiegeln und dem Schweregrad der Demenz abhängig zu sein (Sparks, 2006a). Die Dauer der bislang durchgeführten prospektiven Studien deckt sich nicht mit den langen Beobachtungszeiträumen epidemiologischer Studien. Vor dem Hintergrund, dass die Halbwertszeit des Sterol-Pools im Gehirn des adulten Menschen ca. 4,6 Jahren beträgt (Dietschy, 2004), schützt möglicherweise nur eine langfristige Statineinnahme vor pathologischen Prozessen. So fand eine aktuelle populations-basierte Kohortenstudie, die über sechshundert Personen fünf Jahre lang beobachtete, dass Statine das Risiko für kognitive Beeinträchtigungen oder Demenzen halbieren (Cramer, 2008). Auch eine aktuelle retrospektive Untersuchung mit einem Beobachtungszeitraum von fünfzehn Jahren

belegt einen protektiven Effekt der langfristigen Einnahme von Statinen auf das Risiko an Alzheimer zu erkranken (Haag, 2009).

1.6.4.2. Unerwünschte Wirkungen

Unerwünschte Wirkungen sind vor allem mit Lovastatin beobachtet worden, dem am längsten angewandten Präparat. Diese gelten aber wohl für die ganze Stoffklasse. Asymptomatische passagere Anstiege der Serumtransaminasen von weniger als 0,2% und der Creatinkinase (CK) von weniger als 0,05% sind bei der Anwendung aller Präparate aufgetreten. Die Beschwerden reichen von Muskelschmerzen über Myalgien, ohne klinisch relevante Befunde, bis zu einer klinisch manifesten Myopathie. Im schwersten Fall kann akute Rhabdomyolyse mit extrem erhöhten CK-Werten auftreten, die in akutem Nierenversagen münden kann. In einer epidemiologischen Kohortenstudie aus Großbritannien betrug die Häufigkeit einer Myopathie durch Statintherapie 2,3 Fälle pro 10.000 Personenjahren mit Fibrattherapie 6,6 Fälle pro 10.000 Personenjahren gegenüber unbehandelten Patienten mit Hyperlipidämie, bei denen keine Myopathie registriert worden war. Die Inzidenz einer Myopathie in der allgemeinen Bevölkerung wurde mit 0,2 Fällen pro 10.000 Patientenjahren berechnet. Erst kürzlich wurden vier Fälle einer klinischen Myopathie ohne laborchemische Abweichungen bekannt, bei denen Muskelbiopsien entnommen wurden. Eine während der Episode mit Muskelschmerzen, die zweite während der Placebophase und die dritte ohne klinische Beschwerden. Während der Therapie fanden sich histologisch eindeutige Zeichen einer metabolisch bedingten Myopathie, die charakteristisch für eine Störung der mitochondrialen Atmungskette ist (Keller, 2005).

Während mit einer Statin-Monotherapie myopathische Probleme selten sind (0,025% in der Heart Protection Study mit 40 mg Simvastatin über 5 Jahre, bei über 10.000 Patienten), müssen Komplikationen befürchtet werden, wenn gleichzeitig Arzneimittel verordnet werden, die ebenfalls über das CYP-450-System metabolisiert werden. Besonders gefährlich scheint die gleichzeitige Verordnung von Statinen und Fibraten zu sein, die Gefahr der Rhabdomyolyse wird in solchen Fällen mit 1 bis 5% angegeben. Besonders ältere multimorbide Frauen sind gefährdet (Keller, 2005) (siehe auch 1.6.4.2.1. Interaktionen).

Eine Metaanalyse von fünf großen randomisierten Interventionsstudien mit 30.817 Patienten, davon 15.420 mit Statintherapie und einer Dauer von 5 Jahren ergab keinen Hinweis auf ein gesteigertes Karzinomrisiko. Im Gegenteil, die Gesamtmortalität der Statin-behandelten Patientengruppe ging zurück (Keller, 2005). Es existieren auch Hinweise, dass eine langfristige Einnahme von Statinen vor Prostatakrebs schützt (Solomon, 2008).

Hintere Schalentrübungen der Augenlinse, wie sie bei Beaglehunden während einer hoch dosierten Therapie auftraten und die bei Unterbrechung der Therapie reversibel waren, wurden beim Menschen nur vereinzelt festgestellt. Gelegentliche Augenuntersuchungen während einer Therapie mit Statinen werden deshalb angeraten. Bisweilen treten Dyspepsien, Flatulenz und epigastrale Schmerzen milder Ausprägung, noch seltener Hautausschläge, Kopfschmerzen oder Schlafstörungen auf. Nach den bislang vorliegenden Daten sind die Statine gut verträgliche Substanzen mit relativ seltenen Nebenwirkungen, wenn die im Folgenden genannten Interaktionen bedacht werden (Keller, 2005).

Vereinzelte Befunde beschreiben unter Statintherapie das Auftreten von Depressionen, Erinnerungsverlust, Schwindel, Verwirrtheit, aggressivem Verhalten und Schlafstörungen (Ehrenberg, 1999; Tatley, 2007). Zahlreich systematische Untersuchungen und Metaanalysen konnten keinen Zusammenhang zwischen Einnahme von Statinen und unerwünschten zentralen Effekten herstellen (Tuccori, 2008) (Harrison, 1994; Xiong, 2005). Allerdings halten einige Autoren gelegentliche Insomnie und Schlafstörung als Nebenwirkungen unter Statineinfluss durchaus für möglich.

1.6.4.2.1. Interaktionen

Während einer Therapie mit Lovastatin und Ciclosporin, Gemfibrozil, Nicotinsäure oder Erythromycin sind Fälle akuter Rhabdomyolyse mit Myoglobinurie und akutem Nierenversagen beobachtet worden. Messungen des Plasma-Lovastatinspiegels während einer Ciclosporintherapie zeigten, dass es zu einer verminderten Ausscheidung von Lovastatin kommt und der Plasmaspiegel bei gleichzeitiger Ciclosproingabe deutlich höher ist als bei Lovastatin-Monotherapie. Bei immunsupprimierten Patienten, insbesondere nach einer Herztransplantation, muss deshalb die Lovastatindosis reduziert werden und sollte 20 mg/Tag nicht überschreiten (Keller, 2005). Generell bergen alle medikamentösen Therapien die zu einer Erhöhung der Statinplasmaspiegel führen die Gefahr einer Myopathie. Allerdings stellt die fatale Rhabdomyolyse unter Statingabe mit weniger als einem Todesfall pro einer Millionen Verschreibungen ein sehr seltenes Ereignis dar. Eine Ausnahme macht hier Cerivastatin. Dieses als Lipobay verkaufte Statin wurde 2001 aus dem Handel genommen, nachdem weltweit 52 Todesfälle durch Rhabdomyolyse und akutem Nierenversagen auftraten. Zurückgeführt wurde die Mehrzahl der Fälle auf die Arzneimittelinteraktion von Cerivastatin mit Gemfibrozil. Aber selbst unter einer Cerivastatin-Monotherapie wurden, im Vergleich zu anderen Statinen, zehn bis fünfzig mal mehr Fälle fataler Rhabdomyolyse registriert (Staffa, 2002).

Die Statine werden überwiegend in der Leber durch Isoenzyme des Cytochrom-P450-Systems metabolisiert. Mit Ausnahme von Fluvastatin und Rosuvastatin, die über CYP2C9 abgebaut werden, wird der Metabolismus der anderen HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren durch CYP3A4 katalysiert. Pravastatin wird unabhängig vom Cytochrom-P-450-System metabolisiert und hauptsächlich sulfatiert (Keller, 2005). Viele Interaktionen der Statine erklären sich durch ihre Konkurrenz mit anderen Arzneimitteln an CYP450-Enzymen, insbesondere dem CYP3A4 aber auch CYP2C9 und CYP2D6. Ein Teil dieser Arzneimittel wirkt als Substrat, ein Teil als Inhibitor des Enzyms. Andere Arzneimittel induzieren das Enzym. Eine Aktivierung des humanen Pregnan-X-Rezeptors (hPXR) als nukleären Transkriptionsfaktor durch Bindung von Arzneimitteln an eine spezifische Bindungsdomäne des hPXR führt zu einer Heterodimerbildung mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR). Das Heterodimer bindet an das Responseelement des Promoters des CYP3A4 Gens und steigert seine Transkription, nachdem weitere Elemente, Histo-Acyltransferasen, Kointegratoren und Koaktivatoren gebunden wurden. Für folgende Arznei- bzw. Nahrungsmittel wurden Interaktionen mit den Statinen beschrieben, die auf diesem Mechanismus beruhen: Ciclosporin, Tacrolimus, Ketoconazol, Itraconazol, Flucanazol, Miconazol, Clotrimazol, Erythromycin, Clarithromycin, Rifampicin, Norfloxacin, Saquinavir, Indinavir, Titrnavir, Nelfinavir, Diltiazem, Verapamil, Nifedipin, Felodipin, Aminodarone, Clopidogrel, Fibrate, insbesondere Gemfibrozil, Nicotinsäure, Cumarine, Carbamazepin, Amitriptylin, Nefazodon, Sertralin, Grapefruitsaft u.a. (Keller, 2005).

Bei einzelnen Patienten ist bei gleichzeitiger Therapie mit Statinen und Phenprocoumon eine Verlängerung der Prothrombinzeit aufgefallen. Daher sollte die Thromboplastinzeit überprüft werden, wenn diese Substanzen gleichzeitig zum Einsatz kommen (Keller, 2005).

1.6.4.2.3. Kontraindikationen

Bei Leber- und Muskelerkrankungen sind Statine kontraindiziert (Keller, 2005). Bislang gibt es keine eindeutigen Hinweise auf eine teratogene Wirkung von Statinen, von einer Einnahme in der Schwangerschaft und Stillzeit wird allerdings abgeraten (Edison, 2004)

2. Zielsetzung

Richtungsweisend für die Zielsetzung dieser Arbeit, die pharmakologische Beeinflussung der zentralen Lipidhomöostase zu erforschen, waren epidemiologische Befunde, dass Statine signifikant das Risiko an der Alzheimer Demenz zu erkranken, senken. Zu Beginn der wissenschaftlichen Arbeiten zu dieser Habilitationsschrift war etwa bekannt, dass Statine den Schlaf beeinflussen, auch wurde berichtet, dass nach Einnahme von lipophilen Statinen, diese die Cerebrospinalflüssigkeit erreichen. Darüber hinaus lagen aber nur wenige Befunde zur Pharmakologie von Statinen im Gehirn vor.

Da Statine das Schlüsselenzym des Mevalonatstoffwechsels inhibieren, welcher zellulär unter anderem Cholesterol liefert, lag es nahe, auch der zentralen Cholesterolhomöostase Augenmerk zu schenken. Da die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase zwar geschwindigkeitsbestimmend für die Cholesterolbiosynthese ist, dieses Enzym aber am Anfang einer Kaskade von enzymatischen Reaktionen steht, die letztendlich zum Endprodukt Cholesterol führen, sollten Zwischenstufen des Mevalonatstoffwechsels untersucht werden. In eigenen, vorausgegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass mit zunehmendem Alter der Cholesterolgehalt von neuronalen Membranen steigt. Gleichzeitig zeigt sich eine altersbedingte Erniedrigung der Membranfluidität. Interessanterweise wiesen Gehirnmembranen aus dem Hippokampus von verstorbenen Alzheimer Patienten zwar eine signifikant erniedrigte Fluidität auf, der Cholesterolgehalt war allerdings nicht verändert. Diese Vorbefunde stellten wichtige Ausgangspunkte für die wissenschaftlichen Betrachtungen in der vorliegenden Arbeit dar.

Neben Cholesterol liefert der Mevalonatstoffwechsel auch Isoprenoide wie Dolichol, Farnesylpyrophosphat oder Geranylgeranylpyrophosphat. Die beiden Letztgenannten spielen eine wichtige Rolle als lipophile Anker-moleküle bei der molekularen Aktivierung von zellulären Signalproteinen wie Ras und Rho. Da Statine durch die Inhibition der HMG-CoA-Reduktase sowohl die Bildung von Cholesterol als auch der Isoprenoide hemmen, sollte auch den Isoprenoiden Aufmerksamkeit geschenkt werden. Insbesondere auch deshalb, weil Literaturbefunde eine Rolle von isoprenylierten Proteinen bei der Entstehung der Alzheimer Demenz nahelegen. Die bis dato berichteten Isoprenoidgehalte in Zellen und im Blutplasma wurden mit nicht validierten Methoden erhoben und können daher fehlerbehaftet sein. Um die pharmakologischen Effekte von Statinen auf den Isoprenoidstoffwechsel zu beurteilen, ist die Kenntnis von exakten Konzentrationen unabdingbar. Daher sollte eine validierte Methode zur Gehaltsbestimmung von FPP und GGPP entwickelt werden. Diese Methode sollte dann erste Gehalte an Isoprenoiden in Gewebeproben von Alzheimer Patienten liefern, um so die Betrachtungen zum Mevalonatbiosyntheseweg zu komplettieren.

Neben Cholesterolsenkenden Effekten wurden für Statine noch weitere, Cholesterolumabhängige Effekte in der Körperperipherie beschrieben. Diese pleiotropen Effekte wurden hauptsächlich mit der Inhibition der Isoprenoidsynthese in Zusammenhang gebracht. Zu Beginn der Arbeit lagen nur vereinzelte Befunde zu pleiotropen Effekten von Statinen im vaskulären Bereich des Gehirns vor. Ziel war es daher auch, mögliche pleiotrope Effekte von Statinen im Gehirn aufzuspüren. Im Laufe der wissenschaftlichen Untersuchungen gelang es mit Hilfe von DNA-Mirkoarrayuntersuchungen neue Angriffsorte von Statinen im Gehirn zu identifizieren und Effekte von Statinen auf antiapoptotische Mechanismen nachzuweisen. Diese erwiesen sich sowohl Cholesterolumabhängig als auch Isoprenoidunabhängig. In der Folge wurde in der vorliegenden Arbeit auch der Frage nachgegangen, ob dieser neuartige Wirkmechanismus *in vivo* funktionell relevant ist und für die, etwa bei Schlaganfallpatienten gut dokumentierten, neuroprotektiven Eigenschaften von Statinen mit verantwortlich gemacht werden kann.

3. Diskutierte Publikationen

G.P. ECKERT, C. KIRSCH, W.E. MÜLLER

Differential effects of lovastatin treatment on brain cholesterol levels in normal and Apo E-deficient mice.

Neuro Report, 2001, 12: 883-887.

P. HUEBBE, S. SCHAFFER, L. JOFRE-MONSENY, C. BOESCH-SAADATMANI, A.M. MINIHANE, W.E. MÜLLER, G.P. ECKERT, G. RIMBACH

ApoE genotype and vitamin E modulate APP metabolism and cell cycle regulation

Molecular Nutrition & Food Research, 2007, 51:1510-7

G.P. ECKERT, U. IGBAVBOA, W.E. MÜLLER, W.G. WOOD

Lipid rafts of purified mouse brain synaptosomes prepared with and without detergent reveal different lipid and protein domains.

Brain Res., 2003, 962: 144-150

U. IGBAVBOA, G.P. ECKERT, T.M. MALO, A.E. STUDNISKI, L.N.A. JOHNSON, N. YAMAMOTO, M. KOBAYASHI, S.C. FUJITA, T.R. APPEL, W.E. MÜLLER, W.G. WOOD, K. YANAGISAWA

Murine synaptosomal lipid raft protein and lipid composition are altered by expression of human APOE3 and 4, and by increasing age

J. Neurol .Sci., 2005, 229-230: 225-32.

C.KIRSCH, G.P. ECKERT*, W.E. MÜLLER:

Statins effects cholesterol micro-domains in brain plasma membranes.

Biochem. Pharmacol., 2003, 65: 843-856.

S. MEYER DOS SANTOS, C.C. WEBER, C. FRANKE, W.E. MÜLLER, G.P. ECKERT*

Cholesterol: coupling between membrane microenvironment and ABC transporter activity

Biochem. Biophys. Res. Commun., 2007, 354(1):216-21

G.P. ECKERT, L. VARDANIAN, G.W. REBECK, M.P. BURNS

Regulation of central nervous system cholesterol homeostasis by the Liver X Receptor agonist TO-901317

Neurosci. Lett., 2007, 423:47-52

I. PETERS, U. IGBAVBOA, U. HARTIG, T. SCHÜTT, S. HAIDARI, S. BÖTTNER E. COPANAKI, T. DELLER, D. KÖGEL, W.G. WOOD, W.E. MÜLLER, G.P. ECKERT*

The interaction of beta amyloid peptide with cellular membranes stimulates its own production.

BBA-Biomembranes 2009, DOI 10.1016/j.bbamem.2009.01.012.

G.P. ECKERT, W.E. MÜLLER

Presenilin 1 modifies neuronal membranes in vivo

Biochem. Biophys. Res. Commun., 2009, eingereicht.

G.P. HOOFF, D. VOLMER, W.G. WOOD, W.E. MÜLLER, G.P. ECKERT*

Isoprenoid quantitation in human brain tissue. A validated HPLC-fluorescence detection method for endogenous farnesyl- (FPP) and geranylgeranylpyrophosphate (GGPP)

Analytical and Bioanalytical Chemistry 2008, 392: 673-80.

G.P. ECKERT, G.P. HOOFF, U. IGBAVBOA, D. M. STRANDJORD, D.A. VOLMER, W.E. MÜLLER, W.G. WOOD

Regulation of Brain Isoprenoids Farnesyl and Geranylgeranyl Pyrophosphate is altered in Alzheimer's Disease

Neurobiol. Dis., 2009, eingereicht.

L.N. JOHNSON-ANUNA, G.P. ECKERT, J.H. KELLER, U. IGBAVBOA, C. FRANKE, T. FECHNER, M. SCHUBERT-ZSILAVECZ, M. KARAS, W.E. MÜLLER, W.G. WOOD.

Chronic administration of statins alters multiple gene expression patterns in mouse cerebral cortex.

J. Pharmacol. Exp. Ther., 2005, 312: 786-793.

L.N. JOHNSON-ANUNA, G.P. ECKERT, C. FRANKE, U. IGBAVBOA, W.E. MÜLLER, W.G. WOOD

Simvastatin Protects Neurons from Cytotoxicity by Upregulating Bcl-2 mRNA and Protein

J. Neurochem., 2007, 101(1):77-86

C. FRANKE, M. NÖLDNER, R. ABDEL-KADER, L.N. JOHNSON-ANUNA, W. G. WOOD, W. E. MÜLLER, G.P. ECKERT*

Bcl-2 Upregulation and Neuroprotection in Guinea Pig Brain Following Chronic Simvastatin Treatment

Neurobiol. Dis., 2007, 25(2):438-45

*Referenzautor

4. Diskussion

Statine repräsentieren selektive Inhibitoren der 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzym A (HMG-CoA) Reduktase (HMGR), dem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym der Cholesterolsynthese (Abb 4.1). Neben ihrer breiten Anwendung als Lipid-senkende Arzneimittel deuten aktuelle klinische Studien darauf hin, dass Statine bei Patienten mit vaskulären Krankheiten das Schlaganfall-Risiko senken (Amarencio, 2004; Paciaroni, 2007). Auch für weitere neurologische Krankheiten wird eine neuroprotektive Wirkung der Statine diskutiert, etwa bei Rückenmarksschädigung (Pannu, 2007), Hirntrauma (Wang, 2007), Multipler Sklerose (Neuhaus, 2005) oder bei der Alzheimer Krankheit (Eckert, 2007b). Die klinischen Befunde lassen sich in präklinischen Modellen simulieren. Beispielsweise reduziert die langfristige Verabreichung von Simvastatin die Inzidenz und die Größe von spontan auftretenden Schlaganfällen bei Ratten (Kawashima, 2003). Darüber hinaus zeigt die fortgesetzte Verabreichung von Simvastatin ein Tag nach fokaler, zerebraler Ischämie neuro-restaurative Effekte (Chen, 2003). In einem Tiermodell der Multiple Sklerose, bessern Statine die Autoimmunenzecephalomyelitis und verhindern diese bestenfalls (Youssef, 2002).

In vivo und in vitro Studien haben ergeben, dass Statine die Bildung des neurotoxischen, mit der Alzheimer Krankheit assoziierten Beta-Amyloid Peptid senken (Bodovitz, 1996; Fassbender, 2001; Howland, 1998; Runz, 2002; Simons, 1998). Allerdings wurden die zerebralen Cholesterolgehalte im Rahmen von in vivo Studien entweder nicht oder nur relativ wenig durch Statine beeinflusst (Eckert, 2005). Statine schützen Neurone vor NMDA-induzierter Toxizität, eine ähnliche Protektion lässt sich auch durch eine mechanische Cholesterol-Reduktion durch den Sterol-Akzeptor Cyclodextrin erreichen (Zacco, 2003). In einem experimentellen Modell des Schlaganfalls zeigte sich im Gehirngewebe von Statin-behandelten Ratten verstärkte Synaptogenese, Neurogenese und Angiogenese (Cheng, 2003). Die beobachteten Effekte waren Cholesterol-unabhängig. Cholesterol-unabhängige Effekte der Statine schließen anti-oxidative Aktivität, Hochregulation der eNOS-Expression, Inhibition von inflammatorischen Prozessen, Zellwachstum oder erhöhter Glukosemetabolismus ein (Hamelin, 1998; McFarlane, 2002; Werner, 2002) und tragen möglicherweise zur Neuroprotektion bei. Besondere wissenschaftliche Aufmerksamkeit hinsichtlich der Cholesterol-unabhängigen Effekte der Statine genießt die Synthese von Isoprenoiden (McFarlane, 2002; Werner, 2002).

Falls sich Statine wirklich als neuroprotektiv erweisen, stellt sich die Frage nach dem zu Grunde liegenden Wirkmechanismus.

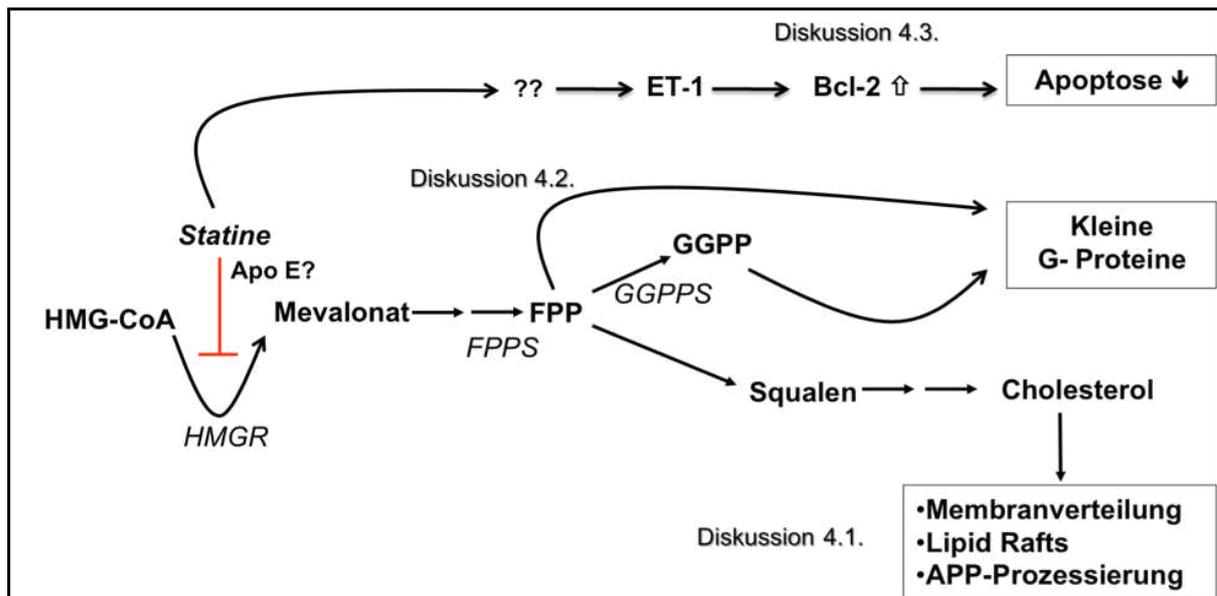


Abb. 4.1. Der Mevalonat-Biosyntheseweg. Durch die, über die HMG-CoA Synthase (HMGR) katalysierte Reduktion von HMG-CoA entsteht zunächst Mevalonat, das in weiteren Reaktionen unter anderem durch die Farnesylpyrophosphat-Synthase (FPPS) in Farnesylpyrophosphat (FPP) umgewandelt wird. FPP ist der Precursor für Squalen, aus dem in vielen weiteren Schritten Cholesterin synthetisiert wird. Cholesterin moduliert in neuronalen Membranen die Fluidität, was in Zusammenhang mit der Prozessierung des Alzheimer-relevanten Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP) gebracht wird. Die APP-Prozessierung scheint eng mit speziellen Membran-Mikrodomänen, den Lipid rafts, verbunden zu sein. Weiterhin ist Cholesterin nicht homogen in Membranen verteilt, sondern befindet sich in diskreten Membranpools. Aus FPP wird auch Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) synthetisiert. Die Isoprenoide FPP und GGPP dienen als lipophile Reste, mit denen kleine G-Proteine wie Ras-, Rho-, oder Rac-Proteine in zelluläre Membranen verankert werden. Statine greifen über die Inhibition der HMGR, sowohl in die Biosynthese von Cholesterin, als auch in die von Isoprenoiden ein. Dabei scheint Apolipoprotein E (Apo E) für die Wirkung von Statinen im Gehirn essentiell zu sein. Daneben wurden für Statine auch Effekte außerhalb des Mevalonat-Biosyntheseweges gefunden, die auf noch unbekanntem Mechanismus (??) über Endothelin-1 (ET-1) das anti-apoptotische Bcl-2-Protein erhöhen. Die Erforschung der zentralen Lipidhomöostase und deren pharmakologische Beeinflussung durch Statine im Rahmen der vorliegenden Arbeit orientierte sich an den skizzierten Stoffwechselschritten, die jeweils diskutierten Zweige sind entsprechend markiert (Diskussion 4.1 – 3.).

Die Erforschung der neuroprotektiven Eigenschaften von Statinen im Rahmen dieser Arbeit orientierte sich am Mevalonat-Biosyntheseweg und an außerhalb dieses Schemas liegenden Mechanismen (Abb. 4.1). Zunächst werden die zentrale Cholesterin-Homöostase und der Einfluss von Statinen auf diese diskutiert (Diskussion 4.1.). Da sich initial zeigte, dass Apolipoprotein E für die Wirkung von Statinen im Gehirn essentiell zu sein scheint, wurde die Bedeutung dieses Cholesterin-Transportmoleküls für die Lipidkomposition von neuronalen Membranen näher beleuchtet. Es folgen die Betrachtungen zu den Effekten von Statinen auf neuronale Membranen und Membran-Mikrodomänen. Weiterhin wurde untersucht, ob die Prozessierung von Amyloid-Precursor-Protein vom membranären Cholesterin-Gehalt abhängig ist, und ob Protein-Lipid Interaktionen physiko-chemische Eigenschaften von Membranen beeinflussen.

Es folgt die Betrachtung der pleiotropen, Cholesterin-unabhängigen Effekte der Statine auf Isoprenoide als spezielle Intermediärprodukte des Mevalonat-Biosyntheseweges (Diskussion 4.2) und Bcl-2 vermittelte Apoptosemechanismen (Diskussion 4.3). Isoprenoide und isoprenylierte kleine G-Proteine wurden vielfach mit der Alzheimer Krankheit in Verbindung gebracht. Mit Hilfe einer sensitiven und validierten Methode zur Bestimmung von FPP und GGPP konnten erstmals erhöhte Gehalte an Isoprenoiden

im Gehirn von Alzheimer Patienten nachgewiesen werden. Die Befunde zur Modulation von Isoprenoiden im Gehirn durch Statine legen eine spezifische Dysregulation des Isoprenoidsynthespfads im Gehirn von Alzheimer Patienten nahe.

Mit der Identifizierung von anti-apoptischen Bcl-2-Protein als neues Target für Statine im Gehirn konnte erstmals ein neues neuroprotektives Prinzip dieser Wirkstoffklasse im zentralen Nervensystem nachgewiesen werden. (siehe auch: Aufbau der Diskussion, auf der folgenden Seite).

Aufbau der Diskussion

4.1. Untersuchungen zur zentralen Cholesterolhomöostase - Einfluss von Statinen

4.1.1. Effekte von Lovastatin auf den Cholesterolgehalt im Gehirn von normalen und Apo E-defizitären Mäusen

Neuro Report, 2001, 12: 883-887.

4.1.2. Einfluss des Apolipoprotein-Genotyps auf den Cholesterolgehalt von neuronalen Membranen und den Metabolismus von APP

Molecular Nutrition & Food Research, 2007, 51:1510-7.

4.1.3. Altersabhängig veränderte Protein- und Lipidkomposition von synaptosomalen Lipid rafts der Maus - Einfluss von humanem Apo E

Brain Res., 2003, 962: 144-150.

J. Neurol .Sci., 2005, 229-230: 225-32.

4.1.4. Statine beeinflussen Cholesterol-Mikrodomänen in synaptosomalen Plasmamembranen

Biochem. Pharmacol., 2003, 65: 843-856.

4.1.5. Membranständiges Cholesterol - Kopplung zwischen Mikrodomänen und ABC-Transporter-Aktivität

Biochem. Biophys. Res. Commun., 2007, 354(1):216-21

4.1.6. Regulation der zentralen Cholesterolhomöostase durch den Leber-X-Rezeptor Agonisten TO-901317

Neurosci. Lett., 2007, 423:47-52

4.1.7. Die Bildung von Beta-Amyloid-Protein ist prinzipiell nicht von Cholesterol abhängig

BBA-Biomembranes 2009, DOI 10.1016/j.bbamem.2009.01.012.

4.1.8. Presenilin-1 beeinflusst die physiko-chemischen Eigenschaften von neuronalen Membranen

BBRC, 2009, eingereicht.

4.2. Intermediärprodukte des Mevalonat-Biosyntheseweges - Isoprenoide

4.2.1. Entwicklung und Etablierung einer validierten Methode zur Bestimmung von FPP und GGPP in menschlichem Gehirngewebe

Analytical and Bioanalytical Chemistry 2008, 392: 673-80.

4.2.2. Erhöhte FPP- und GGPP-Gehalte im Gehirngewebe von Alzheimer Patienten

Neurobiol Dis., 2009, eingereicht.

4.2.3. Statine senken die zerebralen Gehalte von FPP und GGPP

Neurobiol Dis., 2009, eingereicht.

4.3. Die Beeinflussung der Apoptose - Ein neuartiger Wirkungsmechanismus von Simvastatin im Gehirn

4.3.1. Bcl-2-Protein - Ein neues Target für Statine im Gehirn

J. Pharmacol. Exp. Ther., 2005, 312: 786-793.

4.3.2. Simvastatin induziert die Expression von Bcl-2 und schützt neuronale Zellen in vitro

J. Neurochem., 2007, 101(1):77-86.

4.4.3. Simvastatin vermittelt über Bcl-2 neuroprotektive Wirkungen in vivo

Neurobiol. Dis., 2007, 25(2):438-45.

4.1. Untersuchungen zur zentralen Cholesterollhomöostase - Einfluss von Statinen

4.1.1. Effekte von Lovastatin auf den Cholesterolgehalt im Gehirn von normalen und Apo E-defizitären Mäusen

Cholesteroll repräsentiert einen essentiellen Modulator der Integrität von zellulären Membranen und ist besonders wichtig für die physiologischen Funktionen von Gehirnmembranen (Wood, 2007). Seit längerem wird eine mögliche Rolle des Steroids bei der Alzheimer Krankheit diskutiert (Roher, 1999; Wood, 1999). Apo E ist ein 34 kDa großes Protein, das an Rezeptoren der low-density Lipoprotein (LDL) Familie bindet (Mahley, 1988; Saunders, 1993). Beim Menschen kommt es in den Isoformen E2, E3 und E4 vor, die sich in ihrer Primärstruktur an den Positionen 112 und 158 unterscheiden. Apo E stellt das wichtigste Lipoprotein im Gehirn und somit das wichtigste Transportmolekül für Cholesteroll im Zentralnervensystem dar (Mahley, 1988; Saunders, 1993). Dabei ist es am Transport, der Verteilung und anderen Aspekten der zentralen Cholesterollhomöostase beteiligt, die weitgehend unabhängig vom peripheren System reguliert sind (Mahley, 1988). Apo E spielt auch eine dominante Rolle für die Mobilisierung und Umverteilung von Lipiden im Gehirn, vor allem beim Erhalt, der Reparatur und dem Wachstum von Nervenzellen (Mahley, 1988). Die Identifikation von Apolipoprotein (Apo) E4 als robusten Risikofaktor für die Alzheimer Krankheit, gab den ersten Hinweis auf eine mögliche Beteiligung von Cholesteroll am Krankheitsgeschehen (Saunders, 1993).

Vor einigen Jahren deuteten viele Evidenzen auf eine direkte Beteiligung von membrangebundenem Cholesteroll bei der Pathogenese der Alzheimer Krankheit hin. Cholesteroll moduliert die Spaltung des Amyloid-Vorläufer-Proteins (Bodovitz, 1996; Galbete, 2000) und beeinflusst die zelluläre Produktion von A β (Frears, 1999; Simons, 1998). Auf der anderen Seite zeigen unter anderem eigene Daten, dass Cholesteroll vor den neurotoxischen und Membran-stabilisierenden Eigenschaften von A β schützt (Eckert, 2000; Hartmann, 1994; Zhou, 1996). Weiterhin beeinflusst A β selbst die zelluläre Cholesterollhomöostase und moduliert die Synthese und die Verteilung des Steroids in neuronalen Zellen in Kultur und in fetalem Rattenhirn (Koudinova, 2000).

Aus den dargestellten Zusammenhängen wird das Interesse an pharmakologischen Strategien deutlich, um die zentrale Cholesterollhomöostase zu beeinflussen. Die hier dargestellten Untersuchungen repräsentieren die erste Arbeit, die sich gezielt mit pharmakologischen Effekten im Gehirn auseinandersetzt. Bis dato existierten zwar Berichte über zentrale, unerwünschte Wirkungen von Lovastatin aber keine systematischen präklinischen Untersuchungen hierzu (Saheki, 1994).

Da das Alter der Hauptrisikofaktor für die Alzheimer Krankheit ist, wurden Mäuse unterschiedlichen Alters untersucht: Einen Monat alte Mäuse, die sich gerade am Ende der Ausreifungsphase des Gehirns befinden, und 12 Monate alte Mäuse mit beginnenden Hirnalterungsprozessen. Um den Einfluss von Apo E auf die Pharmakologie von Lovastatin im Gehirn zu erfassen, wurden weiterhin Apo E-knock out-Mäuse eingesetzt. Die Gehirne dieser Mäuse zeigen Analogien zu post mortem Befunden von Alzheimer Patienten. So sind die Apo E Spiegel im Gehirn von Alzheimer Patienten deutlich erniedrigt (Masliah, 1995), was mit der Anzahl der E4 Allele korreliert.

Die wichtigsten Resultate im Überblick (Eckert, 2001a):

- Obwohl sich eine Tendenz zu höheren Cholesterollwerten bei älteren Mäusen erkennen lässt, ändern sich die Cholesterollspiegel im Serum von Mäusen mit dem Lebensalter nicht signifikant.

- Im Vergleich zu 12 Monate alten Mäusen haben Apo E-knock-out-Mäuse fast fünf-fach erhöhte Cholesterolverwerte im Serum.
- Die chronische Verabreichung von Lovastatin hat weder bei jungen, mittelalten, noch bei Apo E-knock-out-Mäusen einen Einfluss auf die Cholesterolspiegel im Serum.
- Obwohl die Cholesterol-Serumkonzentration bei Apo E-knock-out-Mäusen fast fünf-fach erhöht ist, befinden sich die Cholesterolkonzentrationen in Gehirnmembranen beider Mäusearten auf dem gleichen Niveau.
- Eine 21-tägige orale Gabe von 100mg/kg KG Lovastatin senkt signifikant die Cholesterolkonzentration in neuronalen Membranen von jungen und mittelalten Mäusen um ca. 30%.
- Die Lovastatin-induzierte Reduktion der Cholesterolkonzentration führte sowohl bei jungen als auch bei mittelalten Tieren zu einer Fluidisierung der neuronalen Membranen.
- Im Gegensatz dazu hat Lovastatin keinen Effekt bei Apo E-knock-out-Mäusen: Die Cholesterolkonzentrationen in isolierten Membranen bleiben unverändert.
- Die aus dem Gehirn von Apo E-knock-out-Mäusen isolierten neuronalen Membranen zeigten keine Veränderung der Fluidität durch Lovastatin.

Unsere Ergebnisse zeigen klar, dass die Behandlung von 1- bzw. 12-Monate alten Mäusen mit dem HMG-CoA-Reduktase-Hemmer Lovastatin den Gehalt von Cholesterol in neuronalen Membranen um ca. 30% senkt. Dies deutet auf eine recht starke Hemmung der de novo Synthese von Cholesterol im Gehirn hin. Die peripheren Cholesterolspiegel im Serum und der Leber werden dabei in Übereinstimmung mit der Literatur nicht beeinflusst (Krause, 1995).

Wir konnten Vorbefunde bestätigen, dass Apo E-knock-out-Mäuse dramatisch erhöhte Serumcholesterolverwerte aufweisen (Plump, 1995) und das bei unveränderten Cholesterolverwerten im Gehirn (Lomnitski, 1999). Interessanterweise konnten wir erstmals zeigen, dass Lovastatin keine Effekte auf den Cholesterolgehalt neuronaler Membranen aus dem Gehirn von Apo E-knock-out-Mäusen hat. Dieses Ergebnis legt die Schlussfolgerung nahe, dass Apo E als wichtigstes Cholesterol-Transportmolekül im Gehirn (Rothblat, 1992), für die pharmakologische Wirkung von Statinen im Gehirn essentiell ist. Möglicherweise weisen Apo E-knock-out-Mäuse eine erniedrigte Cholesterolumsatzrate im Gehirn auf, was künftige Untersuchungen zeigen müssen.

4.1.2. Einfluss des Apolipoprotein-Genotyps auf den Cholesterolgehalt von neuronalen Membranen und den Metabolismus von APP

In einer Reihe von Untersuchungen zur Prävention oder Therapie von AD zeigte der Einsatz von α -Tocopherol (α Toc) positive Effekte (Morris, 2002; Sano, 1997). α Toc repräsentiert ein lipophiles Antioxidans, das zur Vitamin E-Familie gehört. In anderen Studien allerdings konnte mit α Toc nicht den klinischen Symptomen der AD entgegengewirkt werden (Kang, 2006; Petersen, 2005). Wie schon weiter oben ausgeführt, ist der Apo E4-Genotyp stark mit AD verlinkt, allerdings sind die Mechanismen, die zu einer Erhöhung des Krankheitsrisikos führen, noch nicht vollständig verstanden (Mahley, 2006). Neben den Effekten auf die Bildung von A β und auf Reparaturmechanismen wird auch eine, in der Reihe Apo E4>E3>E2 abnehmende, antioxidative Kapazität diskutiert (Mahley, 2006; Miyata, 1996). Um die Effekte von α Toc auf frühe krankheitsrelevante Ereignisse im Gehirn der Tiere zu untersuchen haben wir in der aktuellen Studie ein transgenes Apo E-Mausmodell verwendet. Hierzu

wurde in unterschiedlichen Regionen des Gehirns untersucht, ob der Apo E-Genotyp oder die Gabe von α Toc einen Effekt auf die Fluidität neuronaler Membranen und die APP-Prozessierung haben. Weiterhin wurde die transkriptionelle Regulation von Alzheimer-relevanten Genen untersucht.

Die wichtigsten Resultate im Überblick (Huebbe, 2007):

- Der Apo E-Genotyp hatte keinen Einfluss auf den Cholesterolgehalt oder die Fluidität neuronaler Membranen.
- Die Fütterung einer α Toc-reichen Kost führte unabhängig vom Genotyp zu deutlich erhöhten α Toc-Spiegeln im Gehirn von transgenen Apo E-Mäusen.
- Die Fütterung von hohen Dosen α Toc hatte keinen Einfluss auf den Cholesterolgehalt oder die Fluidität neuronaler Membranen aus dem Gehirn von transgenen Apo E3- und Apo E4-Mäusen.
- PCR Untersuchungen zeigten, dass die Gehalte der α -Sekretase ADAM10 in Gehirnen von transgenen Apo E3-Mäusen unabhängig vom α Toc-Status signifikant erhöht sind.
- Gleichzeitig weisen Gehirne von transgenen Apo E3-Mäusen eine signifikant erhöhte Aktivität der APP-spaltenden α -Sekretase auf, die Aktivitäten von β - und γ -Sekretase waren unverändert.
- Die Behandlung von transgenen Apo E-Mäusen mit α Toc hatte keinen Einfluss auf die Aktivität der getesteten Sekretasen.
- Die transkriptionale Expression der Zellzyklus-regulierenden Proteine Cyclin-A2, -B1, -D1 und p19ARF wird durch den Apo E-Genotyp und durch α Toc beeinflusst.

Der Apo E4-Genotyp ist mit einem erhöhten Risiko für die Alzheimer Demenz assoziiert (Corder, 1993). Allerdings sind die zu Grunde liegenden Mechanismen noch unbekannt. Die hier diskutierte Arbeit trägt zum Verständnis der Ätiologie der Apo E-Genotyp assoziierten AD hinsichtlich des APP-Metabolismus und der Zellzyklus-Regulation bei. Der Apo E4-Genotyp geht mit erhöhten Plasmacholesterolspiegeln (Sing, 1985) und einem gestörten neuronalen Cholesterolefflux einher (Lane, 2005). Die amyloidogene Prozessierung von APP findet hauptsächlich in Cholesterol-reichen Domänen biologischer Membranen, den Lipid rafts statt (Simons, 1997), deren Ausmaß von der membranären Cholesterolkonzentration abhängt (Simons, 1998). In der vorliegenden Arbeit wurde allerdings der Gehalt an unverestertem Cholesterol und die Fluidität von neuronalen Membranen nicht vom Apo E-Genotyp oder dem Gehalt von α Toc in der Diät abhängig gemacht.

Allerdings weisen unsere Daten auf eine Beeinflussung der APP-Prozessierung auf der Transkriptionsebene hin. Die mRNA-Konzentration der α -Sekretase ADAM10 war in Apo E4- im Vergleich zu Apo E3-Tieren signifikant erniedrigt. In Übereinstimmung war die kortikale α -Sekretase-Aktivität in Apo E4-Tieren niedriger. Weder der Apo E-Genotyp, noch die Vitamin E-Fütterung hatten einen Einfluss auf den mRNA-Gehalt der β -Sekretase BACE-1 oder der Aktivität der β - und γ -Sekretase. Somit tragen möglicherweise die erniedrigten α -Sekretase-mRNA-Spiegel zur erhöhten amyloidogenen Prozessierung von APP bei, die in transgenen Apo E4-APPV717F-Mäusen beobachtet wurde (Holtzman, 2000). Da berichtet wurde, dass die Apo E-Proteinkonzentration im Hippokampus und im Kortex von Apo E3- und Apo E4-Mäusen variiert (Ramaswamy, 2005), kann nicht ausgeschlossen werden, dass die festgestellten Unterschiede in der α -Sekretaseaktivität auf unterschiedliche Expressionsniveaus zurückzuführen sind.

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von Studien publiziert, die im Rahmen der AD über eine abnormale Expression von Proteinen der Zellzyklus-Regulation berichteten (McShea, 2007; Nagy, 1997). Allerdings fokussierten sich diese Untersuchungen auf den Zellzyklus von post-mitotischen Neuronen. Diese Fragestellung wurde bisher noch nicht in Gliazellen untersucht. Weiterhin repräsentieren unsere Experimente die erste Untersuchung hinsichtlich des Einflusses des Apo E-Genotyps und der Supplementierung mit α -Toc. Hierzu haben wir die Expression unterschiedlicher Zellzyklus-Proteine (Zykline) im Hippokampus untersucht, einer Gehirnregion, die bei der AD besonders betroffen ist. Da die Expression von Zyklinen stark transkriptionell reguliert ist, wurden die relativen mRNA-Konzentrationen bestimmt.

Basierend auf der festgestellten, niedrigeren Expression der Zykline D, A und B, relativ zu Apo E3-Mäusen, postulieren wir, dass der hippokampale Zellzyklus möglicherweise behindert ist oder die Zahl der proliferierenden Zellen in Apo E4-Mäusen reduziert ist. Im ausgewachsenen Gehirn ist es primär Astrozyten möglich zu proliferieren, während terminal differenzierte Neurone post-mitotisch bleiben. Daraus schließen wir, dass die reduzierte Anzahl an proliferierenden Zellen in Apo E4-Mäusen möglicherweise mit einer Veränderung des Verhältnisses von Gliazellen zu Neuronen einhergeht.

Die mRNA-Konzentration von Zyklin A und B, Proteinen der S- und G2-Phase (DNA-Synthese und Vorbereitung der Mitose) war niedriger in Gehirnen von Apo E3-Mäusen, die eine α -Toc arme Diät erhielten. Andererseits war in Apo E4-Mäusen eine α -Toc arme Diät mit höheren Zyklin A- und B- Spiegeln assoziiert. Dies deutet darauf hin, dass der Zellzyklus in Apo E3- und Apo E4-Mäusen unterschiedlich reguliert ist.

Ein essentieller Regulator des Zellzyklus stellt das Protein p53 dar. Die Akkumulation und Aktivierung von p53 führt zu einer erhöhten Expression von zahlreichen nachgeschalteten Proteinen, die den Zellzyklus unterdrücken, wie zum Beispiel p21 (Prives, 1998). In Tieren, die viel oder wenig α -Toc erhielten, war die Konzentration an p53 im Kortex nicht verändert. Leider konnte p53 nicht im Hippokampus bestimmt werden. Im Kortex variierten auch die mRNA-Konzentration an p21 nicht. Allerdings wurde durch die α Toc Fütterung in Apo E4-Tieren der Gehalt des Kandidatengens p19ARF signifikant erhöht. Der „alternate reading frame“ (ARF) befindet sich innerhalb der Sequenz des p16INK4a Gens (Quelle, 1995). Daraus folgt, dass die höhere p19ARF-Expression möglicherweise zu einem Stopp des Zellzyklus und erniedrigter Zyklinexpression in Apo E4-Mäusen beiträgt.

Unsere Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass der Zellzyklus in Apo E3- und Apo E4-Mäusen unterschiedlich reguliert ist und sich die Anzahl proliferierender Zellen Genotyp-abhängig ändert. Dies könnte einen entscheidenden Beitrag zum Apo E-abhängigen Demenzrisiko leisten. Allerdings müssen künftige Untersuchungen auf Protein- und Enzymaktivitätsebene die Rolle von Zyklinen weiter vertiefen.

4.1.3. Altersabhängig veränderte Protein- und Lipidkomposition von synaptosomalen Lipid rafts der Maus - Einfluss von humanem Apo E

Wie schon weiter oben ausgeführt, stellt Apo E das wichtigste Lipoprotein im Gehirn und somit das wichtigste Transportmolekül für Cholesterol im Zentralnervensystem dar (Fagan, 2000; Mahley, 1988). Dabei ist Apo E am Transport, der Verteilung und anderen Aspekten der zentralen Cholesterolhomöostase beteiligt (Miyata, 1996). Apo E spielt auch eine dominante Rolle für die Mobilisierung und Umverteilung von Lipiden im Gehirn, vor allem beim Erhalt, der Reparatur und dem Wachstum von Nervenzellen

(Miyata, 1996). Die Expression unterschiedlicher Isoformen von Apo E führt zu spezifischen Variationen, etwa bei der Freisetzung von Lipoproteinen durch Astrozyten, dem neuronalen Wachstum, der Plastizität, bei oxidativen Insulten, der transmembranären Cholesterolverteilung oder bei der Interaktion mit A β (zusammengefasst in (Fagan, 2000)). Daten deuten darauf hin, dass sich die A β -induzierte Zytotoxizität durch Apo E isoform-spezifisch in der Reihe Apo E2 > E3 > E4 vermindern lässt (Ma, 1996b; Miyata, 1996). Apo E2 schützt Zellen vor toxischen Effekten von A β , während Apo E3 ohne Effekt und Apo E4 selbst sogar toxisch ist (Jordan, 1998). In Mäusen, die humanes APP und Apo E exprimieren, verzögert Apo E3 synaptische Defizite, verglichen mit Mäusen, die Apo E4 bilden (Buttini, 2002). Weiterhin verzögert Apo E4 das neuronale Wachstum in kultivierten murinen Neuronen, ein Prozess, der durch Apo E3 gefördert wird (Nathan, 2002). Ähnliche Befunde liefern Untersuchungen an hippokampalen Schnitten von Mäusen, die entweder Apo E3 oder Apo E4 exprimieren (Teter, 2002).

Die Apo E-Isoformen zeigen nach Aufnahme in die Zelle über den LRP-Rezeptor ein divergentes Verteilungsmuster innerhalb von Neuronen. Während Apo E3 nur wenig im späten Endosom lokalisiert ist, finden sich in diesem Kompartiment große Mengen an Apo E4 (DeKroon, 2001). Dieser Unterschied könnte für eine Beeinflussung der intrazellulären Lipidhomöostase und besonders für die Verteilung von Cholesterol, vor allem in den Lipid rafts verantwortlich sein.

Im Gegensatz zu Astrozyten, die humanes Apo E4 exprimieren, setzen jene die die Isoform Apo E3 exprimieren, mehr Cholesterol frei (Gong, 2002). Allerdings berichtet eine andere Studie, dass aus dem Gehirn von Mäusen isolierte Astrozyten, welche Apo E3 oder Apo E4 exprimieren, sich nicht in ihrer Lipidzusammensetzung unterscheiden (Fagan, 1999). Auf der anderen Seite wird neuronales Wachstum durch Astrozyten aus Mäusen, die humanes Apo E3 anstelle von Apo E4 exprimieren signifikant besser gefördert (Sun, 1998).

Die transmembranäre Verteilung von Cholesterol in synaptosomalen Plasmamembranen (SPM) unterscheidet sich in Mäusen je nach Expression von humanem Apo E3 oder Apo E4 (Hayashi, 2002). Obwohl die Gesamtmenge an Cholesterol in SPM von Apo E4- und Apo E3-Mäusen unverändert ist, findet sich im exofazialen Blatt von SPM aus dem Gehirn von Apo E3-Mäusen signifikant mehr Cholesterol. Interessanterweise entspricht diese Verteilung dem Bild bei SPM von alten oder Apo E-knock-out-Mäusen (Igbavboa, 1997; Igbavboa, 1996). Unterschiede in der transmembranären Verteilung von Cholesterol beeinflussen die Fluidität der Membranblätter, die Aktivität von membrangebundenen Proteinen und den zellulären Cholesteroltransport (zusammengefasst in (Schroeder, 2001).

Das exofaziale und zytofaziale Membranblatt unterteilen die Membrandoppelschicht in zwei große Subdomänen. Kleinere Domänen innerhalb der Membran stellen Lipid rafts dar. Lipid rafts sind reich an Cholesterol und Sphingomyelin und beherbergen Glykosylphosphatidylinositol-(GPI)-verankerte Proteine (Fielding, 2003). Es wird angenommen, dass Lipid rafts vornehmlich im exofazialen Membranblatt lokalisiert sind (Simons, 2000a). Gleichzeitig existieren aber auch Hinweise, dass Lipid rafts auch im zytofazialen Blatt der Membrandoppelschicht vorkommen (Brown, 2000). Funktionell sind Lipid rafts am Lipid- und Proteintransport, an der Regulierung der Aktivität von Enzymen und an Zellsignalwegen beteiligt (Brown, 2000). Änderungen der zellulären Cholesterol- und Sphingomyelingehalte können den Gehalt an Proteinen und die chemische Zusammensetzung von Lipid rafts beeinflussen (Schroeder, 2001). Der aktuellen Untersuchung lag die Annahme zu Grunde, dass die chemische Zusammensetzung von Lipid rafts vom Alter und dem Apo E-Genotyp beeinflusst

werden. Es wurden daher synaptosomale Lipid rafts aus dem Gehirn von jungen, mittelalten und alten Mäusen isoliert, die humanes Apo E3 oder Apo E4 exprimierten. Es wurden Lipid raft Marker wie die alkalische Phosphatase, Flotillin-1, Sphingomyelin und Cholesterol bestimmt.

Die wichtigsten Resultate im Überblick (Igbavboa, 2005):

- Mit einer von uns etablierten und publizierten Methode (Eckert, 2003) konnten erfolgreich Lipid rafts aus dem Gehirn von unterschiedlich alten Mäusen, die humanes Apo E exprimieren, isoliert werden.
- Lipid rafts aus dem Gehirn von jungen Apo E4-Mäusen ähnelten den von alten Apo E3-Mäusen bezüglich einer Reduktion der alkalischen Phosphatase Aktivität (APA) und dem Gehalt an Flotillin-1
- Die Cholesterolgehalte von Lipid rafts nahmen in beiden untersuchten Mausmodellen mit dem Lebensalter zu, ein Unterschied bezüglich des Apo E-Genotyps bestand nicht.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die beiden Risikofaktoren für AD, zunehmendes Alter und Apo E4 – Genotyp, einen ähnlichen Effekt auf die Komposition von Lipid rafts haben und unterstützen die These, dass die transmembranäre Cholesterolverteilung von SPM assoziiert ist mit Veränderungen von Lipid rafts.

Es wurde im Zusammenhang mit der Bildung und Aggregation von A β insbesondere diskutiert, dass Lipid rafts eine Rolle bei der Entstehung der Alzheimer Krankheit spielen (Cordy, 2003; Eehalt, 2003; Kakio, 2001; Tun, 2002). Zunehmendes Alter und der Genotyp für Apo E4 stellen solide Risikofaktoren für die AD dar. Unsere Untersuchungen zeigen erstmals altersabhängige Veränderungen von Lipid rafts aus dem Gehirn und den Einfluss des Apo E Genotyps auf.

Unsere Flotationsexperimente zeigten, dass die Trübung bei einer Absorption von 620 nm und die alkalische Phosphatase (AP)-Aktivität in Fraktion 5, einer Zone geringer Dichte im Gradienten , am stärksten ausgeprägt ist, was in Übereinstimmung mit vorausgegangenen Studien in neuronalem und nicht-neuronalem Gewebe steht (Broquet, 2003; Eckert, 2003; Hooper, 1999; Parkin, 1999). Beide charakteristischen Merkmale unterscheiden sich in den untersuchten Gruppen nicht, was den Schluss zulässt, dass die gewonnen Lipid rafts in allen Gruppen qualitativ ähnlich waren.

Es ist bekannt, dass die AP-Aktivität in Lipid rafts am stärksten ist (Hooper, 1999), was in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen steht. Sowohl zunehmendes Alter als auch der Apo E-Genotyp waren mit einem Anstieg der AP-Aktivität assoziiert. Lipid rafts aus dem Gehirn von jungen Apo E3-Mäusen hatten die höchste AP-Aktivität die im Vergleich zu den anderen untersuchten Gruppen mit zunehmenden Alter abnahm. Passend hierzu berichtet eine aktuelle Arbeit, dass die AP-Aktivität im Gehirnhomogenat von 19 Monate alten Swiss Albino Mäusen geringer ist, als im Gehirnhomogenat von 6-8 Wochen alten Mäusen (Manda, 2003). AP findet sich fast in allen Geweben, allerdings ist die physiologische Rolle des Enzyms noch nicht völlig bekannt (Mueller, 2000). Es existieren Evidenzen, dass AP eine Rolle beim Transport von anorganischen Orthophosphaten und der Mineralisierung von Knochen spielt. Auch werden dem Enzym Funktionen als Tyrosin-spezifische Phosphoprotein-Phosphatase und der Aufrechterhaltung der zellulären Permeabilität zugesprochen (Manda, 2003; Mueller, 2000).

Flotillin kommt vermehrt in Lipid rafts vor (Bickel, 1997). Flotillin besteht aus zwei Isoformen, wobei in der aktuellen Studie ein Antikörper gegen Flotillin-1 benutzt

wurde. Das Auftreten von Flotillin ist in Lipid rafts aus dem Gehirn von jungen Apo E3-Mäusen am größten, verglichen mit allen anderen Gruppen. Lipid rafts aus dem Gehirn von Apo E4-Mäusen zeigen generell eine um 40% verminderte Flotillinkonzentration gegenüber Apo E3-Mäusen auf. Lipid rafts aus dem Gehirn von alten Apo E4-Mäusen weisen den niedrigsten Gehalt an Flotillin auf. Die physiologischen Funktionen von Flotillin sind bis heute nicht vollständig bekannt. Es existieren aber Hinweise, dass das Protein eine Rolle bei der Regeneration von Neuronen spielt. Flotillinproteine wurden ursprünglich in retinalen Ganglionzellen des Goldfisches während der axonalen Regeneration nachgewiesen und als Reggie-1 und Reggie-2 bezeichnet (Schulte, 1997).

Lipid rafts sind in Neuronen möglicherweise an regenerativen Prozessen beteiligt. Die Entdeckung, dass junge Apo E3-Mäuse im Vergleich zu alten Apo E3-Mäusen und generell zu Apo E4-Mäusen höhere Flotillin-Gehalte aufweisen, könnte auf eine protektive Funktion des Proteins hinweisen. Allerdings wurde im Gehirngewebe von Alzheimer Patienten mit steigender A β Ablagerung und vermehrter Bildung neurofibrillärer Bündel, eine Akkumulation von Flotillin gefunden (Girardot, 2003; Simons, 1997). Ob das verstärkte Auftreten von Flotillin die Folge von Reparaturprozessen nach neuronalen Insulten darstellt oder selbst zur Pathophysiologie beiträgt, ist unbekannt.

Sphingomyelin ist eines der in Lipid rafts am häufigsten auftretenden Glykosphingolipide (Hooper, 1999). Veränderungen der Sphingomyelinkonzentration modifizieren die Struktur und Funktion von Lipid rafts (Rao, 1993; van der Luit, 2002). In unserer Untersuchung differieren die Sphingomyelingegehalte in den Altersgruppen der Apo E3-Mäuse nicht. Eine frühere Studie berichtete, dass sich die Sphingomyelingegehalte von striatalen Synaptosomen aus dem Gehirn unterschiedlich alter Ratten nicht unterscheiden (Kelly, 1995). Andererseits finden sich im Gehirnhomogenat alter Ratten höhere Sphingomyelinkonzentrationen als im Gehirnhomogenat junger Ratten (Delion, 1997; Giusto, 1992). Interessanterweise fanden wir in der aktuellen Studie heraus, dass der Gehalt an Sphingomyelin in synaptosomalen Lipid rafts von jungen im Vergleich zu alten Apo E4-Mäusen signifikant höher ist.

Es ist bekannt, dass Cholesterol in Lipid rafts angereichert ist (Hooper, 1999). In der aktuellen Studie konnten wir zeigen, dass die Cholesterolgehalte in Lipid rafts mit dem Lebensalter assoziiert sind, aber nicht mit dem Apo E-Genotyp. In Übereinstimmung mit unseren Befunden wurde berichtet, dass Lipid rafts aus T-Zellen von alten Menschen im Vergleich zu jungen Menschen einen höheren Cholesterolgehalt aufweisen (Fulop, 2002).

Es wird propagiert, dass Lipid rafts im exofazialen Blatt der Plasmamembran lokalisiert sind (Simons, 2000a), obwohl ein Auftreten auch im zytofazialen Blatt für wahrscheinlich gehalten wird (Brown, 2000). Unterschiede in der transmembranären Verteilung von Cholesterol wurden in SPM von jungen und alten Mäusen, aber auch von Apo E3- versus Apo E4-Mäusen gefunden (Hayashi, 2002; Igbavboa, 1996). Sowohl alte als auch Apo E4-Mäuse wiesen im Vergleich mehr Cholesterol im exofazialen Membranblatt auf, als junge bzw. Apo E3-Mäuse. Veränderungen in der transmembranären Cholesterolverteilung, wie sie in Apo E4 und auch in alten Mäusen gesehen werden, beeinflussen möglicherweise die Insertation von Proteinen in Lipid rafts, was unsere aktuellen Beobachtungen erklären könnte. Allerdings könnten die beobachteten Veränderungen auch Cholesterol-unabhängig sein. So ist bekannt, dass die Aktivität des γ -Sekretasekomplexes, der zum Großteil mit Lipid rafts assoziiert ist, unabhängig von der Cholesterolkonzentration ist (Wada, 2003). Die Bestimmung der Aktivität des γ -Sekretasekomplexes basierte auf der A β -Bildung, welche sich selbst nach

einer Cyclodextrinbehandlung nicht änderte (Reduktion des Cholesterols in den Lipid rafts).

Die meisten Untersuchungen zeigen, dass die Expression des Apo E4-Genotypes mit spezifischen Einschränkungen zellulärer Funktionen einhergeht (Fagan, 2000), was auch für die von uns beobachteten Variationen der AP-Aktivitäten und dem Auftreten von Flotillin-1 zutrifft.

4.1.4. Statine beeinflussen Cholesterol-Mikrodomänen in synaptosomalen Plasmamembranen

Die intrazelluläre Cholesterolhomöostase wird durch unterschiedliche Mechanismen stringent reguliert (Cardenas-Vazquez, 1999; Liscum, 1999). Die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase, wie auch die der Acyl-CoA:cholesterol Acyltransferase (ACAT) stehen unter strenger metabolischer Kontrolle von zellulären Rückkopplungsmechanismen (Liscum, 1999; Simons, 2000a). Andere, weitgehend noch unbekannte Mechanismen, bestimmten die heterogene Verteilung von Cholesterol und seiner Derivate innerhalb der Zelle (Schroeder, 1995; Wood, 1999). Es wird angenommen, dass die externe Beeinflussung dieses Gleichgewichts durch Statine metabolische Veränderungen in diesem System induziert, welche die pharmakologischen Wirkungen der HMG-CoA-Reduktase-Hemmer mitbestimmen und möglicherweise Cholesterol-unabhängige Signalkaskaden einbeziehen (Bellosta, 2000; Corsini, 1996; Takemoto, 2001). Die mögliche Relevanz solcher sekundärer Effekte wird durch Befunde von Runz et al. unterstrichen, die zeigen konnten, dass die subzelluläre Cholesterolverteilung die Lokalisation von Presenilin und die zelluläre Produktion von A β beeinflusst (Runz, 2002). Darüberhinaus wurde gezeigt, dass A β selbst Einfluss auf die zelluläre Lokalisation von Cholesterol und auf seine Veresterungsrate nimmt (Liu, 1998). Dazu passend wurde berichtet, dass in CHO Zellen die intrazelluläre ACAT-Aktivität und der Gehalt an Cholesterolestern direkt mit der Bildung von A β korreliert (Puglielli, 2001).

Die hier beschriebene Arbeit knüpft an unsere Untersuchungen zu den Effekten von Lovastatin auf die zentrale Cholesterolhomöostase an, in denen wir zeigen konnten, dass die sub-chronische Behandlung von Mäusen mit lipophilem Lovastatin zu einer signifikanten Reduktion von Cholesterol in Membranen aus dem Gehirn der behandelten Mäuse führte (Eckert, 2001a). Ähnliche Effekte können für das ebenfalls lipophile Simvastatin angenommen werden. So führte eine Hochdosisbehandlung zu einer signifikanten Reduktion der 24-OH-Cholesterol-Spiegel im Plasma von Patienten mit Hypercholesterolemie (Locatelli, 2002). Bei 24-OH-Cholesterol (Cerebrosterol) handelt es sich um einen Cholesterolmetaboliten, der soweit bekannt, ausschließlich im Gehirn gebildet wird (Bjorkhem, 1998). Um diese Ergebnisse weiter zu vertiefen, wurden Mäuse mit den lipophilen Wirkstoffen Lova- und Simvastatin, sowie dem hydrophilen Pravastatin behandelt. Unsere Untersuchungen fokussierten sich auf die Fähigkeit der Statine, die Verteilung von Cholesterol in synaptosomalen Membranen zu beeinflussen. Das exofaziale und zytofaziale Membranblatt unterteilen die Membrandoppelschicht in zwei große Subdomänen. Die Verteilung von Cholesterol zwischen beiden Subdomänen ist heterogen, das zytofaziale Membranblatt enthält etwa 80% des membranären Cholesterols. Mit zunehmendem Alter lässt sich eine deutliche Zunahme des Cholesterolgehaltes im exofazialen Membranblatt nachweisen (Igbavboa, 1996). Auch die Expression von Apo E beeinflusst die Cholesterolverteilung in synaptosomalen Membranen (Hayashi, 2002). Änderungen in der Verteilung von Cholesterol zwischen den Membranblättern haben möglicherweise einen Einfluss auf die neuropathologischen Vorgänge im Rahmen der Entstehung der Alzheimer Krankheit.

In vorangegangenen Arbeiten konnten wir zeigen, dass die Lovastatin-induzierte Cholesterolabnahme in synaptosomalen Membranen, die Beweglichkeit von Alkylketten der Membranphospholipide nicht beeinflusst (Eckert, 2001a). Durch Detektion der Beweglichkeit von Pyren innerhalb der Membran, wurde in der hier diskutierten Arbeit, zusätzlich die sogenannte „Bulk-Fluidität“ erfasst, die die Gesamtbeweglichkeit der Membran widerspiegelt.

Die wichtigsten Resultate im Überblick (Kirsch, 2003b):

- Synaptosomale Plasmamembranen (SPM) aus dem Gehirn von 3 Monate alten Mäusen weisen eine heterogene Cholesterolverteilung zwischen der Membrandoppelschicht auf; 72% des Membran-gebundenen Cholesterols befindet sich im zytofazialen und 18% im exofazialen Membranblatt.
- Die Beweglichkeit alkylierter Phospholipidketten in den beiden Membranblätter unterscheidet sich signifikant; die Membranfluidität, gemessen als DPH-Anisotropie ist im zytofazialen Membranblatt deutlich erniedrigt.
- Der hydrophile Wirkstoff Pravastatin hat keinen Einfluss auf den Cholesterolgehalt von SPM.
- Die lipophilen Wirkstoffe Lovastatin und Simvastatin senken deutlich die Gehalte an unverestertem Cholesterol in den SPM.
- Der Einfluss von Lova- und Simvastatin auf die Cholesterolgehalte in SPM beziehen sich auf eine signifikante Reduktion des Cholesterols im zytofazialen Membranblatt. Das zytofaziale Membranblatt wird durch Pravastatin nicht beeinflusst.
- Die Behandlung von Mäusen mit Lovastatin bzw. Pravastatin führt zu einer kleinen aber signifikanten Reduktion des Cholesterolgehaltes im exofazialen Membranblatt. Das exofaziale Membranblatt wird durch Simvastatin nicht beeinflusst.
- Lovastatin und Pravastatin erhöhen die Gesamtbeweglichkeit der Membran („Bulk-Fluidität“). Simvastatin beeinflusst die Membran „Bulk-Fluidität“ nicht.
- Die Beweglichkeit der alkylierten Phospholipidketten in der Membrandoppelschicht, gemessen als DPH-Anisotropie, wird durch die Statine nicht beeinflusst.
- Lovastatin und Simvastatin senken das Lipid raft Markerprotein Flotillin-1.
- In vitro lässt sich der Cholesterolgehalt von SPM durch Methyl-Beta-Cyclodextrin (MbetaCD) bzw. durch Cholesterol-MbetaCD-Einschlusskomplexe manipulieren.
- Die externe Manipulation von SPM in vitro beschränkt sich hauptsächlich auf das exofaziale Membranblatt.

Die hier vorgestellten Daten repräsentieren die ersten Befunde zu den pharmakologischen Effekten von Lovastatin, Simvastatin und Pravastatin auf die Cholesterolhomöostase in isolierten synaptosomalen Plasmamembranen im Gehirn. In Übereinstimmung mit unseren Vorbefunden (Eckert, 2001a) senken die lipophilen Vertreter Lova- und Simvastatin die Spiegel an unverestertem Cholesterol im Gehirnhomogenat der behandelten Mäuse. Interessanterweise waren bei allen drei Behandlungsgruppen die Gesamt-Cholesterolgehalte in den SPM unverändert. Dementsprechend fand sich bei Lova- und Simvastatin behandelten Mäusen eine Zunahme des veresterten Cholesterols in den SPM. Unsere Daten implizieren, dass Lovastatin und Simvastatin freies Cholesterol der Plasmamembran in den Pool an veresterten Cholesterol transferieren. Dies geschieht womöglich über einen Wiederverwertungsweg über das endoplasmatische Retikulum (Liscum, 1999).

Weiterhin deuten die Daten darauf hin, dass der Nettoaustausch von Cholesterin über die Plasmamembran durch die Behandlung mit Statinen unverändert ist und Cholesterin und seine Ester in einem Gleichgewicht stehen (Liscum, 1999; Simons, 2000a). Für Simvastatin und Pravastatin wurde an Makrophagen gezeigt, dass beide die Veresterung von Cholesterin unterschiedlich beeinflussen (Bernini, 1993).

Zahlreiche Befunde deuten darauf hin, dass die exzessive Bildung von A β im Gehirn von AD Patienten möglicherweise eher mit Störungen der subzellulären Cholesterinverteilung, als mit Veränderungen der Gesamtcholesterinspiegel verbunden ist (Runz, 2002; Wood, 2003; Yamazaki, 2000). Dementsprechend lassen sich keine Veränderungen der Gesamtcholesterinspiegel in Membranen aus unterschiedlichen Regionen von post-mortalen Gehirnen von Alzheimer Patienten feststellen (Eckert, 2000; Mason, 1992; Svennerholm, 1994). Die mögliche Relevanz einer intramembranären Kompartimentierung von Cholesterin in SPM von AD Patienten wird durch Befunde unterstrichen, dass sich im exofazialen Membranblatt von SPM aus dem Gehirn von transgenen Apo E4-Mäusen signifikant höhere Spiegel an unverestertem Cholesterin messen lassen (Hayashi, 2002). Vergleichbare Befunde lassen sich an Mäusen erheben, denen das Apo E-Gen fehlt (Igbavboa, 1997). Apo E4 repräsentiert, wie schon weiter oben ausgeführt, einen robusten Risikofaktor für AD.

Alle drei untersuchten Statine beeinflussten die transmembranäre Verteilung von Cholesterin, wenn auch in unterschiedlicher Weise. Während das hydrophile Pravastatin lediglich das exofaziale Membranblatt beeinflusst, modulieren die lipophilen Wirkstoffe Lovastatin und Simvastatin auch das zytofaziale Membranblatt. Ob der letztgenannte Effekt mit einer Beeinflussung der Veresterungsrate von Cholesterin einhergeht ist unbekannt. Wie wir in anderen Untersuchungen zeigen konnten, erreichen alle untersuchten Statine das Gehirn (Johnson-Anuna, 2005). Dabei liegen die erreichten Konzentrationen über der, für die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase, notwendigen Konzentration (IC₅₀). Allerdings sind die Mengen der lipophilen Wirkstoffe Lova- und Simvastatin, die die Blut-Hirn-Schranke durchdringen, bedeutend größer im Vergleich zu dem hydrophilen Pravastatin (Johnson-Anuna, 2005). Neben einer direkten pharmakologischen Beeinflussung der zentralen Cholesterin-Homöostase, kommen auch indirekte Effekte in Betracht. So kann man spekulieren, dass die zentralen Effekte der Statine auch über Effekte an den Gefäßen der Blut-Hirn-Schranke vermittelt werden (Bellosa, 2000; Corsini, 1996; Endres, 1998). So kommt eine Cholesterin-unabhängige Hochregulation der endothelialen NO-Synthase in Betracht. Diese Hypothese wird durch die Tatsache bestärkt, dass die Alzheimer Krankheit oft mit einer vaskulären Pathologie verbunden ist. Vaskuläre und Alzheimer Demenz weisen zum Teil gleiche Risikofaktoren auf (Kalaria, 1999; Kivipelto, 2002). Statine beeinflussen das NO-System (Das, 2001), das zusätzlich mit dem Apo E-Metabolismus gekoppelt ist (Colton, 2002). Da Lipoproteinrezeptoren an der Blut-Hirn-Schranke vorhanden sind (Meresse, 1989), könnte eine Statin-induzierte Signalkaskade im Endothel der Gehirnkapillaren den Rezeptor-vermittelten Apo E-Lipoproteinmetabolismus modifizieren. Dieser fungiert möglicherweise als sekundäres Signaltransduktionssystem (Dietschy, 2001; Eckert, 2001a; Igbavboa, 2002; Wolozin, 2002).

Obwohl alle drei eingesetzten Statine die Transbilayer-Verteilung von Cholesterin in der Plasmamembran modifizieren, beeinflusst kein Wirkstoff die Beweglichkeit der Alkylketten der Membranphospholipide. Dies steht in Übereinstimmung mit unseren früheren Befunden, dass Statine Cholesterin-Pools in der Membran beeinflussen die nicht sensitiv auf DPH-Anisotropie reagieren (Eckert, 2001a). Die intramembranäre DPH-Flexibilität wird vermutlich durch Nicht-raft-Cholesterin-Pools determiniert, die womöglich durch Statine nicht beeinflusst werden. Im Gegensatz dazu scheint die

Membran „bulk-Fluidität“, sehr sensitiv auf die Einwirkung von Statinen zu reagieren. Gemessen wird hierbei die Beweglichkeit von Pyren innerhalb der Membran, die durch diskrete Fluoreszenzemission bei Kollision von angeregten Pyrenmolekülen entsteht (MacDonald, 1988). Dabei ist noch nicht geklärt, ob die Möglichkeit zur lateralen Diffusion und/oder die Möglichkeit lokale Pyren-Aggregate zu bilden, den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt für die Entstehung von Pyren-Excimeren darstellt (Kirsch, 2002). In beiden Fällen kann die Wahrscheinlichkeit der Pyren-Excimerbildung in der Membran möglicherweise durch Bedingungen erhöht werden, bei denen monomeres Pyren sterisch konzentriert ist, etwa durch einen erhöhten Gehalt an Cholesterol, wie er mit zunehmendem Alter auftritt (Eckert, 2001b). Statin-induzierte Cholesterolumverteilungen haben sehr wahrscheinlich unterschiedliche Auswirkungen auf DPH- und Pyren-sensitive Membranbereiche. Wir berichten hier, dass die Pyren-Excimerbildung in synaptosomalen Membranen von mit Pravastatin und Lovastatin behandelten Mäusen signifikant erniedrigt wurde, nicht aber nach Simvastatinbehandlung. Da nur Pravastatin und Lovastatin die Verteilung von Cholesterol im exofazialen Membranblatt beeinflussen, schlussfolgern wir, dass dieser Bereich der Membran für die „bulk-Fluidität“ besonders sensitiv ist. Diese Hypothese wird durch die deutliche Korrelation zwischen exofazialen Cholesterolgehalt und „bulk-Fluidität“ gestärkt. Weiterhin zeigen Mäuse mit zunehmendem Alter eine Zunahme an exofazialen Cholesterol (Eckert, 2001b). Dementsprechend ist die Pyren-Excimerbildung in synaptosomalen Plasmamembranen von alten Mäusen signifikant erhöht (Eckert, 2001b).

Zahlreiche Studien berichten, dass sich *in vitro* Effekte von Statinen auf die Prozessierung von APP durch MbetaCD nachahmen lassen. Demnach senkt MbetaCD die zellulären Spiegel an Cholesterol, reduziert die Bildung von A β und beeinträchtigt die Bildung und Struktur von Lipid rafts (Bodovitz, 1996; Fassbender, 2001; Frears, 1999; Hao, 2001; Kabouridis, 2000a). Umgekehrt mündet die Inkubation von Zellen mit MbetaCD-Cholesteroleinschlusskomplexen in einer Erhöhung der zellulären Cholesterolmenge und einer verstärkten Bildung von A β (Bodovitz, 1996; Fassbender, 2001; Frears, 1999). Unsere Daten deuten klar darauf hin, dass MbetaCD und seine Cholesteroleinschlusskomplexe, die Transbilayer Verteilung von Cholesterol in SPM in entgegengesetzter Weise beeinflussen. MbetaCD reduziert den exofazialen Cholesterolpool, es dirigiert somit möglicherweise die Lipid raft-assoziierte APP-Prozessierung hin zu einem nicht-amyloidogenen Stoffwechselweg (Golde, 2001; Kojro, 2001; Marx, 2001). Auf der anderen Seite erhöhen MbetaCD-Cholesteroleinschlusskomplexe den Gehalt an Cholesterol im exofazialen Membranblatt und begünstigen möglicherweise so den Zugang von membrangebundenem APP zu einer amyloidogenen, Lipid raft-gebundenen Prozessierung. Somit besitzen MbetaCD und einige Statine die pharmakologische Kapazität, die zellulären Spiegel an A β zu senken. Sie beeinflussen aber auch die Transbilayer-Verteilung von Cholesterol in der Plasmamembran, was möglicherweise im direkten Zusammenhang mit der intrazellulären A β -Produktion steht.

Hohe Cholesterolspiegel im exofazialen Membranblatt stehen im Verdacht, eine exzellente Umgebung für die amyloidogene Prozessierung von APP innerhalb der Membran zu schaffen, die mit einer erhöhten beta- und gamma-Sekretaseaktivität einhergeht und diesen, im Rahmen der Alzheimer Krankheit pathologischen Prozess, befördert (Golde, 2001; Hartmann, 2001; Kalaria, 1999; Kojro, 2001; Marx, 2001; Simons, 2000b). Untersuchungen an Asp-2 transfizierten HEK293 Zellen zeigten, dass erhöhte intrazelluläre Cholesterolspiegel die Lokalisation des Beta-Sekretase-Enzyms

Asp-2 hin zu Lipid rafts begünstigte, während eine Lovastatinbehandlung zu einer eher diffusen Verteilung von Asp-2 innerhalb der Membran führte und somit möglicherweise der Zugang der Beta-Sekretase zu ihrem Substrat APP behindert wird (Austen, 2003). Es existieren Hinweise, dass der nicht-Lipid raft Cholesterool-Pool innerhalb der Plasmamembran besonders sensitiv für Manipulationen der Cholesterolkonzentration ist (Simons, 2000a). Die Zerstörung von Lipid rafts, etwa durch Sphingomyelinase, sichtet Cholesterool in die nicht-Lipid raft-Pools der Plasmamembran um. Dieses freie Cholesterool gelangt möglicherweise in das endoplasmatische Retikulum zurück und blockiert so die intrazelluläre Translokation von SREB/SCAP zum Golgi-Apparat und inhibiert somit die weitere Cholesteroolsynthese (Simons, 2000a; Slotte, 1997).

Interessanterweise haben in unseren Untersuchungen alle drei Statine die Expression von Flotillin-1, das ein weitverbreitetes Lipid-Raft-Marker-Protein darstellt, vermindert (Eckert, 2003; Kabouridis, 2000b). Auch wenn in der aktuellen Studie, auf Grund der Limitierung an Gewebe, keine Lipid rafts präpariert wurden, deutet diese Beobachtung auf spezifische, Statin-induzierte Veränderungen der Lipid raft-Strukturen und -Zusammensetzung hin. Entsprechend wurde kürzlich berichtet, dass eine Statin-induzierte Verminderung der Caveolin Expression, einem weiteren Lipid raft-Marker-Protein, in Endothelzellen zu einer verstärkten NO-Bildung führt (Feron, 2001).

Statine üben direkt oder indirekt unterschiedliche Effekte auf die Membran-Cholesteroolhomöostase im zentralen Nervensystem aus. Die Statin-induzierte Beeinflussung des Gleichgewichtes von exofazialen und zytofazialen Cholesterool ändert möglicherweise die Zugänglichkeit des Membran gebundenen Cholesterool-Pools zu den Sensoren des endoplasmatischen Retikulums, der Acyl-CoA:cholesterool Acyltransferase, als auch zu Lipid raft-assoziierten Proteinen, wie Sekretasen oder APP. Dies verschiebt vermutlich den zellulären Metabolismus hin zu einem nicht-amyloidogenen Stoffwechselweg.

4.1.5. Membranständiges Cholesterool - Kopplung zwischen Mikrodomänen und ABC-Transporteraktivität

Der ABC-Transporter P-Glykoprotein (Pgp oder ABC-B1) ist ein 170 kDa schweres transmembranäres Protein, dessen Funktion an die Hydrolyse von ATP gekoppelt ist (Hamada, 1988). Pgp transportiert ein breites Spektrum an chemisch unterschiedlichen Xenobiotika (Weber, 2006a). Die zu transportierenden Substrate erhalten, nachdem sie in die lipophile Phase der Plasmamembran penetriert sind, Zugang zu der so genannten Multiple-Drug-Bindungsstelle. Diese befindet sich innerhalb des, dem Zytoplasma zugewandten, zytofazialen Membranblattes der Plasmamembran (Higgins, 1992; Qu, 2002). Es existieren starke Hinweise, dass die Zusammensetzung von biologischen Membranen, eng mit der Funktion von Pgp verbunden ist (Modok, 2004). Die Komposition der Lipide die den Transporter umgeben, modulieren seine ATPase Aktivität und seine Interaktion mit den Substraten. Dabei scheint Cholesterool für die Pgp-Aktivität eine herausragende Rolle zu spielen. Interessanterweise scheint die Verteilung von Cholesterool innerhalb der Membran durch Pgp vermittelt zu sein (Garrigues, 2002). Darüber hinaus werden die ATPase-Aktivität und die Bindung von Xenobiotika durch Cholesterool beeinflusst (Luker, 2000; Romsicki, 1999). Pgp ist hauptsächlich in Lipid rafts lokalisiert (Luker, 2000), welche spezialisierte Membran-Mikrodomänen repräsentieren, die reich an Cholesterool und Sphingolipiden sind. Die

Inkorporation von Cholesterol in Membranen induziert eine flüssig-geordnete Phase, mit Eigenschaften, die zwischen flüssig-ungeordnet und fest-geordnet liegen (Brown, 1998b), was unter anderem in einer veränderten Membranfluidität resultiert. In der vorgestellten Studie wurde der Cholesterolgehalt von Pgp exprimierenden lymphoblastischen Leukämie-VLB Zellen moduliert und die Effekte auf die Transportkapazität von Pgp und die Membranfluidität untersucht. Weiterhin wurden Lipid rafts isoliert und charakterisiert.

Die wichtigsten Resultate im Überblick (Dos Santos, 2007):

- Der Cholesterolgehalt von VLB Zellen wurde mittels MbetaCD und MbetaCD-Cholesteroleinschlusskomplexen erfolgreich moduliert.
- Pgp wurde durch die Modulation des Cholesterolgehaltes nicht aus der Plasmamembran freigesetzt.
- Die funktionelle Inhibition von Pgp stand in Bezug zu den variierenden Cholesterolmengen der Plasmamembran.
- Unsere Daten weisen darauf hin, dass die Fluidität der Membran nicht ausschließlich für die Cholesterol-bedingte Modulation der Pgp-Funktion verantwortlich ist.
- Sowohl Depletion als auch die Anreicherung von Cholesterol führt zu einer Disassemblierung von Lipid rafts.
- In Cholesterol-depletierten Zellen war eine Verschiebung von Pgp hin zu Detergenz-löslichen Fraktionen zu beobachten.
- Die Anreicherung von Zellen mit Cholesterol führte zu einer veränderten Zusammensetzung von Lipid rafts, veränderte aber die Lokalisation von Pgp nicht.

Unsere Daten zeigen, dass die Cholesterol-Depletion die strukturelle Organisation von Lipid rafts in der Plasmamembran von VLB Zellen disassembliert, was bereits von Gayet et al. postuliert wurde (Gayet, 2005). Weiterhin wird extern zugeführtes Cholesterol nicht physiologisch in Subdomänen der Membran eingebaut, was durch Rasterkraftmikroskopie-Befunde gestützt wird (Barakat, 2005).

Der Stellenwert von Lipid rafts für die Vorgänge in lebenden Zellen ist Gegenstand kontroverser wissenschaftlicher Diskussionen. Es wurde propagiert, dass Lipid rafts in Schichten organisiert sind (Hinrichs, 2005), die eine hoch geordnete Kernregion haben, welche reich an Sphingomyelin und Cholesterol ist. Diese Kernregion ist von weniger geordneten Bereichen umgeben, die in flüssig-ungeordnete Membranphasen eintauchen (Brown, 1998b; Hinrichs, 2005). Diese Vorstellung impliziert, dass die mit unterschiedlichen Methoden isolierten Lipid rafts, je nach verwendetem Detergenz, die physiologische Komposition reflektieren. Über die uneinheitliche Verteilung von Pgp innerhalb und außerhalb der Lipid rafts wurde auch schon vor unseren Untersuchungen berichtet. Benutzt man etwa Brij 98 anstelle von Triton X-100 zur Isolierung von Lipid rafts, findet man Pgp eher in intermediären Bereichen unterschiedlicher Dichte, die sich strukturell von Lipid rafts unterscheiden (Radeva, 2005). Unsere aktuellen Befunde stützen die Hypothese der Organisation von Lipid rafts in Schichten: In Lymphoblasten besitzen Lipid rafts eine Kernregion, die die GPI-verankerten Proteine alkalische Phosphatase (AP) und LAT (linker for activation of T cells) enthält, sowie benachbarte, weniger strukturierte Schichten, die Flotillin und Pgp beherbergen. Entsprechend dem Modell von Lipid rafts in Schichten propagieren wir, dass sich exogen zugefügtes Cholesterol hauptsächlich in die flüssig-ungeordnete Phase der Plasmamembran einlagert und eine partielle Änderung der flüssig-

ungeordneten in eine flüssig-geordnete Phase induziert. Dabei erweitert sich der Membranbereich, der für die Lokalisation von Pgp energetisch günstig ist. Pgp verteilt sich somit großflächiger und verliert einen Teil seiner Transportfähigkeit. Wir vermuten, dass Cholesterol über die strukturelle Veränderung der Plasmamembran bzw. von Lipid rafts die Transportkapazität von Pgp modifiziert. Allerdings lassen unsere Untersuchungen keine Rückschlüsse darauf zu, ob Cholesterol den Diffusionskoeffizienten des Substrates in der Nähe der Bindungsstelle des Pgp beeinflusst oder direkt mit der Bindungsstelle für Calcein-AM interagiert, wie es etwa für Daunomycin berichtet wurde (Wang, 2000).

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die strikte Regulation der Verteilung von Cholesterol in der Plasmamembran für eine optimale Pgp Funktion essentiell zu sein.

4.1.6. Regulation der zentralen Cholesterolhomöostase durch den Leber-X-Rezeptor Agonist TO-901317

Nukleäre Leber-X-Rezeptoren (LXR) sind verantwortlich für die Regulation von Genen, die in die Cholesterolhomöostase involviert sind (Lala, 2005). Die Aktivierung von LXR regt Cholesterol-Effluxmechanismen an, die unter anderem die ATP-Bindungs-Kassettentransporter ABC-A1 und ABC-G1 involvieren. Für den LXR-Agonisten TO-901317 ist bekannt, dass er Cholesterol-relevante Gene im zentralen Nervensystem induziert (Muscat, 2002; Whitney, 2002). Es ist allerdings unbekannt, ob LXR-Agonisten den Flux von Cholesterol aus dem zentralen Nervensystem induzieren. Obwohl gezeigt wurde, dass LXR-Agonisten die Genexpression von ABC-A1 und ABC-G1 induzieren, wurde bislang noch keine funktionelle Antwort berichtet.

Oxysterole repräsentieren als Cholesterolmetabolite natürliche Liganden für LXR. LXR bilden Heterodimere mit dem 9-cis-Retinolrezeptor (RXR), die dann an das LXR-Response Element der DNA binden (Lala, 2005). Es existieren zwei Subtypen, alpha-LXR und beta-LXR, die beide im zentralen Nervensystem exprimiert werden. Während beta-LXR in allen Säugetiergeweben vorkommt, wird alpha-LXR nur in Leber, Nebenniere, Darm, Milz und Gehirn exprimiert (Apfel, 1994; Auboeuf, 1997; Kainu, 1994; Song, 1995; Willy, 1995).

ABC-A1 fördert den Efflux von Cholesterol und Phospholipiden aus intrazellulären Kompartimenten zu extrazellulären Cholesterol-Akzeptoren (Oram, 2005). Die Aktivierung von LXR induziert die Hochregulation des ABC-A1-Gens und -Proteins. ABC-G1, ABC-G5 und ABC-G8 fördern die biliäre und fäkale Exkretion von Cholesterol (Muscat, 2002; Whitney, 2002).

LXR scheinen bei zahlreichen physiologischen und pathologischen Prozessen involviert zu sein. LXR-Agonisten können die Progression von Atherosklerose im Mausmodell verzögern und die Rückbildung bestehender atherosklerotischer Läsionen beschleunigen (Claudel, 2001; Joseph, 2002). LXR induziert auch die Insulinsekretion von Pankreaszellen (Efanov, 2004; Gerin, 2005) und über SREBP-1c in die Produktion von Fettsäuren involviert (DeBose-Boyd, 2001; Repa, 2000; Sun, 2003).

Cholesterol scheint im Rahmen der Alzheimer Krankheit eine Rolle bei der Bildung von A β zu spielen und es wurde gezeigt, dass LXR-Agonisten die Produktion von A β sowohl in vitro als auch in vivo modifizieren (Burns, 2006b; Fukumoto, 2002; Koldamova, 2005; Sun, 2003). Erhöhte Cholesterolspiegel könnten möglicherweise auch indirekt über eine verminderte Pgp-Aktivität für die Akkumulation von A β verantwortlich sein, wie eigene Untersuchungen zeigen (Dos Santos, 2007). Es wurde bereits nachgewiesen, dass Pgp in den zellulären Efflux von A β involviert ist und eine Blockierung dieses Transportproteins den Efflux von A β aus dem murinen Gehirn reduziert (Cirrito, 2005; Lam, 2001; Vogelgesang, 2002).

Es konnte kürzlich *in vivo* bewiesen werden, dass TO-901317 die Bildung von A β reduziert (Burns, 2006b). In der aktuellen Studie sollte aufgeklärt werden, ob dieser Effekt auf einer Beeinflussung der zentralen Cholesterollhomöostase beruht. Mäuse wurden für sieben Tage mit 25 bzw. 50 mg/kg KG *i.P.* behandelt und im Anschluss im Gehirn Cholesterolspiegel, HMG-CoA-Reduktase und Proteine, die in den Cholesterolefflux involviert sind, analysiert.

Die wichtigsten Resultate im Überblick (Eckert, 2007a):

- TO-901317 erhöht im Gehirn die Proteinmenge an ABC-A1 und ABC-G1 als auch an Apo E.
- TO-901317 erniedrigt spezifisch die Cholesterolmenge in isolierten synaptosomalen Plasmamembranen, die Gesamtmenge an Cholesterol im Gehirngewebe ist unverändert.
- TO-901317 erhöht die Aktivität und die Menge an mRNA der HMG-CoA-Reduktase. Dieser Befund wurde *in vitro* reproduziert, allerdings setzt das *in vitro* System die Anwesenheit von Apolipoprotein A1 voraus, was die Notwendigkeit eines exogenen Akzeptors nahe legt.
- TO-901317 beeinflusst nicht die Expression des Lipid raft Markers Flotillin-1.

Unsere Daten zeigen erstmals, dass LXR-Agonisten die Menge an Cholesterol in isolierten synaptosomalen Plasmamembranen von behandelten Mäusen reduzieren. Dass die Gesamtmenge an Cholesterol im kortikalen Homogenat unverändert bleibt, wie schon berichtet (Burns, 2006b), liegt wahrscheinlich an der niedrigen Gesamt-Umsatzrate des Sterols und der großen Menge an Cholesterol, die im Myelin gebunden ist (Andersson, 1990). Die von uns unter TO-901317 gesehene Hochregulation der HMG-CoA-Reduktase mRNA und Aktivität wird als kompensatorischer Mechanismus zur Gegenregulation zu den verminderten, membrangebunden Cholesterolspiegeln angesehen. Die Hochregulation der HMG-CoA-Reduktase mRNA involviert möglicherweise das Sterol Regulatory Element Binding Protein (SREBP), da eine frühere Studie nahelegt, dass die Transkription des SREBP-Gens in Hepatozyten die Aktivierung von LXR bedingt (DeBose-Boyd, 2001). Diese Vermutung wird durch eine weitere Studie gestützt die zeigte, dass Mäuse, denen die Fähigkeit zur Produktion des endogenen LXR-Agonisten 24-OH-Cholesterol fehlt, eine erniedrigte Cholesterolsyntheserate im Gehirn aufweisen (Lund, 2003).

Zusammenfassend zeigt die vorgestellte Studie, dass der LXR-Agonist TO-901317 Mechanismen im ZNS aktiviert, die für die Homöostase von Cholesterol verantwortlich sind und die letztlich in einer Reduktion von Cholesterol in synaptosomalen Plasmamembranen münden. Wir können ebenfalls einen möglichen Rückkopplungsmechanismus aufzeigen, der nach Aktivierung von LXR die Expression von HMG-CoA-Reduktase mRNA, möglicherweise über die Aktivierung von SREBP, induziert und die HMG-CoA-Reduktase Aktivität erhöht.

4.1.7. Die Bildung von Beta-Amyloid Protein ist prinzipiell nicht von Cholesterol abhängig

Die übermäßige Bildung von Beta-Amyloid Protein (A β) wird als der initiale Schritt der Amyloid-Kaskaden-Hypothese der Alzheimer Krankheit angesehen (Hardy, 2002). A β wird durch Sekretasen aus seinem Vorläuferprotein APP abgespalten. Die Prozessierung von APP durch alpha-, beta-, und gamma-Sekretasen ist direkt mit zellulären Membranen verbunden und hängt stark von der Membranfluidität ab. So beeinflusst die

Membranfluidität den Zugang von Sekretasen zu ihrem Substrat APP (Bodovitz, 1996). Kojro et al. konnten zeigen, dass bei hoher Membranfluidität die Aktivität der alpha-Sekretase erhöht ist (Kojro, 2001). Eine erniedrigte Membranfluidität resultiert in einer verstärkten Aktivität der gamma-Sekretase (Gamerding, 2008). Auch die beta-Sekretase scheint durch die Fluidität zellulärer Membranen moduliert zu werden (von Arnim, 2008). Somit beeinflusst die Membranfluidität entscheidend die Prozessierung von APP.

Das bei der amyloidogenen Prozessierung von APP entstehende Spaltprodukt A β stört möglicherweise selbst die Ordnung zellulärer Membranen. Eigene und andere Studien haben die Effekte von A β auf Modell-Membranen und biologischen Membranen aus dem Gehirn von Mäusen, Ratten und Menschen untersucht (Zusammengefasst in (Wood, 2003). Es ist allgemein akzeptiert, dass Änderungen in den physiko-chemischen Eigenschaften der Membran, deutlich die Aktivität von unterschiedlichen Membranproteinen, auch von alpha-, beta- und gamma-Sekretasen, beeinflussen können. Die Zellmembran von Neuronen repräsentiert den Ort, auf den extrazelluläres A β initial einwirkt. Allerdings ist der Mechanismus wie A β die Membranfluidität moduliert, noch wenig verstanden. Yanagisawa et al. haben entdeckt, dass A β an membrangebundenes Monosialogangliosid (GM-1) bindet. Dieser initiale Prozess initiiert die Aggregation von A β direkt an der Membran in kultivierten Neuronen, aber auch im Gehirn (Yanagisawa, 2007). GM-1 reduziert die Fluidität in PC12-Zellen und verändert die Lokalisation von Rezeptoren innerhalb der Plasmamembran (Nishio, 2004). Wir haben in der vorgestellten Arbeit die Hypothese untersucht, dass A β die amyloidogene Prozessierung von APP fördert, indem es die Membranfluidität erniedrigt, was in der Folge seine eigene Produktion stimuliert. GM-1 fungiert dabei als möglicher Bindungspartner für A β .

Die wichtigsten Resultate im Überblick (Peters, 2009):

- Oligomeres A β_{1-40} reduziert die Membranfluidität in lebenden Zellen, erhöht somit die beta-Sekretase-Spaltung von APP und erhöht signifikant die Bildung von A β_{1-42} . Dieser Effekt ist abhängig vom Aggregationsstatus des Peptides, monomeres A β hat keinen Effekt, die Effekte von fibrillärem A β sind im Vergleich zu oligomerem A β wesentlich schwächer ausgeprägt.
- Der Gehalt an zellulärem A β moduliert die Membranfluidität in lebenden Zellen. Die Membranfluidität korreliert negativ mit der Menge an endogen gebildetem A β . Dieser Effekt kann mit dem gamma-Sekretase Inhibitor DAPT, der die Bildung von A β unterdrückt, aufgehoben werden.
- Die Membranfluidität determiniert die Prozessierung von APP. Durch den Einsatz von unterschiedlichen Modulatoren der Membranfluidität konnte gezeigt werden, dass bei hoher Membranfluidität APP im nicht-amyloidogenen Prozessierungsweg gespalten wird; die Menge an sezerniertem sAPPalpha wird signifikant erhöht, die Bildung von A β stark erniedrigt. Bei reduzierter Membranfluidität ergibt sich ein inverser Befund. Dieser Zusammenhang ist ursächlich mit der Fluidität der Membran verknüpft, unabhängig davon, ob diese durch variierende Cholesterolmengen oder andere chemische Einflüsse moduliert wird.
- Oligomeres A β_{1-40} bindet an GM-1 in lebenden Zellen. Mittels konfokaler Laser-Scanning Fluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, dass Fluorescein-markiertes A β mit Alexa555-markiertem Choleratoxin, einen spezifischen Liganden für GM-1, an der Zelloberfläche kolokalisiert.

- Choleratoxin reduziert die Membranfluidität und erhöht die Bildung von A β . Wenn die Effekte von A β über GM-1 vermittelt sind, sollten Substanzen die ebenfalls an GM-1 binden, ebenso die Membranfluidität reduzieren und die Bildung von endogenem A β induzieren. Choleratoxin repräsentiert einen spezifischen Liganden an GM-1. Die Inkubation von Zellen mit Choleratoxin führt in der Tat zu vergleichbaren Effekten wie die Inkubation mit exogenem oligoA β ₁₋₄₀.
- Die erhaltenen Ergebnisse konnten an neuronalen Zellen bestätigt werden.

Es existieren Evidenzen, dass die Membranlipid-Zusammensetzung die Aktivität von Sekretasen determiniert und möglicherweise die Funktion und die Konformation dieser Enzyme beeinflusst, was die Substratelektion und die Zugänglichkeit zu APP-Spaltungsstellen moduliert (Zhou, 2007). In der vorliegenden Studie konnten wir zeigen, dass A β die amyloidogene Prozessierung von APP durch eine Verminderung der Membranfluidität forciert und somit seine eigene Produktion anregt. Die Störung der Membranstruktur war verbunden mit der Bindung von A β an GM-1. Unsere Daten zeigen weiterhin, dass die Inhibition der gamma-Sekretase die Bildung von A β inhibiert, die Membranfluidität erhöht und die Bildung von sAPPalpha induziert. Befunde, die an alten Mäusen und murinen AD-Modellen nach Fütterung von mehrfach ungesättigten, langkettigen Fettsäuren erhoben wurden, stützen unsere Daten (Green, 2007; Oksman, 2006; Suzuki, 1998).

Die A β -induzierte Reduktion der Membranfluidität in lebenden Zellen involviert wahrscheinlich GM-1. Diese Idee basiert auf unterschiedlichen Evidenzen. Wir konnten zeigen, dass Fluorescein-markiertes A β auf der Plasmamembran mit GM-1 kolokalisiert, was GM-1 als mögliches Zielmolekül für A β in der Plasmamembran bestätigt (Yanagisawa, 2007). Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit Befunden, dass GM-1 die Aggregation von A β an der Plasmamembran fördert (Wakabayashi, 2005). Somit induziert möglicherweise die Bindung von A β an GM-1 Änderungen der Membranfluidität, die in der Folge eine Membranumgebung schaffen, die energetisch günstig für die Aktivität von beta- und gamma-Sekretasen ist. Es ist bekannt, dass GM-1 in die Regulation der Membranstruktur involviert ist. So erhöht es die Ordnung im hydrophoben Membrankern und erniedrigt die Fluidität in Sphingomyelin-reichen Membranen (Pei, 2003). GM-1 reduziert die Membranfluidität in PC12-Zellen und verändert die Lokalisation von membrangebundenen Rezeptoren. Weiterhin verändert die Bindung von Choleratoxin an GM-1 die laterale Diffusion von Fluoreszenzmarkierten Lipiden (Forstner, 2006). Dementsprechend zeigen wir, dass vergleichbar zur Inkubation von Zellen mit exogenem A β , die Bindung von Choleratoxin an GM-1 die Membranfluidität reduziert und die Bildung von A β induziert. Auch frühere Berichte zeigen, dass GM-1 die APP-Prozessierung beeinflusst (Tamboli, 2005; Tashima, 2004; Zha, 2004). Allerdings scheinen neben GM-1 noch weitere Membrankomponenten an den Effekten von A β beteiligt zu sein. So wurde gezeigt, dass A β eine hohe Bindungsaffinität zu Phosphatidylcholin und ungesättigten Fettsäuren hat (Avdulov, 1997).

Es ist bekannt, dass hohe Gehalte an Cholesterol in der Membran die Fluidität erniedrigen und dass die Prozessierung von APP stark vom Cholesterolgehalt der Membran abhängt (Fassbender, 2001; Frears, 1999; Kojro, 2001). Allerdings zeigen unsere aktuellen Befunde, dass die Membranfluidität die Prozessierung von APP unabhängig vom Cholesterolgehalt determiniert.

Der wichtigste Risikofaktor für das Auftreten der sporadischen Form der Alzheimer Krankheit ist das Alter. Es existieren Hinweise, dass einige

neuropathologische Merkmale der sporadischen Alzheimer Krankheit mit denen des normalen Alterns überlappen (Drachman, 2006). Änderungen der Komposition neuronaler Membranen ist Teil physiologischer Alterungsprozesse (Choi, 1995; Igbavboa, 1996). So fällt unter anderem die starke Abnahme der Membranfluidität in synaptosomalen Plasmamembranen von alten versus jungen Mäusen auf (Eckert, 2001b). Hippokampale Membranen aus dem Gehirn von Alzheimer Patienten weisen eine signifikant erniedrigte Membranfluidität gegenüber altersgleichen Kontrollen auf (Eckert, 2000). Daraus folgt, dass die altersbedingte Reduktion der synaptosomalen Membranfluidität möglicherweise eine optimale Umgebung für die Prozessierung von APP durch die beta- und gamma-Sekretasen schafft.

4.1.8. Presenilin-1 beeinflusst die physiko-chemischen Eigenschaften von neuronalen Membranen

Es besteht wachsendes Interesse an Protein-Lipid-Interaktionen im zentralen Nervensystem, da diese möglicherweise Einblicke in neurodegenerative Mechanismen gewähren. Presenilin-Proteine sind Komponenten des gamma-Sekretase-Komplexes, der an der Bildung von A β aus seinem Vorläuferprotein APP beteiligt ist (Mattson, 2004). Der gamma-Sekretase-Komplex setzt sich neben Presenilin aus Nicastrin, Aph-1 und Pen-2 zusammen. Alle vier Proteine sind für die gamma-Sekretase-Aktivität notwendig (Takashima, 2006). Die funktionelle Aktivität der gamma-Sekretase ist in der Plasmamembran und in den äußeren Kompartimenten des sekretorischen Biosyntheseweges lokalisiert (Steiner, 2008). Die Prozessierung von APP durch die gamma-Sekretase ist, wie schon weiter oben ausgeführt, stark mit zellulären Membranen verbunden. Die gamma-Sekretase reagiert sensitiv auf Modifikationen in der hydrophoben Membrenumgebung (Gamerding, 2008; Peters, 2009; Sawamura, 2004; Steiner, 2008) und scheint in Lipid rafts lokalisiert zu sein (Ehehalt, 2003; Wada, 2003; Wahrle, 2002). Fibroblasten von Mäusen, die defizitär an Presenilin sind, zeigen veränderte Fluidität von Membranen und Komposition von Lipid rafts (Grimm, 2006). Um den Einfluss von Presenilin auf Membranparameter weiter zu erforschen, wurden neuronale Membranen und Lipid rafts aus dem Gehirn von Mäusen, die humanes Presenilin 1 (PS-1) exprimieren, isoliert und weiter untersucht.

Die wichtigsten Resultate im Überblick (Eckert, 2009b):

- Neuronale Membranen aus dem Gehirn von Mäusen, die humanes PS-1 exprimieren, zeigen eine erniedrigte Fluidität und erhöhte Gehalte an Cholesterol und Sphingomyelin.
- Die erhöhten Gehalte an Cholesterol und Sphingomyelin lassen vermuten, dass neuronale Membranen von transgenen PS-1-Mäusen gesteigerte Gehalte an Lipid rafts aufweisen, da sowohl Cholesterol als auch Sphingomyelin Komponenten dieser membranären Mikrodomänen darstellen.
- In der Folge wurden aus dem Gehirn von transgenen PS-1-Mäusen Lipid rafts mit Hilfe der Detergenz-basierenden Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert.
- Die Charakterisierung der Fraktionen der Sucrose-Dichtegradienten-Zentrifugation zeigt für Fraktionen aus dem Gehirn von Mäusen, die humanes PS-1 tragen und Kontrollmäusen, eine ähnliche Verteilung von Proteinen und der Trübung der einzelnen Fraktionen.
- Die Gehalte an Cholesterol und die Aktivität des Lipid raft Markerproteins Alkalische Phosphatase sind in Lipid raft Fraktionen aus dem Gehirn von PS-1 transgenen Mäusen signifikant erhöht.

- Auch die Gehalte des Lipid raft Markerproteins Flotillin-1 sind in den Membranmikrodomänen deutlich erhöht, was darauf hindeutet, dass PS-1 die Bildung von Lipid rafts in neuronalen Membranen induziert.

PS-1 verändert die Eigenschaften von neuronalen Membranen. Protein-Lipid Interaktionen regulieren zahlreiche metabolische Aktivitäten und zelluläre Reaktionen auf Umgebungseinflüsse. Diese Interaktionen finden primär in Membranen statt, in denen Phospholipide, Cholesterol und Sphingolipide konzentriert sind. Diese Lipide bestimmen nicht nur die biophysikalischen Eigenschaften der Membran, sondern haben auch wichtige Funktionen bei Signaltransduktionsmechanismen (Mattson, 2005).

Cholesterol ist der wichtigste Modulator für die Fluidität von biologischen Membranen. Es ist daher davon auszugehen, dass die in neuronalen Membranen von PS-1-Mäusen gemessene Erniedrigung der Membranfluidität, auf den erhöhten Cholesterolwerten beruht. Es scheint allerdings, dass Änderungen der Cholesterolhomöostase nicht notwendigerweise mit PS-1 korreliert sind. So sind die Gehalte an PS-1 in einem Mausmodell der Nieman-Pick Typ C Krankheit unverändert (Burns, 2003). Diese Krankheit zeichnet sich durch Störungen des intrazellulären Cholesteroltransportes aus. Unsere Daten zeigen erhöhte Gehalte an Sphingomyelin in neuronalen Membranen aus dem Gehirn von PS-1 transgenen Mäusen. Andere Untersuchungen berichten, dass bei Fehlen von Presenilin erhöhte zelluläre Sphingomyelingealte festgestellt wurden (Grimm, 2005) und dass Membranen, die aus dem Gehirn von Alzheimer Patienten isoliert wurden, ebenfalls erniedrigte Sphingomyelingealte aufweisen (Cutler, 2004). Eine mögliche Erklärung liefert eine kürzlich veröffentlichte Arbeit, die zeigt, dass Presenilin über zahlreiche Enzyme den zellulären Metabolismus von Cholesterol und Sphingomyelin reguliert (Grimm, 2005).

Sowohl Cholesterol als auch Sphingomyelin repräsentieren wesentliche Komponenten von Lipid rafts (Eckert, 2003). Unsere Daten deuten darauf hin, dass PS-1 in vivo die Bildung von Lipid rafts induziert. Es stellt sich die Frage nach dem Mechanismus, der Lipide und Proteine in diesen Membranmikrodomänen zusammenhält. Kürzlich veröffentlichte Daten weisen darauf hin, dass Lipide eine dominante Rolle bei den initialen strukturellen Membranänderungen spielen und in deren Folge Proteine in Lipid rafts eingelagert werden (Adams, 2006). In Lipid rafts sind die Lipide stärker gepackt und ermöglichen einen längeren Kontakt unter den eingelagerten Proteinen (Brown, 2006). Auch die Prozessierung von APP durch den gamma-Sekretase-Komplex scheint in Lipid rafts stattzufinden (Douglass, 2005). Es wurde spekuliert, dass Flotillin-1 APP in Lipid rafts dirigiert und somit an der Lokalisation und Prozessierung von APP beteiligt ist (Chen, 2006; Nizzari, 2007). Daten, die zeigen, dass Flotillin-2 die Zusammenlagerung von APP an der Zelloberfläche fördert, unterstreichen die Bedeutung von Lipid rafts bei der Prozessierung von APP (Schneider, 2008).

Kürzlich wurde die räumliche Verteilung des gamma-Sekretase-Komplexes und seiner Substrate in definierte Membrandomänen im Detail studiert (Vetrivel, 2005). In Übereinstimmung mit diesen Befunden ist bei unseren PS-1 transgenen Mäusen APP hauptsächlich in nicht-raft-Fractionen zu finden (Vetrivel, 2005). Unsere Daten legen nahe, dass auch PS-1 hauptsächlich in nicht-raft-Fractionen zu finden ist, was in Übereinstimmung mit Daten aus embryonalen Gehirngewebe von PS-1-überexprimierenden Mäusen steht (Vetrivel, 2005).

4.1.9. Schlussfolgerung

Die Untersuchungen zur zentralen Cholesterolhomöostase zeigen, dass diese im Wesentlichen unabhängig vom peripheren System ist. Als essentielles Element der zentralen Cholesterolhomöostase hat sich Apolipoprotein E erwiesen. Es ist nicht nur für den zellulären Efflux von Cholesterol notwendig, sondern moduliert auch die intrazelluläre Verteilung von Cholesterol, etwa in biologischen Membranen. Die Genvariante Apo E4 bzw. das Fehlen von Apo E fördert möglicherweise pathophysiologische Vorgänge im Rahmen der AD. Weiterhin ist Apo E teilweise für die neuropharmakologischen Effekte von Statinen essentiell. Die Verteilung von Cholesterol innerhalb der Membran lässt sich durch Statine modulieren, was möglicherweise zu deren neuropharmakologischen Eigenschaften beiträgt.

Allgemein haben physiko-chemische Eigenschaften neuronaler Membranen Einfluss auf die Prozessierung von APP. Eine erniedrigte Membranfluidität fördert die Bildung von A β . Umgekehrt erniedrigt A β die Membranfluidität, so dass ein *circulus vitiosus* initiiert wird, in dem A β seine eigene Produktion steigert. Allerdings sind die über die Membranfluidität-vermittelten Effekte nicht notwendigerweise von Cholesterol abhängig. Auch die pharmakologische Beeinflussung der APP-Prozessierung durch Statine ist nicht unbedingt an eine Senkung der Cholesterolgehalte in der Membran gekoppelt. Unsere Befunde, dass PS-1 als Komponente des γ -Sekretasekomplexes Lipid rafts beeinflusst legen einen Zusammenhang zwischen Bildung von A β und intrazellulärer Lipidhomöostase nahe.

4.2. Intermediärprodukte des Mevalonat-Biosyntheseweges - Isoprenoide

Posttranslationale Modifikationen von Proteinen durch die Isoprenoide Farnesylpyrophosphat (FPP) und Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) finden zunehmende Beachtung in der Wissenschaft. Dies betrifft die Krebsforschung genauso, wie die Erforschung neurodegenerativer Erkrankungen. FPP und GGPP binden kovalent an Proteine mit C-terminalem CaaX-Motiv, wie zum Beispiel an kleinen GTPasen (z.B. Ras im Fall von FPP oder Rac1 oder Rho im Fall von GGPP). Das Anheften der Isoprenoide an Proteine mit CaaX-Motiv ist essentiell für die Insertion der vorgenannten Proteine in biologische Membranen und ist damit maßgeblich für deren Lokalisation, Funktion und Aktivität. Kleine GTPasen sind beteiligt an inflammatorischen Prozessen, bei oxidativem Stress und bei der Proliferation von Zellen und deren Wachstum (McTaggart, 2006). Genauso wie Cholesterol, entstehen FPP und GGPP im Mevalonat-Biosyntheseweg. Im Gegensatz zu den mannigfachen Veröffentlichungen zu Cholesterol sind Informationen über die Homöostase von FPP und GGPP im Gehirn bisher kaum vorhanden. Der Mevalonat/Isoprenoid/Cholesterol-Biosyntheseweg hat in der letzten Zeit großes, wenn auch zum Teil recht kontroverses Interesse im Zusammenhang mit der Alzheimer Krankheit geweckt (Cole, 2006; Ostrowski, 2007). Eine verstärkte Prenylierung von Proteinen in Folge von erhöhten Isoprenoid-Spiegeln, im Rahmen der Pathologie der Demenz, wurde von einigen Gruppen postuliert (Salminen, 2008). Es wird auch zunehmend diskutiert, dass die therapeutische Wirksamkeit von Statinen bei der Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen und möglicherweise auch bei einigen neurodegenerativen Erkrankungen zumindest teilweise über eine Senkung der Isoprenoidspiegel und somit über eine Verminderung der prenylierten Proteine vermittelt wird (Cole, 2005). Zwar wurden Isoprenoid/Protein-Komplexe mit Hilfe der Massenspektroskopie (Appels, 2006; Barnidge, 2003) und mittels semi-quantitativen Immunoassays (Cordle, 2005a; Dursina, 2006) untersucht, allerdings wurden bis dato

keine Daten zu FPP- und GGPP-Gehalten im Gehirn publiziert. Dies wohl aufgrund des Fehlens einer sensitiven analytischen Methode, die die Probleme bei der Isolierung und der Detektion kleinster Mengen dieser Intermediärprodukte lösen würde.

4.2.1. Entwicklung und Etablierung einer validierten Methode zur Bestimmung von FPP und GGPP in menschlichem Gehirngewebe

Auf der Basis von Vorarbeiten (Tong, 2005), haben wir kürzlich eine Methode zur Quantifizierung von FPP und GGPP in nanomolaren Konzentrationen im menschlichen Gehirn entwickelt (Hooff, 2008). Die besondere Schwierigkeit lag in der Entwicklung einer Isolationsmethode, mit der es möglich ist, kleinste Mengen an FPP und GGPP aus Gewebe zu isolieren, um diese dann nach Kopplung an einen Fluorophor sensitiv nach HPLC-Trennung mittels Fluoreszenzdetektor quantifizieren zu können.

Die wichtigsten Resultate im Überblick (Hooff, 2008):

- Eine Kombination aus Extrakt flüssig/flüssig Extraktion und Umkehr-Festphasen Extraktion (SPE) erwies sich am effizientesten, um FPP und GGPP aus humanem, kortikalem Gehirngewebe zu isolieren.
- Die analytische Methode wurde hinsichtlich Selektivität, Präzision, Genauigkeit, Richtigkeit und Sensitivität validiert.
- Es wurde ein interner Standard eingeführt, der synthetisiert und charakterisiert wurde.
- Die Methode erlaubt eine simultane Quantifizierung von FPP und GGP über einen breiten linearen Bereich.
- Es wurden erstmals Konzentrationen von FPP und GGPP in humanem postmortalem Gehirngewebe aus dem Kortex bestimmt, die sich im nanomolaren Bereich bewegen.

Die von uns beschriebene Analytik entspricht voll den Anforderungen der amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) für eine voll validierte bioanalytische Methode (siehe www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf, in der Fassung vom 25. Juli 2008), hinsichtlich der Selektivität, der Linearität, der Stabilität, der Richtigkeit, der Genauigkeit, der Präzision und der wiederholten Messung an der Bestimmungsgrenze. Die präsentierte Technik macht sich auch einen Wichtungsfaktor für die Kalibrationskurven zu Nutze, um die Genauigkeit weiter zu erhöhen. Durch Einsatz von unterschiedlichen Phosphatase-Inhibitoren ist es gelungen, die schnelle Dephosphorylierung von Isoprenoiden im Gewebehomogenat zu unterbinden und diese mit einer Kombination aus flüssig/flüssiger und fest/flüssiger Extraktion zu isolieren. Da sich zahlreiche kommerziell erhältliche Substanzen als unbrauchbar erwiesen, wurde DNP synthetisiert und als brauchbarer interner Standard identifiziert (Naassner, 2002). ¹H-NMR- und HPLC-Analysen bestätigten die Reinheit des synthetisierten Produktes. Die Analyte FPP und GGPP wurden nach der Chromatographie über einen Fraktionssammler aufgefangen und massenspektroskopisch mit Hilfe der FTICR-MS bestätigt.

Die von uns gewählte Strategie einer spezifischen Derivatisierung der Analyte zu fluoreszierenden Produkten, die dann nach chromatographischer Trennung empfindlich mit Hilfe eines Fluoreszenzdetektors bestimmt werden können, besticht durch eine Bestimmungsgrenze im nanomolaren Bereich. Eine kürzlich veröffentlichte Methode zur Bestimmung von FPP und GGPP mittels LC-MS enttäuscht durch eine vergleichsweise schlechte Empfindlichkeit (Henneman, 2008), die darin begründet liegt, dass nicht

derivatisiertes FPP und GGPP sich per se nur mangelhaft zur direkten MS-Analyse eignen.

4.2.2. Erhöhte FPP und GGPP Gehalte im Gehirngewebe von Alzheimer Patienten

Experimentelle Befunde deuten auf einen Zusammenhang zwischen isoprenylierten kleinen GTPasen und der Alzheimer Krankheit hin (Cole, 2006; Scheper, 2007). Folglich wurde in der Literatur im Zusammenhang mit Alzheimer vielfach eine verstärkte Isoprenylierung von Proteinen und erhöhte Isoprenoidspiegel im Gehirn der Patienten ins Gespräch gebracht (Cole, 2006; Scheper, 2007). Allerdings wurden diese Vermutungen bislang nicht mit Daten belegt. Wohl auch deshalb, weil bis dato keine Methode zur Verfügung stand, die die Probleme hinsichtlich der Isolierung und der Sensitivität der Detektion von FPP und GGPP hätte lösen können. Daher wurde die von uns etablierte und validierte Methode zur Quantifizierung von Isoprenoiden verwendet, um die Gehalte von FPP und GGPP in post-mortem Gewebe von Alzheimer Patienten und nicht-dementen Kontrollpersonen zu ermitteln (Hooff, 2008). Hierzu wurden gefrorene Stücke des frontalen Kortex in graue und weiße Substanz aufgeteilt und die optische Trennung mit Western blot Analyse anhand des neuronalen Markerproteins NeuN biochemisch bestätigt. Es konnte ausgeschlossen werden, dass das post-mortem Intervall einen Einfluss auf die gemessenen Gehalte an FPP und GGPP hatte.

Die wichtigsten Resultate im Überblick (Eckert, 2009a):

- Kortikales Gewebe aus dem Gehirn von Alzheimer Patienten weist signifikant höhere Gehalte an FPP und GGPP auf. Der Cholesterolgehalt im untersuchten Gehirngewebe ist bei Alzheimer Patienten nicht verändert.
- Die Gehalte an GGPP liegen in allen untersuchten Proben deutlich über den FPP-Spiegeln.
- Die Konzentration an FPPS mRNA ist in der grauen Substanz aus dem Gehirn von Alzheimer Patienten signifikant erhöht.
- Auch die Menge an GGPPS mRNA in diesem Kompartiment scheint erhöht, obgleich das Signifikanzniveau im zweiseitigen, ungepaarten T-Test nicht erreicht wird.

Wir konnten erstmals zeigen, dass die Gehalte von FPP und GGPP im Gehirngewebe von Alzheimer Patienten signifikant erhöht sind. Im Vergleich zu FPP sind die Gehalte an GGPP generell höher, was unsere Vorbefunde bestätigen (Hooff, 2008). Um einen ersten Einblick in die zellulären Mechanismen zur Regulation der FPP und GGPP Gehalte zu bekommen, wurden die mRNA Gehalte der in die Biosynthese involvierten Enzyme HMG-CoA-Reduktase, FPP-Synthase (FPPS) und GGPP-Synthase (GGPPS) mittels qRT-PCR quantifiziert. Es fiel auf, dass die Konzentration an FPPS mRNA in der grauen Substanz aus dem Gehirn von Alzheimer Patienten signifikant erhöht ist. Auch die Menge an GGPPS mRNA in diesem Kompartiment scheint erhöht, obgleich das Signifikanzniveau im zweiseitigen, ungepaarten T-Test nicht erreicht wird. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob Unterschiede in der Gen- oder Proteinexpression bzw. der Enzymaktivitäten die gemessenen Unterschiede in den FPP- und GGPP-Gehalten erklären können. Insbesondere ist auch eine verminderte Expression oder Aktivität der FPP und GGPP übertragenden Enzyme FPP- und GGPP-Transferase denkbar. Dies würde im Endeffekt zu einer reduzierten Prenylierung von Proteinen führen, was zwar gegen die gängige These spricht, allerdings wurden bislang noch keine Gehalte an prenylierten Proteinen im Gehirngewebe von Alzheimer Patienten publiziert.

Die Genexpression der HMG-CoA-Reduktase war unverändert. Allerdings konnten wir in weiterführenden Untersuchungen eine signifikant niedrigere Aktivität dieses wichtigen Syntheseeenzyms in der grauen Substanz von Alzheimer Patienten nachweisen (Daten noch nicht publiziert). Zusammen mit den unveränderten Cholesterolgehalten deutet dieser Befund auf eine mögliche „Feed-back“ Regulation durch die gemessenen, höheren Gehalte an FPP und GGPP bei Alzheimer Patienten hin. Interessanterweise wurde eine solche Feed-back-Regulation in der Tat für das der HMG-CoA-Reduktase nachgeschaltete Enzym, der Mevalonatkinase, berichtet (Hinson, 1997). Möglicherweise wirkt sich diese Regulation auch auf die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase aus, was künftige Untersuchungen bestätigen müssen.

Eine ganze Reihe von Evidenzen deutet darauf hin, dass unsere neuen Befunde im direkten Zusammenhang mit pathophysiologischen Prozessen im Rahmen der Alzheimer Krankheit stehen (Reid, 2007). Experimentelle Befunde legen nahe, dass die Isoprenylierung von kleinen GTPasen eine wichtige Rolle in der Pathologie der Alzheimer Krankheit spielen (Kametani, 2004; Ridley, 2001). Rab Proteine scheinen dabei beim intrazellulären Transport und der Prozessierung von APP beteiligt zu sein (Scheper, 2004). Weiterhin scheinen Ras Proteine mit A β -Signalkaskaden in Verbindung zu stehen (Takai, 2001). Daneben wurden auch andere GTPasen nicht nur mit der Alzheimer Krankheit (Dumanchin, 1999), sondern auch funktionell mit neuronaler und synaptischer Plastizität in Zusammenhang gebracht (Lee, 2002).

Zusammenfassend deuten unsere Daten darauf hin, dass es im Verlauf der Alzheimer Krankheit zu einer Fehlregulation des Mevalonat-Stoffwechsels kommt. Diese Schlussfolgerung wird durch frühere Befunde zu den beiden Isoprenoid-Produkten Dolichol und Ubiquinone gestützt. Beide Isoprenoide werden auch im Mevalonat-Stoffwechselweg synthetisiert. Im Gehirngewebe von Alzheimer Patienten wurden erhöhte Gehalte an Dolicholphosphat und Ubiquinon gefunden, während die Gehalte an Cholesterol weitgehend unverändert waren (Edlund, 1992; Soderberg, 1992). In Übereinstimmung mit diesen Daten und der relevanten Literatur (zusammengefasst in (Wood, 2005)), konnten wir keine Veränderung des Cholesterolgehaltes in post-mortem Proben von Alzheimer Patienten nachweisen (Eckert, 2000)(HOOFF neu). Somit scheint durch unsere Untersuchungen ein veränderter Isoprenoidstoffwechsel als Kandidat für neue therapeutische Strategien identifiziert zu sein.

4.2.3. Statine senken die zerebralen Gehalte von FPP und GGPP

Um die Regulation der beiden Isoprenoide FPP und GGPP in vivo aufzuklären, haben wir initial die Isoprenoid-Spiegel in murinem Gehirngewebe basal und nach drei wöchiger Behandlung mit Simvastatin bestimmt und mit den neuropharmakologischen Effekten des Statins auf die zerebralen Cholesterolspiegel verglichen.

Statine inhibieren die HMG-CoA-Reduktase und hemmen somit neben der zellulären Cholesterolsynthese auch die Bildung von FPP und GGPP. Letztere wird mit den Cholesterol-unabhängigen, pleiotropen Effekten der Statine in Zusammenhang gebracht (Corsini, 1996). Weiterhin wurde auf Grund von Zellkulturuntersuchungen spekuliert, dass erhöhte GGPP-Gehalte die Bildung von neurotoxischem, Alzheimer-relevantem Beta-Amyloid Protein fördern, was in vitro durch Statine verhindert werden konnte (Urano, 2005; Zhou, 2008). Allerdings wurde bisher nicht gezeigt, dass Statine tatsächlich die Gehalte von FPP und GGPP im Gehirn senken können. Daher wurden

Mäuse über 21 Tage mit Simvastatin, wie schon beschrieben, behandelt und die Gehalte an FPP und GGPP mittels HPLC-FD (Hooff, 2008) und an Cholesterol mittels enzymatischer Methoden bestimmt (Eckert, 2001a; Kirsch, 2003b).

Die wichtigsten Resultate im Überblick (Eckert, 2009a)

- Die basalen Spiegel von FPP und GGPP im Gehirn von 3 Monate alten C57/BJ6-Mäusen betragen ca. 25 bzw. 65 pmol/mg Protein.
- Die Applikation von täglich 50 mg Simvastatin/kg Maus über 21 Tage per os senkt sowohl die Isoprenoid- als auch die Cholesterolspiegel im Gehirn.
- Die Gehalte an FPP wurden um ca. 52%, die Gehalte an GGPP um ca. 33% und die Gehalte an Cholesterol um 22% gesenkt.

Wie auch im menschlichen Hirngewebe, finden sich im Gehirn der Maus im Vergleich zu FPP höhere GGPP Gehalte. Dies könnte darauf hindeuten, dass im zellulären Stoffwechsel FPP stärker verbraucht wird als GGPP. Angesichts der Rolle von FPP als Prekursor für Cholesterol und GGPP scheint dies logisch, bedarf allerdings der experimentellen Absicherung. Interessanterweise liegen die basalen Isoprenoidspiegel im Gehirn der Maus wesentlich über den Gehalten im menschlichen Hirngewebe - wobei in beiden Spezies das Verhältnis von FPP zu GGPP vergleichbar ist.

Wir konnten kürzlich erstmals zeigen, dass die orale Verabreichung von 50 mg/kg KG Simvastatin über drei Wochen signifikant die Spiegel an FPP und GGPP im Gehirn von Mäusen senkt und dass die Biosynthese von Isoprenoiden etwas stärker inhibiert wurde als die Bildung von Cholesterol. Die Gehalte an FPP und GGPP wurden um 52%, bzw. um 33% gesenkt. Im Vergleich dazu reduzierten sich die Cholesterolgehalte im Gehirn der Statin-behandelten Mäuse um 22%, was in Übereinstimmung mit unseren früheren Befunden steht (Eckert, 2001a; Johnson-Anuna, 2005; Kirsch, 2003b). Somit konnten wir erstmals den Beleg dafür erbringen, dass Statine auch die Gehalte an FPP und GGPP senken. Darüber wurde bisher zwar auf Grund der Wirkung der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren auf den Cholesterolspiegel spekuliert, aber mangels einer sensitiven analytischen Methode nicht bewiesen (Cole, 2005).

Unsere Daten deuten darauf hin, dass im zentralen Kompartiment FPP, das neben der Bildung von Cholesterol auch zur Modifikation von Proteinen und der Bildung von GGPP dient, stärker umgesetzt wird. Dies könnte die geringere Konzentration von FPP gegenüber GGPP erklären. Es fällt auf, dass die Spiegel an FPP und GGPP im pikomolaren Bereich liegen, gegenüber dem zentralen Gehalt an Cholesterol, das im gleichen Kompartiment im nanomolaren Bereich vorkommt. Da die Umsatzraten von Cholesterol im Gehirn von Nagetieren im Vergleich zum peripheren System sehr gering sind (Dietschy, 2004), reicht möglicherweise eine geringe Menge an FPP aus, um die Cholesterol synthese im Gehirn zu bedienen. Die Umsatzraten der Isoprenoide FPP und GGPP im Gehirn sind bislang unbekannt.

Wie an anderer Stelle ausgeführt, werden Statine als mögliche Therapieoption für die Alzheimer Krankheit diskutiert. Auch wenn die klinische Datenlage einen eindeutigen Nutzen der Statine zur Behandlung der Alzheimer Krankheit nicht belegt, zeigen doch präklinische Untersuchungen, dass Statine in pathophysiologische Mechanismen der Demenz eingreifen können, die zum Teil auch durch die Isoprenylierungen von Proteinen gesteuert werden. So spielen kleine GTPasen eine Rolle beim intrazellulären Transport von APP und dessen Prozessierung, wie auch bei der Bildung von A β und bei der synaptischen Plastizität (Cordle, 2005a). So wurde etwa gezeigt, dass Statine die Assoziation der aktiven Form des gamma-Sekretase-Komplexes

mit Lipid rafts vermindert. Dieser Effekt kann teilweise durch die Ko-Inkubation mit GGPP aufgehoben werden, was eine Beteiligung von GGPP an der Regulation des gamma-Sekretase-Komplexes nahe legt (Urano, 2005). Hierzu passen Befunde, dass GGPP in der Zellkultur den gamma-Sekretase-Komplex stimuliert, was zu einer vermehrten Bildung von A β führt (Zhou, 2008). Weiterhin wurde spekuliert, dass zellulär zwei A β -Pools existieren, die unabhängig voneinander sind, wobei der intrazelluläre Pool durch Isoprenoide und der sekretorische Pool durch Cholesterol reguliert werden (Cole, 2005). Bei der Interpretation der bisher veröffentlichten Daten zu Effekten von GGPP und FPP in Zellkulturexperimenten, ist allerdings zu bedenken, dass die von uns und anderen in Gewebe- und Zellkulturproben durchgeführten Messungen basale FPP- und GGPP-Spiegel im nanomolaren Bereich ergaben (Tong, 2005; Tong, 2008). Inkubationen mit Isoprenoiden wurden allerdings durchweg mit mikromolaren Konzentrationen durchgeführt, was die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die reale physiologische Situation erschwert.

4.2.4. Schlussfolgerung

Mit Hilfe der von uns entwickelten und nach den Richtlinien der amerikanischen Food and Drug Administration validierten Methode zur sensitiven Bestimmung von FPP und GGPP ist es uns erstmals gelungen, eine Fehlregulation des Mevalonat-Biosyntheseweges im Rahmen der Alzheimer Demenz nachzuweisen und mit Hilfe von quantitativen PCR-Befunden mögliche Regulationsmechanismen zu identifizieren. Die von uns gefundenen, erhöhten Spiegel an FPP und GGPP schließen die Lücke zwischen in vitro Befunden zur Beteiligung von kleinen GTPasen an pathophysiologischen Prozessen und postulierter Fehlregulation des Isoprenoid-Stoffwechsels im Rahmen der Alzheimer Demenz. Unsere Befunde haben möglicherweise auch Bedeutung für andere Krankheiten, wie Krebs oder dem Hutchinson-Gilford-Syndrom (Capell, 2008; Swanson, 2006; Vega, 2008), bei denen über erhöhte FPP- und GGPP-Gehalte spekuliert wird. Weiterhin hat sich Simvastatin als potentes pharmakologisches Tool erwiesen, um FPP- und GGPP-Gehalte im Gehirn zu modulieren.

4.3. Die Beeinflussung der Apoptose - Ein neuartiger Wirkungsmechanismus von Simvastatin im Gehirn

4.3.1. Bcl-2-Protein - Ein neues Target für Statine im Gehirn

Es ist bekannt, dass Statine neben ihrer Cholesterol-senkenden Wirkung noch andere, pleiotrope Effekte vermitteln (Corsini, 1996). Da nicht bekannt war, über welchen Mechanismus Statine eine mögliche Neuroprotektion vermitteln, wurden Mäuse über drei Wochen mit Statinen behandelt und mit Hilfe von Genchip-Untersuchungen (Affymetrix chip murine genome U74Av3) die Genexpression von ca. 10.000 Genen im Gehirn der Tiere untersucht. Spezifische Kandidatengene wurden mittels RT-PCR bestätigt. Ebenfalls unbekannt war, ob Statine in pharmakologisch wirksamen Dosen das Zentralnervensystem erreichen. Daher wurden in der gleichen Untersuchung erstmals Statinspiegel im Gehirn mittels LC-MS/MS bestimmt und zur pharmakokinetischen Beurteilung herangezogen (Johnson-Anuna, 2005). Es wurden drei Statine anhand ihres Oktanol/Wasser-Verteilungsverhältnisses ausgesucht, um den Einfluss der physiko-chemischen Stoffeigenschaften auf pharmakologische und pharmakokinetische Faktoren zu untersuchen. Die Lipophilie der gewählten Statine nahm in der Reihenfolge Simvastatin > Lovastatin > Pravastatin ab. Zur Applikation

wurden Statindosen gewählt, die im gewählten Modell bekanntermaßen LDL-Cholesterolspiegel im Plasma senken (Brown, 2002; Law, 2003). In Analogie zu vorausgegangenen Studien wurden die Statine täglich über 21 Tage per Schlundsonde verabreicht (Eckert, 2001a; Kirsch, 2003b). Am Ende der Studie wurden Plasmaproben und die Gehirne gewonnen und weiter untersucht (Johnson-Anuna, 2005).

Die wichtigsten Resultate im Überblick (Johnson-Anuna, 2005):

- Statine verändern die Genexpression im zerebralen Kortex der Maus.
- Die Expression von spezifischen Genen, die mit der Apoptose assoziiert sind (Bcl-2, ET-1, HK1, c-fos, c-myc und H1.2), werden primär durch Simvastatin signifikant beeinflusst.
- Simvastatin erhöht die Expression von Bcl-2 und ET-1, welches für das Vorläufermolekül von Endothelin-1 codiert, signifikant.
- Pravastatin, Lovastatin und Simvastatin wurden im Gehirnhomogenat quantifiziert. Die Spiegel der Wirkstoffe im Gehirn reflektieren deren Lipophilie. Entsprechend wurden für Simvastatin die höchsten Gehalte gefunden.
- Statine akkumulieren nicht im Gehirngewebe. Folgeuntersuchungen haben gezeigt, dass einige Stunden nach einer Einmalgabe kein Wirkstoff mehr nachweisbar ist.

Während Simvastatin und Lovastatin als Laktone Pro-Drugs darstellen (Hamelin, 1998) und auf Grund ihrer Lipophilie die Blut-Hirn-Schranke überschreiten und somit das Gehirn erreichen (Guillot, 1993; Saheki, 1994), sollte Pravastatin als hydrophile Säure das zentrale Kompartiment nicht erreichen (Botti, 1991). Allerdings zeigen eigene Untersuchungen an C57/BJ6-Mäusen, in denen wir erstmals die Gehirnspiegel von Statinen mittels HPLC-MS/MS quantifizierten, dass alle drei Statine das Gehirn erreichen. Die Konzentration von Pravastatin erreicht mit 100 pg/g Feuchtgewicht allerdings nur ein Viertel bzw. ein Drittel der Simvastatin- bzw. Lovastatinkonzentration (Johnson-Anuna, 2005). In Übereinstimmung damit, konnte Pravastatin im CSF von gesunden Probanden nicht nachgewiesen werden (Botti, 1991). Somit scheinen aktive Transportmechanismen, die für die Aufnahme von Pravastatin in periphere Zellen - insbesondere Hepatozyten - sorgen, an der BHS nicht vorhanden zu sein. Unter der Maßgabe, dass auch Pravastatin das Demenzrisiko senkt (Jick, 2000) und dass der zentrale und periphere Cholesteroolpool unabhängig voneinander sind - wie wir und andere zeigen konnten (Dietschy, 2001; Eckert, 2001a; Kirsch, 2003a) - lässt sich doch eine gewisse Kopplung von peripherer und zentraler Lipidhomöostase vermuten. Ein möglicher Mechanismus involviert Hydroxycholesterolderivate, wie 24-OH-Cholesterol, das ausschließlich im Gehirn gebildet wird und 27-OH-Cholesterol, das in der Peripherie entsteht. Beide Cholesterolmetabolite sind in der Lage, die Bluthirnschranke zu überschreiten (Heverin, 2005; Lutjohann, 2003). Allerdings sind die ausgetauschten Mengen im Vergleich zur Gesamtcholesterolmenge des Gehirns verschwindend gering, wie wir kürzlich ausführlich diskutiert haben (Wood, 2007).

Unsere Daten deuten auf die Beteiligung von unterschiedlichen Stoffwechselwegen bei neuroprotektiven Effekten von Statinen hin: Die Behandlung von Mäusen mit den lipophilen Vertretern Lovastatin und Simvastatin aber auch mit dem hydrophilen Pravastatin, änderte die Expression von Genen im zerebralen Kortex, die eine Rolle bei der Apoptose, dem Zellwachstum und zellulären Signal- und Transportprozessen spielen (Johnson-Anuna, 2005). Ein neuer und möglicherweise bedeutsamer Befund war, dass Simvastatin signifikant die Expression eines der wichtigsten anti-

apoptotischen Proteine, dem B-Zell Lymphom/Leukämie 2 (Bcl-2) Protein erhöhte. Lovastatin und Pravastatin steigern zwar auch die Bcl-2-Expression, allerdings wurden die Signifikanzkriterien nicht erfüllt. Bcl-2 und andere anti-apoptotischen Mitglieder der gleichnamigen Proteinfamilie spielen eine ausschlaggebende Rolle beim neuronalen Überleben (Akhtar, 2004).

4.3.2. Simvastatin induziert die Expression von Bcl-2 und schützt neuronale Zellen in vitro

Für die folgenden Untersuchungen wurde Simvastatin gewählt, da für den Wirkstoff in den vorausgegangenen Untersuchungen, die höchsten Gehirnspiegel und die stärksten Effekte auf die Expression von Genen im Gehirn gefunden wurde (Johnson-Anuna, 2005). Die nächsten Experimente wurden initiiert um zu überprüfen, ob Simvastatin über eine Erhöhung der Bcl-2-Proteinmenge primäre kortikale Neurone der Maus vor Exzitotoxizität schützt. Primäre Neurone der Maus und humane SH-SY5Y-Neuroblastomazellen wurden mit einer geringen Konzentration an Simvastatin (100 nM) vorinkubiert und dann mit G3139 behandelt, einer Substanz, die bekanntlich Bcl-2 Spiegel reduziert und Zelltod induziert. Bei G3139 handelt es sich um ein Antisense-Oligonukleotid, das direkt mit der Bcl-2 mRNA interagiert und für die Anwendung im Rahmen der Krebstherapie klinisch getestet wird (Dai, 2005).

Die wichtigsten Resultate im Überblick (Johnson-Anuna, 2007):

- Die chronische Behandlung von primären kortikalen Neuronen der Maus mit Simvastatin führt zu einem Anstieg der Bcl-2 mRNA und Proteingehalte.
- Zur Protektion von neuronalen Zellen in der Kultur bedarf es einer chronischen Inkubation mit Simvastatin.
- Das Bcl-2 Antisense-Oligonukleotid G3139 führt zu einer deutlichen Abnahme der Bcl-2-Proteingehalte in SH-SY5Y-Neuroblastomzellen.
- Vorinkubation von Neuroblastomzellen mit G3139 hebt die Simvastatin-induzierte Protektion gegenüber oligomeren Amyloid-Beta Peptid auf.
- Simvastatin stimuliert die Genexpression von ET-1.
- Externes ET-1 Protein induziert die Bildung von Bcl-2-Protein in vitro.
- Die Effekte von Simvastatin lassen sich NICHT durch Mevalonat aufheben, was darauf hinweist, dass die zu Grunde liegenden biochemischen Mechanismen außerhalb des Mevalonat-Biosyntheseweges liegen.

Die Vorinkubation der Zellen mit Simvastatin reduzierte deutlich die Freisetzung des Zytotoxizitätsmarkers LDH nach der Behandlung mit Toxinen. Gleichzeitig wurden die mRNA- und Protein-Gehalte von Bcl-2 deutlich erhöht. Beide Effekte, Protektion und Bcl-2-Expression, wurden durch G3139 antagonisiert, was den Schluss zulässt, dass die neuroprotektive Wirkung von Simvastatin über eine Hochregulation der Bcl-2-Expression vermittelt wird (Johnson-Anuna, 2007). Interessanterweise ließen sich die Effekte von Simvastatin nicht durch eine Präinkubation mit Mevalonat, dem Produkt der HMG-CoA-Reduktase, maskieren. Dies spricht für einen Cholesterolumabhängigen Wirkmechanismus außerhalb des Mevalonat-Stoffwechselweges.

Unsere Befunde, dass Simvastatin sowohl in vitro als auch in vivo die Bcl-2-Genexpression erhöht, werfen die Frage nach dem verantwortlichen Transkriptionsmechanismus auf (Johnson-Anuna, 2005). Eine mögliche Antwort lautet, dass Endothelin-1 (ET-1) an der transkriptionellen Aktivierung von Bcl-2 beteiligt ist:

Mit zwei unterschiedlichen Techniken konnten wir zeigen, dass Simvastatin signifikant die Genexpression von ET-1 im zerebralen Cortex und dem Hippokampus der Maus erhöht (Johnson-Anuna, 2005). Interessanterweise führt die Stimulation von Zellen mit ET-1 zu einer erhöhten Bcl-2 Genexpression, welche die Wasserstoffperoxid-induzierte Apoptose in Kardiomyozyten verhindert. Nachfolgende Arbeiten zeigten, dass dieser Effekt auf der ET-1 vermittelten Erhöhung der intrazellulären Kalziumspiegel zurückzuführen ist. Dabei bindet ET-1 an seinen Rezeptor, was in der Folge in einer Aktivierung von Calcineurin mündet. Calcineurin dephosphoryliert den zytosolischen Transkriptionsfaktor NFAT, der dann in den Zellkern translokalisiert und an einen Bcl-2-Promoter mit zwei NFAT Bindungsdomänen bindet (Kawamura, 2004).

Es sprechen einige Evidenzen dafür, dass dieses Szenario auch für die beobachteten neuroprotektiven Effekte von Simvastatin verantwortlich ist. So zeigte sich, dass NFAT neuroprotektiv ist. Werden Neurone mit Lithium inkubiert, das die NFAT Exportkinase GSK3 inhibiert, so wird der nukleäre Export von NFAT reduziert und die Zellviabilität steigt unter oxidativem Stress an. In diesem Zusammenhang wurde eine Beteiligung von Bcl-2-abhängigen Mechanismen an den neuroprotektiven Effekten von Lithium diskutiert (Ghribi, 2002; Youdim, 2004). Dafür sprechen Befunde, dass eine Inkubation von PC12-Zellen mit Lithium die zelluläre Bcl-2-Menge erhöht und die Anfälligkeit gegenüber A β induziertem Zelltod vermindert (Wei, 2000).

4.3.3. Simvastatin vermittelt über Bcl-2 neuroprotektive Wirkungen in vivo

In der nächsten Untersuchung wurde analog zu den vorausgegangenen Mausstudien über drei Wochen Simvastatin an Meerschweinchen oral appliziert. Die neuroprotektive Wirksamkeit des Statins wurde dann an akut dissoziierten Gehirnzellen ex vivo getestet. Meerschweinchen wurden gewählt, da diese einen Lipidstoffwechsel aufweisen, der dem des Menschen sehr ähnlich ist und somit Meerschweinchen das Standardmodell zur pharmakologischen Testung von Substanzen mit Effekten auf den Lipidstoffwechsel darstellen (West, 2004). Darüber hinaus sollte gezeigt werden, dass die an der Maus evaluierten Effekte Spezies-unabhängig sind.

Die wichtigsten Resultate im Überblick (Franke, 2007):

- Die chronische Verabreichung von Simvastatin senkt signifikant die Plasmacholesterolspiegel, wobei das Verhältnis LDL/HDL zu Gunsten von HDL verschoben wird.
- Simvastatin beeinflusst die Cholesterolspiegel im Gehirn der behandelten Tiere NICHT. Allerdings ist die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase im Gehirn nach der Auswaschphase des Pharmakons deutlich erhöht, was eine pharmakologische Interaktion mit dem Enzym im Gehirn nahelegt.
- Simvastatin erhöht die Menge an anti-apoptischen Bcl-2-Protein im Gehirn von Meerschweinchen, gleichzeitig reduziert die Behandlung die Menge an pro-apoptischem Bax-Protein.
- Dissoziierte Gehirnzellen von mit Simvastatin behandelten Meerschweinchen erweisen sich als weniger vulnerabel gegenüber mitochondrialer Dysfunktion, die durch HA 14-1, einem Bcl-2-Antagonisten, oder SNP, einem NO-Donor, induziert wurde.
- Dissoziierte Gehirnzellen von mit Simvastatin behandelten Meerschweinchen zeigen keine Aktivierung der Apoptose-relevanten Caspasen 3 oder -9 nach einer Inkubation mit HA 14-1.

Die Ergebnisse zeigen, dass Simvastatin auch im Tiermodell neuroprotektive Effekte vermittelt, dabei wurde Bcl-2 als Target bestätigt. Die Statinbehandlung vermindert die Vulnerabilität von dissoziierten Gehirnzellen gegenüber der mitochondrialen Dysfunktion und gegenüber Caspase-vermittelter Apoptosemechanismen. Interessanterweise sind die beobachteten Effekte, analog zu den in vitro Untersuchungen, Cholesterin-unabhängig. Schon frühere Untersuchungen an Meerschweinchen zeigen, dass Statine die zentralen Cholesterinpiegel nicht beeinflussen (Fassbender, 2001).

Bcl-2 repräsentiert eines der in der Zelltodforschung am meisten untersuchten Proteine. Erstmals wurde es 1984 als onkogenes Produkt in folliculären Lymphomen entdeckt (Tsujiyama, 1984). Bcl-2 befähigt Zellen zum Überleben, im Gegensatz zu den zuvor entdeckten pro-apoptischen Onkogenen. Im Rahmen der Apoptose findet sich eine Abnahme an Bcl-2-Protein (Wang, 1999). Bcl-2 ist ein Mitglied der gleichnamigen Bcl-2-Familie, die aus pro- und anti-apoptischen Proteinen besteht und in direkter Verbindung zu anderen Mitgliedern dieser Familie steht, wie Bcl-XL oder Bcl-w. Zusammen schützen diese anti-apoptischen Proteine Zellen vor einer Reihe von zytotoxischen Ereignissen, wie Zytokin-Mangel, UV- und Gamma-Strahlung oder Zytostatika (Cory, 2003). Die Notwendigkeit von Bcl-2 für das Überleben von Zellen, wurde dementsprechend von vielen Arbeitsgruppen gezeigt. Dabei wurde auch bestätigt, dass Bcl-2 für das Überleben von Neuronen essentiell ist, was für die vorliegende Arbeit von besonderer Bedeutung ist (Motoyama, 1999; Nakayama, 1994). Die Überexpression von Bcl-2 in transgenen Mäusen schützt Neurone von ischämischen Insulten (Martinou, 1994). Weiterhin kann Bcl-2 in Modellen der Neurodegeneration kompensatorisch gegen oxidative Zellschäden wirken (Migheli, 1994).

Die der anti-apoptischen Wirkung von Bcl-2 zugrunde liegenden, zellulären Abläufe sind Gegenstand intensiver wissenschaftlicher Forschung. Es scheint aber so zu sein, dass komplexe Caspase-abhängige und -unabhängige Mechanismen involviert sind. So verhindert zum Beispiel Bcl-2 die Aktivierung von Bax durch eine Heterodimerisierung (Yin, 1995), was die Oligomerisierung von Bax und Bak hemmt. Somit wird die Bildung von Poren in der Mitochondrienmembran verhindert, durch die Cytochrom C freigesetzt wird und Caspasen stimuliert. Ein anderer Mechanismus geht von der Inhibition der mitochondrialen Freisetzung des Apoptose-induzierenden Faktors (AIF) aus, der Caspase-unabhängig die Apoptose einleiten kann: AIF wandert von den Mitochondrien in den Zellkern, wo er die Fragmentierung der DNA, die Kondensation von Chromatiden und somit den Zelltod induziert (Daugas, 2000; Marzo, 1998). So wurde in Untersuchungen an Neuronen der Maus gezeigt, dass oxidativer Stress zu einer vermehrten Translokation von AIF von den Mitochondrien in den Zellkern führt und dass der daraus resultierende Zelltod durch eine Überexpression von Bcl-2 verhindert werden konnte (Cregan, 2002; Wang, 2004).

4.3.5. Schlussfolgerung

Das anti-apoptische B Zell Lymphom/Leukämie-2 Protein (Bcl-2) wurde kürzlich von uns als neues Target für Statine im Gehirn identifiziert. Unsere aktuellen in vitro und in vivo Untersuchungen zeigen, dass Simvastatin nicht nur die Bildung Bcl-2-Protein anregt, sondern über diesen Mechanismus neuroprotektive Effekte vermittelt. Zum Beispiel sind dissoziierte Hirnzellen von Simvastatin-behandelten Meerschweinchen deutlich weniger vulnerabel gegenüber mitochondrialer Dysfunktion und der Aktivierung von Caspasen. Wir postulieren, dass die Simvastatin induzierte Zunahme

der Bcl-2-Genexpression, die wir sowohl in vitro als auch in vivo beobachtet haben, zumindest teilweise auf dem ET-1/Calcineurin/NFAT Biosyntheseweg beruht. Unsere Untersuchungen zu anti-apoptotischen Mechanismen von Simvastatin werden neue Einblicke für den potentiellen Nutzen der Statine bei neurologischen und neurodegenerativen Erkrankungen liefern, bei deren Pathogenese der programmierte Zelltod eine Rolle spielt.

5. Zusammenfassung

Der demographische Wandel in den Industrienationen der westlichen Welt stellt deren Gesellschaften vor neue sozio-ökonomische Herausforderungen. Die Inzidenz für altersbedingte Krankheiten steigt in der immer älter werdenden Bevölkerung, was insbesondere für Erkrankungen des Gehirns zutrifft. Im Gegensatz zu allen anderen Geweben des menschlichen Körpers findet im Gehirn kaum Regeneration von Neuronen statt, auch wenn für bestimmte Areale die Neubildung von Nervenzellen aus neuronalen Stammzellen gezeigt wurde. Hält man sich vor Augen, dass das im Laufe des Lebens geknüpfte neuronale Netzwerk, das individuelle Wissen, die Gefühle, die Erfahrungen und die Erinnerungen des Menschen trägt, so wird deutlich, dass Veränderungen in der neuronalen Verschaltung, sei es durch Alterungs- und/oder Krankheitsprozesse, zu einem Wandel des bewussten Erlebens führen. Darüber hinaus können natürlich auch alle Steuerungsfunktionen des Gehirns betroffen sein, die nicht dem Willen unterliegen. Beispiele hierfür sind Altersvergesslichkeit oder kognitive Dysfunktion im Rahmen der Vaskulären oder Alzheimer Demenz. Gelänge es den physiologischen Alterungsprozess des Gehirns hinauszuzögern, so würden nicht nur altersbedingte Ausfallerscheinungen später auftreten, sondern auch die Inzidenz bestimmter Gehirnerkrankungen sich mindern. Physiologische Alterungsprozesse an Neuronen betreffen insbesondere die neuronalen Plasmamembranen. Auch pathophysiologische Veränderungen finden an diesem Zellkompartiment statt. Diese sind geprägt von Veränderungen der Lipidkomposition und von oxidativen Veränderungen. Da die Plasmamembran nicht nur die Zelle nach außen abschirmt, sondern auch aktiv in Signaltransduktionsprozesse involviert ist, beeinträchtigen Membranveränderungen auch die Kommunikation von Nervenzellen.

Im Vergleich mit anderen Organen lassen sich, bezogen auf das Feuchtgewicht, bei den meisten Spezies die höchsten Cholesterolkonzentrationen im Gehirn messen. Cholesterol ist ein integraler Bestandteil des Gehirns und trägt zur Stabilität neuronaler Membranen bei. Es ist essentiell für Proteinfunktionen und dient als Prekursor für Steroide. Neben Analogien zu Funktionen in der Peripherie, existieren entscheidende Unterschiede in der Dynamik des Sterols im zentralen Nervensystem, welche die besonderen Eigenschaften von Cholesterol im Gehirn bedingen und die es zu beachten gilt. Diese Unterschiede betreffen unter anderem das Verhältnis von verestertem und unverestertem Cholesterol, die Apolipoprotein- und Lipoproteinverteilung und das Vorkommen des Oxysterols 24S-Hydroxycholesterol. Der größte Teil unseres Wissens über die Eigenschaften von Cholesterol im Gehirn basiert auf Untersuchungen zum Gesamtgehalt des Sterols im Gewebe. Es wird aber immer deutlicher, dass nicht die Gesamtmenge an Cholesterol, sondern seine Verteilung in diskreten Domänen entscheidende Bedeutung für seine zellulären Funktionen hat. Wie in der Peripherie kann es auch im Gehirn zu Dysregulation der Cholesterolhomöostase kommen, die sich in Fehlfunktionssyndromen, angeborenen Defekten oder Krankheiten wie der Niemann-Pick Typ C Krankheit manifestieren. Weiterhin deuten Evidenzen auf eine Rolle von Cholesterol bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Chorea Huntington oder Alzheimer Demenz und bei Gehirnalterungsprozessen hin.

Unsere Untersuchungen an post-mortem Proben von Alzheimer Patienten konnten wiederholt belegen, dass die Gesamtmenge an Cholesterol in neuronalen Membranen beziehungsweise im Gehirnhomogenat aus Hippokampus- und Kortexgewebe nicht krankheitsbedingt verändert ist. Ebenfalls unverändert fanden wir

die Cholesterolkonzentration im Gehirngewebe von Apolipoprotein E (Apo E) knock-out-Mäusen. Diese Tiere zeigten allerdings massiv erhöhte Cholesterolspiegel im Plasma, was Befunde bestätigt, dass die zentrale Cholesterolhomöostase im Wesentlichen unabhängig vom peripheren System ist. Interessanterweise konnten wir bei Apo E knock-out-Mäusen die zentralen Cholesterolspiegel nicht mit Lovastatin beeinflussen, was unter anderem Anlass für eine nähere wissenschaftliche Betrachtung des Apolipoproteins war. Apo E stellt ein wichtiges Transportmolekül für Cholesterol im Körper dar, im Gehirn dient es vor allem dem Transfer von Cholesterol von Astrozyten zu Neuronen. Die Genvariante Apo E4 stellt einen robusten Risikofaktor für die Alzheimer Demenz dar. Unsere Untersuchungen zeigten, dass Apo E4 bzw. das Fehlen von Apo E möglicherweise physiologische Prozesse dahingehend beeinflusst, dass pathophysiologische Vorgänge im Rahmen der Alzheimer Demenz gefördert werden. Es existieren Hinweise, dass möglicherweise nicht die Gesamtmenge an Cholesterol, sondern dessen Verteilung im Gehirn für pathologische Prozesse entscheidend ist. Auch hier scheint Apo E eine Rolle zu spielen. So weisen etwa synaptosomale Plasmamembranen aus dem Gehirn von jungen Apo E4-Mäusen die gleiche Zunahme an Cholesterol im exofazialen Membranblatt auf, wie alte Apo E3-Mäuse. In diesem Zusammenhang sei darauf verwiesen, dass das Alter der wichtigste Risikofaktor für die AD darstellt. Unsere eigenen Untersuchungen an jungen, mittelalten und alten transgenen Tieren, die unterschiedliche Varianten des Apo E Gens tragen, zeigten dass Lipid rafts aus dem Gehirn alter Apo E4 Tiere signifikant höhere Cholesterolgehalte aufweisen. Apo E scheint auch essentiell für die Wirkung von Agonisten des nukleären Leber-X-Rezeptors zu sein. Unsere Daten aus Zellversuchen zeigen, dass pharmakologische Effekte des Agonisten nur in Gegenwart des Apolipoproteins zu beobachten sind und mit einer verstärkten Expression von ABC-A1-Transportern einhergehen. Unsere Untersuchungen zur Aktivität von ABC-B1-Transportern belegen, dass die optimale Konzentration von Cholesterol in der Membran für die Funktion von Transportproteinen wichtig ist. Diese Ergebnisse stehen im direkten Zusammenhang mit der Verteilung von Cholesterol innerhalb der Plasmamembran, da ABC-Transporter in der Modulation des membranären Cholesterols involviert zu sein scheinen.

Epidemiologische Untersuchungen haben gezeigt, dass Patienten die Statine einnehmen, ein signifikant reduziertes Risiko haben, an der Alzheimer'schen Krankheit zu erkranken. Allerdings konnten in der Folge initiierte prospektive Studien, überwiegend keinen positiven Effekt auf die Inzidenz der Alzheimer Krankheit nachweisen. Vor dem Hintergrund, dass die Halbwertszeit des Sterol-Pools im Gehirn des adulten Menschen ca. 4,6 Jahren beträgt, schützt möglicherweise nur eine langfristige Statineinnahme vor pathologischen Prozessen. Aktuelle Studien mit Beobachtungszeiträumen von über fünf Jahren belegen einen protektiven Effekt der langfristigen Einnahme von Statinen hinsichtlich kognitiver Beeinträchtigungen oder Demenzen. Für andere neurologische Zustände wie dem Schlaganfall, der Multiplen Sklerose oder der Rückenmarksverletzung, ist die Wirksamkeit von Statinen klinisch belegt.

Bis dato ist nur sehr wenig über die Neuropharmakologie der Statine bekannt. Im Rahmen unserer Untersuchungen zu den Effekten der Statine auf neuronale Membranen, konnten wir erstmals zeigen, dass Statine nicht nur den Cholesterolgehalt von neuronalen murinen Membranen senken, sondern auch die Verteilung von Cholesterol innerhalb des Membranblattes verändern. Sehr wahrscheinlich stehen diese Veränderungen mit der verminderten Bildung von neurotoxischem Beta-Amyloid (A β)

in Zusammenhang. A β wird an der Zellmembran durch mehrere Sekretasen aus dem membranständigen Amyloid-Precursor-Protein (APP) freigesetzt. Es ist bekannt, dass die physiko-chemischen Eigenschaften von neuronalen Membranen die Prozessierung von APP und damit die Bildung von neurotoxischem A β beeinflussen. Die vermehrte Bildung von A β wird als einer der wesentlichen Faktoren für die Pathogenese der Demenz vom Alzheimer Typ angesehen.

Seit einiger Zeit existieren im Rahmen der Alzheimer Demenz Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Bildung von A β und der intrazellulären Lipidhomöostase. Auch unsere Ergebnisse, dass PS-1 als Komponente des γ -Sekretase-Komplexes die Anreicherung von Cholesterol und Sphingomyelin in neuronalen Membranen und hier vor allem in Lipid rafts induziert, unterstützen diese Befunde.

In einem zellulären Modell der Alzheimer'schen Krankheit konnten wir kürzlich bestätigen, dass die Reduktion des Cholesterolgehaltes in den Zellmembranen zu einer Reduktion der A β Bildung führt. Diese Reduktion korreliert mit einer Änderung der Membranfluidität. Durch den Einsatz von pharmakologischen Tools konnten wir zeigen, dass die Membranfluidität auch unabhängig vom Cholesterolgehalt die Bildung von neurotoxischen A β determiniert. Eine verminderte Membranfluidität, wie sie auch im Laufe der Gehirnalterung zu verzeichnen ist, führt somit vermutlich zu einer verstärkten Bildung von A β . Möglicherweise tragen unsere Ergebnisse zur Erklärung des Auftretens der altersbedingten Demenz bei. Unsere Untersuchungen haben die physiko-chemischen Eigenschaften der neuronalen Membran klar als Target möglicher Präventionsansätze identifiziert. Unsere Untersuchungen haben aber auch gezeigt, dass die APP-Prozessierung unabhängig von einer Statin-induzierten Cholesterolsenkung moduliert werden kann. Dass die pharmakologische Beeinflussung der APP-Prozessierung durch Statine nicht zwingend an eine Senkung der Cholesterolgehalte in der Membran gekoppelt ist, wurde schon in anderen Untersuchungen gezeigt. So wurden etwa die A β -Spiegel im Gehirn von Meerschweinchen, die mit einer hohen Simvastatindosis behandelt wurden, gesenkt. Dabei blieb jedoch der zentrale Cholesterolgehalt unverändert. Letzteres konnten wir in eigenen Untersuchungen bestätigen. Diese Ergebnisse deuten ebenfalls darauf hin, dass Statine ihre Wirkung möglicherweise nicht über eine simple Cholesterolsenkung im zentralen Kompartiment entfalten.

Um weitere, unbekannte pharmakologische Effekte der Statine im Gehirn aufzuklären haben wir DNA-Mikroarray-Untersuchungen durchgeführt und festgestellt, dass Statine die Expression von Genen verändern, die in die Apoptose eingreifen. Wir haben diesen Aspekt näher beleuchtet und konnten *in vitro* zeigen, dass Simvastatin das anti-apoptotische Bcl-2-Protein hoch reguliert und primäre Hirnzellen vor toxischen Schäden durch A β oder NMDA schützt. Auch im Tiermodell fanden wir eine signifikante Erhöhung der Bcl-2-Spiegel im Gehirn der behandelten Meerschweinchen. Interessanterweise wurde das pro-apoptotische Bax-Protein signifikant erniedrigt. An dissoziierten Hirnzellen von behandelten Tieren konnten wir zeigen, dass die Statin-induzierte Modulation der zellulären Apoptosemechanismen auch funktionell zu einer Neuroprotektion führt: Simvastatin reduziert signifikant die negativen Effekte auf das mitochondriale Membranpotential ausgelöst durch SNP, das NO-Radikale generiert und von HA14-1, einem Bcl-2-Antagonisten. Weiterhin konnten wir zeigen, dass die Statinbehandlung die Aktivierung von pro-apoptotischer Caspase-3 und Caspase-9 im Gehirn von Meerschweinchen verhindert. Dieser neuartige zentrale Wirkmechanismus der Statine ist bedeutsam für neurodegenerative Erkrankungen, wie beispielsweise aktuelle Untersuchungen zu Chorea Huntington belegen. Somit konnte in der

vorgelegten Arbeit ein völlig neuer, neuroprotektiver Wirkmechanismus von Statinen aufgeklärt werden, der im Gehirn nicht nur den Cholesterolfstoffwechsel beeinflusst, sondern auch vor Apoptose schützt.

Viele pleiotrope, Cholesterolf-unabhängige Effekte der Statine, werden mit einer Hemmung der Isoprenoidbildung erklärt. Tatsächlich führt die Blockade der HMG-CoA-Reduktase durch Simvastatin zur Inhibition der Isoprenoid-Synthese, wie wir kürzlich erstmals *in vivo* zeigen konnten. Die dem Mevalonat-Stoffwechselweg entstammenden Isoprenoide Farnesyl- (FPP) und Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) werden von Zellen zur posttranslationalen Modifikation von Proteinen der Ras- und Rho-Familien verwendet, um diese in Membranen zu verankern. Dieser Prozess ist für die Funktion der Proteine, denen eine Rolle bei der Pathogenese der Alzheimer Demenz, aber auch von Tumorerkrankungen zugeschrieben wird, essentiell. Mangels einer sensitiven Methode zur Quantifizierung wurde über erhöhte Werte von Isoprenoiden im Gehirn von Alzheimer Patienten zwar spekuliert, Gehalte konnten aber bisher nicht bestimmt werden. Kürzlich ist uns nach Etablierung und Validierung einer sensitiven Methode zur Bestimmung von FPP und GGPP gelungen, erhöhte Gehalte dieser Isoprenoide im Gehirn von verstorbenen Alzheimer Patienten nachzuweisen. Interessanterweise war der Cholesterolgehalt unverändert, was auf eine spezifische, krankheitsrelevante Veränderung innerhalb des Mevalonatstoffwechselwegs hindeutet. Untersuchungen zur Genexpression im gleichen Gewebe haben das Enzym Farnesylpyrophosphat-Synthase als neues mögliches Target für eine Alzheimer Therapie identifiziert.

6. Referenzen

- Abad-Rodriguez, J., Ledesma, M. D., Craessaerts, K., Perga, S., Medina, M., Delacourte, A., Dingwall, C., De Strooper, B., Dotti, C. G., 2004. Neuronal membrane cholesterol loss enhances amyloid peptide generation. *J Cell Biol.* 167, 953-960.
- Abildayeva, K., Jansen, P. J., Hirsch-Reinshagen, V., Bloks, V. W., Bakker, A. H., Ramaekers, F. C., de, V. J., Groen, A. K., Wellington, C. L., Kuipers, F., Mulder, M., 2006. 24(S)-hydroxycholesterol participates in a liver X receptor-controlled pathway in astrocytes that regulates apolipoprotein E-mediated cholesterol efflux. *J Biol Chem.* 281, 12799-12808.
- Adams, J. U., 2006. Lipid rafts' failure to launch. *Scientist.* 20, 67-67.
- Akhtar, R. S., Ness, J. M., Roth, K. A., 2004. Bcl-2 family regulation of neuronal development and neurodegeneration. *Biochim.Biophys.Acta.* 1644, 189-203.
- Amarenco, P., Labreuche, J., Lavalley, P., Touboul, P. J., 2004. Statins in stroke prevention and carotid atherosclerosis - Systematic review and up-to-date meta-analysis. *Stroke.* 35, 2902-2909.
- Amarenco, P., 2007. Atorvastatin in prevention of stroke and transient ischaemic attack. *Expert.Opin.Pharmacother.* 8, 2789-2797.
- Anderson, R. G., 1993. Caveolae: where incoming and outgoing messengers meet. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 90, 10909-10913.
- Anderson, R. G., Jacobson, K., 2002. A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science.* 296, 1821-5.
- Andersson, M., Elmberger, P. G., Edlund, C., Kristensson, K., Dallner, G., 1990. Rates of cholesterol, ubiquinone, dolichol and dolichyl-P biosynthesis in rat brain slices. *FEBS Lett.* 269, 15-18.
- Apfel, R., Benbrook, D., Lernhardt, E., Ortiz, M. A., Salbert, G., Pfahl, M., 1994. A novel orphan receptor specific for a subset of thyroid hormone-responsive elements and its interaction with the retinoid/thyroid hormone receptor subfamily. *Mol Cell Biol.* 14, 7025-35.
- Appels, N. M., Rosing, H., Stephens, T. C., Hughes, A., Schellens, J. H., Beijnen, J. H., 2006. Absolute quantification of farnesylated Ras levels in complex samples using liquid chromatography fractionation combined with tryptic digestion and electrospray tandem mass spectrometry. *Anal Biochem.* 352, 33-40.
- Arvanitakis, Z., Schneider, J. A., Wilson, R. S., Bienias, J. L., Kelly, J. F., Evans, D. A., Bennett, D. A., 2008. Statins, incident Alzheimer disease, change in cognitive function, and neuropathology. *Neurology.*
- Auboeuf, D., Rieusset, J., Fajas, L., Vallier, P., Frering, V., Riou, J. P., Staels, B., Auwerx, J., Laville, M., Vidal, H., 1997. Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes.* 46, 1319-27.
- Austen, B. M., Sidera, C., Liu, C., Frears, E., 2003. The role of intracellular cholesterol on the processing of the beta-amyloid precursor protein 4. *J Nutr.Health Aging.* 7, 31-36.
- Avdulov, N. A., Chochina, S. V., Igbavboa, U., Warden, C. S., Vassiliev, A. V., Wood, W. G., 1997. Lipid binding to amyloid beta-peptide aggregates: Preferential binding of cholesterol as compared with phosphatidylcholine and fatty acids. *J.Neurochem.* 69, 1746-1752.

- Bae, S. H., Lee, J. N., Fitzky, B. U., Seong, J., Paik, Y. K., 1999. Cholesterol biosynthesis from lanosterol. Molecular cloning, tissue distribution, expression, chromosomal localization, and regulation of rat 7-dehydrocholesterol reductase, a Smith-Lemli-Opitz syndrome-related protein. *J.Biol.Chem.* 274, 14624-14631.
- Barakat, S., Gayet, L., Dayan, G., Labialle, S., Lazar, A., Oleinikov, V., Coleman, A. W., Baggetto, L. G., 2005. Multidrug-resistant cancer cells contain two populations of P-glycoprotein with differently stimulated P-gp ATPase activities: evidence from atomic force microscopy and biochemical analysis. *Biochem J.* 388, 563-71.
- Barnidge, D. R., Dratz, E. A., Martin, T., Bonilla, L. E., Moran, L. B., Lindall, A., 2003. Absolute quantification of the G protein-coupled receptor rhodopsin by LC/MS/MS using proteolysis product peptides and synthetic peptide standards. *Anal Chem.* 75, 445-51.
- Beffert, U., Aumont, N., Dea, D., Lussier-Cacan, S., Davignon, J., Poirier, J., 1998a. Beta-amyloid peptides increase the binding and internalization of apolipoprotein E to hippocampal neurons. *J.Neurochem.* 70, 1458-1466.
- Beffert, U., Danik, M., Krzywkowski, P., Ramassamy, C., Berrada, F., Poirier, J., 1998b. The neurobiology of apolipoproteins and their receptors in the CNS and Alzheimer's disease. *Brain Res.Brain Res.Rev.* 27, 119-142.
- 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.
- Bickel, P. E., Scherer, P. E., Schnitzer, J. E., Oh, P., Lisanti, M. P., Lodish, H. F., 1997. Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins. *J Biol Chem.* 272, 13793-802.
- Bifulco, M., Malfitano, A. M., Marasco, G., 2008. Potential therapeutic role of statins in neurological disorders. *Expert Rev Neurother.* 8, 827-37.
- Bjorkhem, 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 18O2 techniques in vivo and in vitro. *J.Biol.Chem.* 272, 30178-30184.
- Bjorkhem, 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.
- Blanchette-Mackie, E. J., Dwyer, N. K., Amende, L. M., Kruth, H. S., Butler, J. D., Sokol, J., Comly, M. E., Vanier, M. T., August, J. T., Brady, R. O., et al., 1988. Type-C Niemann-Pick disease: low density lipoprotein uptake is associated with premature cholesterol accumulation in the Golgi complex and excessive cholesterol storage in lysosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85, 8022-6.
- Bodovitz, S., Klein, W. L., 1996. Cholesterol modulates alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein. *J Biol.Chem.* 271, 4436-4440.
- Boekholdt, S. M., Sacks, F. M., Jukema, J. W., Shepherd, J., Freeman, D. J., McMahon, A. D., Cambien, F., Nicaud, V., de Grooth, G. J., Talmud, P. J., Humphries, S. E., Miller, G. J., Eiriksdottir, G., Gudnason, V., Kauma, H., Kakko, S., Savolainen, M. J., Arca, M., Montali, A., Liu, S., Lanz, H. J., Zwinderman, A. H., Kuivenhoven, J. A., Kastelein, J. J., 2005. Cholesteryl ester transfer protein TaqIB variant, high-density lipoprotein cholesterol levels, cardiovascular risk, and efficacy of pravastatin treatment: individual patient meta-analysis of 13,677 subjects. *Circulation.* 111, 278-87.

- Bogman, K., Peyer, A. K., Torok, M., Kusters, E., Drewe, J., 2001. HMG-CoA reductase inhibitors and P-glycoprotein modulation. *Br.J.Pharmacol.* 132, 1183-1192.
- Botti, R. E., Triscari, J., Pan, H. Y., Zayat, J., 1991. Concentrations of pravastatin and lovastatin in cerebrospinal fluid in healthy subjects. *Clin.Neuropharmacol.* 14, 256-261.
- Bouillot, C., Prochiantz, A., Rougon, G., Allinquant, B., 1996. Axonal amyloid precursor protein expressed by neurons in vitro is present in a membrane fraction with caveolae-like properties. *J.Biol.Chem.* 271, 7640-7644.
- Boyles, J. K., Zoellner, C. D., Anderson, L. J., Kosik, L. M., Pitas, R. E., Weisgraber, K. H., Hui, D. Y., Mahley, R. W., Gebicke-Haerter, P. J., Ignatius, M. J., Shooter, E. M., 1989. A role for apolipoprotein E, apolipoprotein A-I, and low density lipoprotein receptors in cholesterol transport during regeneration and remyelination of the rat sciatic nerve. *J.Clin.Invest.* 83, 1015-1031.
- Broquet, A. H., Thomas, G., Masliah, J., Trugnan, G., Bachelet, M., 2003. Expression of the molecular chaperone Hsp70 in detergent-resistant microdomains correlates with its membrane delivery and release. *J Biol Chem.* 278, 21601-6.
- Brown, D. A., London, E., 1998a. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 14:111-36, 111-136.
- Brown, D. A., London, E., 1998b. Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. *J.Membr.Biol.* 164, 103-114.
- Brown, D. A., London, E., 2000. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J.Biol.Chem.* 275, 17221-17224.
- Brown, D. A., 2006. Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals. *Physiology (Bethesda).* 21, 430-439.
- Brown, M. S., Goldstein, J. L., Siperstein, M. D., 1973. Regulation of cholesterol synthesis in normal and malignant tissue. *Fed Proc.* 32, 2168-73.
- Brown, M. S., Goldstein, J. L., 1980. Multivalent feedback regulation of HMG CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth. *Journal of Lipid Research.* 21, 505-517.
- Brown, W. V., 2002. Promising therapies for cholesterol reduction. *Manag Care.* 11, 10-4.
- Bu, J., Bruckner, S. R., Sengoku, T., Geddes, J. W., Estus, S., 2003. Glutamate regulates caveolin expression in rat hippocampal neurons. *J Neurosci Res.* 72, 185-90.
- Burns, M., Duff, K., 2002. Cholesterol in Alzheimer's disease and tauopathy. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 977, 367-375.
- Burns, M., Gaynor, K., Olm, V., Mercken, M., LaFrancois, J., Wang, L., Mathews, P. M., Noble, W., Matsuoka, Y., Duff, K., 2003. Presenilin redistribution associated with aberrant cholesterol transport enhances beta-amyloid production in vivo. *J Neurosci.* 23, 5645-5649.
- Burns, M. P., Igbavboa, U., Wang, L., Wood, W. G., Duff, K., 2006a. Cholesterol distribution, not total levels, correlate with altered amyloid precursor protein processing in statin-treated mice. *Neuromolecular.Med.* 8, 319-328.
- Burns, M. P., Vardanian, L., Pajoohesh-Ganji, A., Wang, L., Cooper, M., Harris, D. C., Duff, K., Rebeck, G. W., 2006b. The effects of ABCA1 on cholesterol efflux and A β levels in vitro and in vivo. *J Neurochem.*
- Buttini, M., Yu, G. Q., Shockley, K., Huang, Y. D., Jones, B., Masliah, E., Mallory, M., Yeo, T., Longo, F. M., Mucke, L., 2002. Modulation of Alzheimer-like synaptic and cholinergic deficits in transgenic mice by human apolipoprotein E depends on isoform, aging, and overexpression of amyloid beta peptides but not on plaque formation. *Journal of Neuroscience.* 22, 10539-10548.

- Callreus, T., Agerskov Andersen, U., Hallas, J., Andersen, M., 2007. Cardiovascular drugs and the risk of suicide: a nested case-control study. *Eur J Clin Pharmacol.* 63, 591-6.
- Cameron, P. L., Ruffin, J. W., Bollag, R., Rasmussen, H., Cameron, R. S., 1997. Identification of caveolin and caveolin-related proteins in the brain. *J Neurosci.* 17, 9520-35.
- Cao, G., Bales, K. R., DeMattos, R. B., Paul, S. M., 2007. Liver X receptor-mediated gene regulation and cholesterol homeostasis in brain: relevance to Alzheimer's disease therapeutics. *Curr. Alzheimer Res.* 4, 179-184.
- Capell, B. C., Olive, M., Erdos, M. R., Cao, K., Faddah, D. A., Tavarez, U. L., Conneely, K. N., Qu, X., San, H., Ganesh, S. K., Chen, X., Avallone, H., Kolodgie, F. D., Virmani, R., Nabel, E. G., Collins, F. S., 2008. A farnesyltransferase inhibitor prevents both the onset and late progression of cardiovascular disease in a progeria mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105, 15902-7.
- Cardenas-Vazquez, J. C. R., Martinez, F. M. A., 1999. Comparative toxicity of high doses of statins currently used by clinicians, in CD-1 male mice fed with a hypercholesterolemic diet. *Life Sci.* 65, 947-956.
- Chamberlain, L. H., Burgoyne, R. D., Gould, G. W., 2001. SNARE proteins are highly enriched in lipid rafts in PC12 cells: implications for the spatial control of exocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 5619-5624.
- Chen, C., Lin, J., Smolarek, T., Tremain, L., 2007. P-GLYCOPROTEIN HAS DIFFERENTIAL EFFECTS ON THE DISPOSITION OF STATIN ACID AND LACTONE FORMS IN MDR1A/B KNOCKOUT AND WIDE-TYPE MICE. *Drug Metab Dispos.*
- Chen, J., Nagasawa, Y., Zhu, B. M., Ohmori, M., Harada, K., Fujimura, A., Hashimoto, K., 2003. Pravastatin prevents arrhythmias induced by coronary artery ischemia/reperfusion in anesthetized normocholesterolemic rats. *J Pharmacol Sci.* 93, 87-94.
- Chen, T. Y., Liu, P. H., Ruan, C. T., Chiu, L., Kung, F. L., 2006. The intracellular domain of amyloid precursor protein interacts with flotillin-1, a lipid raft protein. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 342, 266-272.
- Cheng, G., Shan, J., Xu, G., Huang, J., Ma, J., Ying, S., Zhu, L., 2003. Apoptosis induced by simvastatin in rat vascular smooth muscle cell through Ca²⁺-calpain and caspase-3 dependent pathway. *Pharmacol Res.* 48, 571-8.
- Choi, J. H., Yu, B. P., 1995. Brain synaptosomal aging: free radicals and membrane fluidity. *Free Radic. Biol. Med.* 18, 133-139.
- Chung, Y. M., Bae, Y. S., Lee, S. Y., 2003. Molecular ordering of ROS production, mitochondrial changes, and caspase activation during sodium salicylate-induced apoptosis. *Free Radic Biol Med.* 34, 434-42.
- Cirrito, J. R., Deane, R., Fagan, A. M., Spinner, M. L., Parsadanian, M., Finn, M. B., Jiang, H., Prior, J. L., Sagare, A., Bales, K. R., Paul, S. M., Zlokovic, B. V., Pivnicka-Worms, D., Holtzman, D. M., 2005. P-glycoprotein deficiency at the blood-brain barrier increases amyloid-beta deposition in an Alzheimer disease mouse model. *Journal of Clinical Investigation.* 115, 3285-3290.
- Claudel, T., Leibowitz, M. D., Fievet, C., Tailleux, A., Wagner, B., Repa, J. J., Torpier, G., Lobaccaro, J. M., Paterniti, J. R., Mangelsdorf, D. J., Heyman, R. A., Auwerx, J., 2001. Reduction of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice by activation of the retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 2610-5.
- Cole, S. L., Grudzien, A., Manhart, I. O., Kelly, B. L., Oakley, H., Vassar, R., 2005. Statins cause intracellular accumulation of APP, beta -secretase cleaved fragments, and Abeta via an isoprenoid-dependent mechanism. *J Biol. Chem.*

- Cole, S. L., Vassar, R., 2006. Isoprenoids and Alzheimer's disease: a complex relationship. *Neurobiol.Dis.* 22, 209-222.
- Colton, C. A., Brown, C. M., Czapiga, M., Vitek, M. P., 2002. Apolipoprotein-E allele-specific regulation of nitric oxide production. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 962, 212-225.
- Connor, J., Schroit, A. J., 1990. Aminophospholipid translocation in erythrocytes: evidence for the involvement of a specific transporter and an endofacial protein. *Biochemistry.* 29, 37-43.
- Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Jr., Small, G. W., Roses, A. D., 1993. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science.* 261, 921-923.
- Cordle, A., Koenigsknecht-Talboo, J., Wilkinson, B., Limpert, A., Landreth, G., 2005a. Mechanisms of statin-mediated inhibition of small G-protein function. *Journal of Biological Chemistry.* 280, 34202-34209.
- Cordle, A., Landreth, G., 2005b. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors attenuate beta-amyloid-induced microglial inflammatory responses. *J Neurosci.* 25, 299-307.
- Cordy, J. M., Hussain, I., Dingwall, C., Hooper, N. M., Turner, A. J., 2003. Exclusively targeting beta-secretase to lipid rafts by GPI-anchor addition up-regulates beta-site processing of the amyloid precursor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 100, 11735-11740.
- Corsini, A., Bernini, F., Quarato, P., Donetti, E., Bellosta, S., Fumagalli, R., Paoletti, R., Soma, V. M., 1996. Non-lipid-related effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Cardiology.* 87, 458-468.
- Corsini, A., Pazzucconi, F., Arnaboldi, L., Pfister, P., Fumagalli, R., Paoletti, R., Sirtori, C. R., 1998. Direct effects of statins on the vascular wall. *J Cardiovasc.Pharmacol.* 31, 773-778.
- Cory, S., Huang, D. C., Adams, J. M., 2003. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene.* 22, 8590-607.
- Cramer, C., Haan, M. N., Galea, S., Langa, K. M., Kalbfleisch, J. D., 2008. Use of statins and incidence of dementia and cognitive impairment without dementia in a cohort study. *Neurology.* 71, 344-50.
- Cregan, S. P., Fortin, A., MacLaurin, J. G., Callaghan, S. M., Cecconi, F., Yu, S. W., Dawson, T. M., Dawson, V. L., Park, D. S., Kroemer, G., Slack, R. S., 2002. Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. *J Cell Biol.* 158, 507-17.
- Crisby, M., Rahman, S. M., Sylven, C., Winblad, B., Schultzberg, M., 2004. Effects of high cholesterol diet on gliosis in apolipoprotein E knockout mice; Implications for Alzheimer's disease and stroke. *Neurosci.Lett.* 369, 87-92.
- Cutler, R. G., Kelly, J., Storie, K., Pedersen, W. A., Tammara, A., Hatanpaa, K., Troncoso, J. C., Mattson, M. P., 2004. Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 2070-5.
- Dai, G., Chan, K. K., Liu, S., Hoyt, D., Whitman, S., Klisovic, M., Shen, T., Caligiuri, M. A., Byrd, J., Grever, M., Marcucci, G., 2005. Cellular uptake and intracellular levels of the bcl-2 antisense g3139 in cultured cells and treated patients with acute myeloid leukemia. *Clin.Cancer Res.* 11, 2998-3008.
- Das, U. N., 2001. Essential fatty acids as possible mediators of the actions of statins. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids.* 65, 37-40.

- Daugas, E., Susin, S. A., Zamzami, N., Ferri, K. F., Irinopoulou, T., Larochette, N., Prevost, M. C., Leber, B., Andrews, D., Penninger, J., Kroemer, G., 2000. Mitochondrial nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J.* 14, 729-39.
- de Laat, S. W., van der Saag, P. T., Elson, E. L., Schlessinger, J., 1980. Lateral diffusion of membrane lipids and proteins during the cell cycle of neuroblastoma cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 77, 1526-1528.
- DeBose-Boyd, R. A., Ou, J., Goldstein, J. L., Brown, M. S., 2001. Expression of sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c) mRNA in rat hepatoma cells requires endogenous LXR ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 1477-82.
- Dehouck, B., Fenart, L., Dehouck, M. P., Pierce, A., Torpier, G., Cecchetti, R., 1997. A new function for the LDL receptor: transcytosis of LDL across the blood brain barrier. *J.Cell Biol.* 138, 877-889.
- DeKroon, R. M., Armati, P. J., 2001. The endosomal trafficking of apolipoprotein E3 and E4 in cultured human brain neurons and astrocytes. *Neurobiol Dis.* 8, 78-89.
- Delion, S., Chalon, S., Guilloteau, D., Lejeune, B., Besnard, J. C., Durand, G., 1997. Age-related changes in phospholipid fatty acid composition and monoaminergic neurotransmission in the hippocampus of rats fed a balanced or an n-3 polyunsaturated fatty acid-deficient diet. *J Lipid Res.* 38, 680-9.
- Diaz, C., Schroit, A. J., 1996. Role of translocases in the generation of phosphatidylserine asymmetry. *J Membr Biol.* 151, 1-9.
- Dietschy, J. M., Kita, T., Suckling, K. E., Goldstein, J. L., Brown, M. S., 1983. Cholesterol synthesis in vivo and in vitro in the WHHL rabbit, an animal with defective low density lipoprotein receptors. *J Lipid Res.* 24, 469-80.
- Dietschy, J. M., 1997. Overview of cholesterol and lipoprotein metabolism in the brain, liver and extrahepatic organs. *Nutrition Metabolism of Cardiologic Disorders.* 7, 162-168.
- Dietschy, J. M., Turley, S. D., 2001. Cholesterol metabolism in the brain. *Curr.Opin.Lipidol.* 12, 105-112.
- Dietschy, J. M., Turley, S. D., 2004. Thematic review series: Brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J.Lipid Res.* 45, 1375-1397.
- Dos Santos, S. M., Weber, C. C., Franke, C., Muller, W. E., Eckert, G. P., 2007. Cholesterol: Coupling between membrane microenvironment and ABC transporter activity. *Biochem.Biophys Res Commun.* 354, 216-221.
- Dougherty, R. M., Galli, C., Ferro-Luzzi, A., Iacono, J. M., 1987. Lipid and phospholipid fatty acid composition of plasma, red blood cells, and platelets and how they are affected by dietary lipids: a study of normal subjects from Italy, Finland, and the USA. *Am J Clin Nutr.* 45, 443-55.
- Douglass, A. D., Vale, R. D., 2005. Single-molecule microscopy reveals plasma membrane microdomains created by protein-protein networks that exclude or trap signaling molecules in T cells. *Cell.* 121, 937-50.
- Drachman, D. A., 2006. Aging of the brain, entropy, and Alzheimer disease. *Neurology.* 67, 1340-1352.
- Dumanchin, C., Czech, C., Campion, D., Cuif, M. H., Poyot, T., Martin, C., Charbonnier, F., Goud, B., Pradier, L., Frebourg, T., 1999. Presenilins interact with Rab11, a small GTPase involved in the regulation of vesicular transport. *Hum.Mol.Genet.* 8, 1263-1269.
- Duncan, R. E., El-Sohemy, A., Archer, M. C., 2005. Dietary factors and the regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: implications for breast cancer and development. *Mol Nutr.Food Res.* 49, 93-100.

- Dursina, B., Reents, R., Delon, C., Wu, Y., Kulharia, M., Thutewohl, M., Veligodsky, A., Kalinin, A., Evstifeev, V., Ciobanu, D., Szedlacsek, S. E., Waldmann, H., Goody, R. S., Alexandrov, K., 2006. Identification and specificity profiling of protein prenyltransferase inhibitors using new fluorescent phosphoisoprenoids. *J Am Chem Soc.* 128, 2822-35.
- Eckert, G. P., Cairns, N. J., Maras, A., Gattaz, W. F., Müller, W. E., 2000. Cholesterol modulates the membrane-disordering effects of beta-amyloid peptides in the hippocampus: specific changes in Alzheimer's disease. *Dement.Geriatr.Cogn.Disord.* 11, 181-186.
- Eckert, G. P., Kirsch, C., Müller, W. E., 2001a. Differential effects of lovastatin treatment on brain cholesterol levels in normal and ApoE deficient mice. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology.* 363, R90-R90.
- Eckert, G. P., Wood, W. G., Müller, W. E., 2001b. Effects of aging and beta-amyloid on the properties of brain synaptic and mitochondrial membranes. *J.Neural Transm.* 108, 1051-1064.
- Eckert, G. P., Igbavboa, U., Müller, W. E., Wood, W. G., 2003. Lipid rafts of purified mouse brain synaptosomes prepared with or without detergent reveal different lipid and protein domains. *Brain Res.* 962, 144-150.
- Eckert, G. P., Wood, W. G., Müller, W. E., 2005. Statins: drugs for Alzheimer's disease? *J. Neural Transm.*
- Eckert, G. P., Vardanian, L., Rebeck, G. W., Burns, M. P., 2007a. Regulation of central nervous system cholesterol homeostasis by the liver X receptor agonist TO-901317. *Neurosci Lett.* 423, 47-52.
- Eckert, G. P., Wood, W. G., Müller, W. E., 2007b. Cholesterol lowering drugs and Alzheimer's disease. *Future Lipidology.* 2, 423-432.
- Eckert, G. P., Hooff, G. P., Strandjord, D., Igbavboa, U., Volmer, D. A., Müller, W. E., Wood, W. G., 2009a. Regulation of the Brain Isoprenoids Farnesyl- and Geranylgeranyl pyrophosphate is Altered in Alzheimer Disease. submitted.
- Eckert, G. P., Müller, W. E., 2009b. Presenilin 1 modifies neuronal membranes in vivo. submitted.
- Eddidin, M., 2003. The state of lipid rafts: from model membranes to cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 32, 257-83.
- Edison, R. J., Muenke, M., 2004. Central nervous system and limb anomalies in case reports of first-trimester statin exposure. *N Engl J Med.* 350, 1579-82.
- Edlund, C., Soderberg, M., Kristensson, K., Dallner, G., 1992. Ubiquinone, dolichol, and cholesterol metabolism in aging and Alzheimer's disease. *Biochem.Cell Biol.* 70, 422-428.
- Efanov, A. M., Sewing, S., Bokvist, K., Gromada, J., 2004. Liver X receptor activation stimulates insulin secretion via modulation of glucose and lipid metabolism in pancreatic beta-cells. *Diabetes.* 53 Suppl 3, S75-8.
- Eehalt, R., Keller, P., Haass, C., Thiele, C., Simons, K., 2003. Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J.Cell Biol.* 160, 113-123.
- Ehrenberg, B. L., Lamon-Fava, S., Corbett, K. E., McNamara, J. R., Dallal, G. E., Schaefer, E. J., 1999. Comparison of the effects of pravastatin and lovastatin on sleep disturbance in hypercholesterolemic subjects. *Sleep.* 22, 117-21.
- Endo, A., Kuroda, M., Tanzawa, K., 1976. Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity. *FEBS Lett.* 72, 323-6.

- Endres, M., Laufs, U., Huang, Z., Nakamura, T., Huang, P., Moskowitz, M. A., Liao, J. K., 1998. Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 95, 8880-8885.
- Fagan, A. M., Holtzman, D. M., Munson, G., Mathur, T., Schneider, D., Chang, L. K., Getz, G. S., Reardon, C. A., Lukens, J., Shah, J. A., LaDu, M. J., 1999. Unique Lipoproteins Secreted by Primary Astrocytes From Wild Type, apoE (-/-), and Human apoE Transgenic Mice. *J Biol.Chem.* 274, 30001-30007.
- Fagan, A. M., Holtzman, D. M., 2000. Astrocyte lipoproteins, effects of apoE on neuronal function, and role of apoE in amyloid-beta deposition in vivo. *Microsc.Res.Tech.* 50, 297-304.
- Fassbender, K., Simons, M., Bergmann, C., Stroick, M., Lutjohann, D., Keller, P., Runz, H., Kuhl, S., Bertsch, T., von Bergmann, K., Hennerici, M., Beyreuther, K., Hartmann, T., 2001. Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta -amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 98, 5856-5861.
- Feron, O., Dessy, C., Desager, J. P., Balligand, J. L., 2001. Hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibition promotes endothelial nitric oxide synthase activation through a decrease in caveolin abundance. *Circulation.* 103, 113-8.
- Fielding, C. J., Fielding, P. E., 2003. Relationship between cholesterol trafficking and signaling in rafts and caveolae. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes.* 1610, 219-228.
- Forstner, M. B., Yee, C. K., Parikh, A. N., Groves, J. T., 2006. Lipid lateral mobility and membrane phase structure modulation by protein binding. *J Am Chem.Soc.* 128, 15221-15227.
- Franke, C., Nöldner, M., Abdel-Kader, R., Johnson-Anuna, L. N., Wood, W. G., Müller, W. E., Eckert, G. P., 2007. Bcl-2 upregulation and neuroprotection in guinea pig brain following chronic simvastatin treatment. *Neurobiol.Dis.* 25, 438-445.
- Frears, E. R., Stephens, D. J., Walters, C. E., Davies, H., Austen, B. M., 1999. The role of cholesterol in the biosynthesis of beta-amyloid. *Neuroreport.* 10, 1699-1705.
- Fukumoto, H., Deng, A., Irizarry, M. C., Fitzgerald, M. L., Rebeck, G. W., 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.
- Fulop, T., Jr., Douziech, N., Larbi, A., Dupuis, G., 2002. The role of lipid rafts in T lymphocyte signal transduction with aging. *Ann N Y Acad Sci.* 973, 302-4.
- Galbete, J. L., Martin, T. R., 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 Pt 2, 307-313.
- Gamerding, M., Clement, A. B., Behl, C., 2008. Effects of sulindac sulfide on the membrane architecture and the activity of gamma-secretase. *Neuropharmacology.* 54, 998-1005.
- Garrigues, A., Escargueil, A. E., Orłowski, S., 2002. The multidrug transporter, P-glycoprotein, actively mediates cholesterol redistribution in the cell membrane. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 99, 10347-10352.
- Gaudreault, S. B., Dea, D., Poirier, J., 2004. Increased caveolin-1 expression in Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Aging.* 25, 753-9.
- Gayet, L., Dayan, G., Barakat, S., Labialle, S., Michaud, M., Cogne, S., Mazane, A., Coleman, A. W., Rigal, D., Baggetto, L. G., 2005. Control of P-glycoprotein activity by

- membrane cholesterol amounts and their relation to multidrug resistance in human CEM leukemia cells. *Biochemistry*. 44, 4499-509.
- Gerin, I., Dolinsky, V. W., Shackman, J. G., Kennedy, R. T., Chiang, S. H., Burant, C. F., Steffensen, K. R., Gustafsson, J. A., MacDougald, O. A., 2005. LXRbeta is required for adipocyte growth, glucose homeostasis, and beta cell function. *J Biol Chem*. 280, 23024-31.
- Ghribi, O., Herman, M. M., Spaulding, N. K., Savory, J., 2002. Lithium inhibits aluminum-induced apoptosis in rabbit hippocampus, by preventing cytochrome c translocation, Bcl-2 decrease, Bax elevation and caspase-3 activation. *J Neurochem*. 82, 137-45.
- Gimpl, G., Burger, K., Fahrenholz, F., 1997. Cholesterol as modulator of receptor function. *Biochemistry*. 36, 10959-10974.
- Girardot, N., Allinquant, B., Langui, D., Laquerriere, A., Dubois, B., Hauw, J. J., Duyckaerts, C., 2003. Accumulation of flotillin-1 in tangle-bearing neurones of Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 29, 451-61.
- Giusto, N. M., Roque, M. E., Ilincheta de Boscherio, M. G., 1992. Effects of aging on the content, composition and synthesis of sphingomyelin in the central nervous system. *Lipids*. 27, 835-9.
- Golde, T. E., Eckman, C. B., 2001. Cholesterol modulation as an emerging strategy for the treatment of Alzheimer's disease. *Drug Discov.Today*. 6, 1049-1055.
- Gong, J. S., Kobayashi, M., Hayashi, H., Zou, K., Sawamura, N., Fujita, S. C., Yanagisawa, K., Michikawa, M., 2002. Apolipoprotein E (apoE) isoform-dependent lipid release from astrocytes prepared from human-apoE3- and apoE4-knock-in mice. *J.Biol.Chem*.
- Goritz, C., Mauch, D. H., Pfrieder, F. W., 2005. Multiple mechanisms mediate cholesterol-induced synaptogenesis in a CNS neuron. *Mol.Cell Neurosci*. 29, 190-201.
- Graham, M. E., Higgins, J. A., *Molekularbiologische Membrananalyse*. Molekularbiologische Membrananalyse. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1998.
- Green, K. N., Martinez-Coria, H., Khashwji, H., Hall, E. B., Yurko-Mauro, K. A., Ellis, L., LaFerla, F. M., 2007. Dietary docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid ameliorate amyloid-beta and tau pathology via a mechanism involving presenilin 1 levels. *J Neurosci*. 27, 4385-4395.
- Grimm, M. O., Grimm, H. S., Patzold, A. J., Zinser, E. G., Halonen, R., Duering, M., Tschape, J. A., De Strooper, B., Muller, U., Shen, J., Hartmann, T., 2005. Regulation of cholesterol and sphingomyelin metabolism by amyloid-beta and presenilin. *Nat Cell Biol*. 7, 1118-23.
- Grimm, M. O. W., Tschape, J. A., Grimm, H. S., Zinser, E. G., Hartmann, T., 2006. Altered membrane fluidity and lipid raft composition in presenilin-deficient cells. *Acta Neurologica Scandinavica*. 114, 27-32.
- Guillot, F., Misslin, P., Lemaire, M., 1993. Comparison of fluvastatin and lovastatin blood-brain barrier transfer using in vitro and in vivo methods. *J Cardiovasc Pharmacol*. 21, 339-46.
- Haag, M. D., Hofman, A., Koudstaal, P. J., Stricker, B. H., Breteler, M. M., 2009. Statins are associated with a reduced risk of Alzheimer disease regardless of lipophilicity. The Rotterdam Study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 80, 13-7.
- Hajjar, I., Schumpert, J., Hirth, V., Wieland, D., Eleazer, G. P., 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.

- Hamada, H., Tsuruo, T., 1988. Characterization of the ATPase activity of the Mr 170,000 to 180,000 membrane glycoprotein (P-glycoprotein) associated with multidrug resistance in K562/ADM cells. *Cancer Res.* 48, 4926-32.
- Hamelin, B. A., Turgeon, J., 1998. Hydrophilicity/lipophilicity: relevance for the pharmacology and clinical effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Trends.Pharmacol.Sci.* 19, 26-37.
- Handelmann, G. E., Boyles, J. K., Weisgraber, K. H., Mahley, R. W., Pitas, R. E., 1992. Effects of apolipoprotein E, beta-very low density lipoproteins, and cholesterol on the extension of neurites by rabbit dorsal root ganglion neurons in vitro. *J Lipid Res.* 33, 1677-88.
- Hao, M., Mukherjee, S., Maxfield, F. R., 2001. Cholesterol depletion induces large scale domain segregation in living cell membranes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 98, 13072-13077.
- Hardy, J., Selkoe, D. J., 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 297, 353-356.
- Harr, S. D., Uint, L., Hollister, R., Hyman, B. T., Mendez, A. J., 1996. Brain expression of apolipoproteins E, J, and A-I in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 66, 2429-35.
- Harrison, R. W., Ashton, C. H., 1994. Do cholesterol-lowering agents affect brain activity? A comparison of simvastatin, pravastatin, and placebo in healthy volunteers. *Br.J.Clin.Pharmacol.* 37, 231-236.
- Hartmann, H., Eckert, A., Müller, W. E., 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.
- 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.
- Hayashi, H., Igbavboa, U., Hamanaka, H., Kobayashi, M., Fujita, S. C., Wood, W. G., 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., Campenot, R. B., Vance, D. E., Vance, J. E., 2004. Glial lipoproteins stimulate axon growth of central nervous system neurons in compartmented cultures. *J Biol Chem.* 279, 14009-15.
- Hebert, L. E., Scherr, P. A., Bienias, J. L., Bennett, D. A., Evans, D. A., 2003. Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. *Arch Neurol.* 60, 1119-22.
- Henneman, L., van Cruchten, A. G., Denis, S. W., Amolins, M. W., Placzek, A. T., Gibbs, R. A., Kulik, W., Waterham, H. R., 2008. Detection of nonsterol isoprenoids by HPLC-MS/MS. *Anal Biochem.*
- Hering, H., Lin, C. C., Sheng, M., 2003. Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability. *J.Neurosci.* 23, 3262-3271.
- Heverin, M., Meaney, S., Lutjohann, D., Diczfalusy, U., Wahren, J., Bjorkhem, I., 2005. Crossing the barrier: net flux of 27-hydroxycholesterol into the human brain. *J.Lipid Res.* 46, 1047-1052.
- Higgins, C. F., Gottesman, M. M., 1992. Is the multidrug transporter a flippase? *Trends Biochem Sci.* 17, 18-21.

- Hinrichs, J. W., Klappe, K., van Riezen, M., Kok, J. W., 2005. Drug resistance-associated changes in sphingolipids and ABC transporters occur in different regions of membrane domains. *J Lipid Res.* 46, 2367-76.
- Hinson, D. D., Chambliss, K. L., Toth, M. J., Tanaka, R. D., Gibson, K. M., 1997. Post-translational regulation of mevalonate kinase by intermediates of the cholesterol and nonsterol isoprene biosynthetic pathways. *J Lipid Res.* 38, 2216-23.
- Holstein, S. A., Hohl, R. J., 2004. Isoprenoids: remarkable diversity of form and function. *Lipids.* 39, 293-309.
- Holtzman, D. M., Bales, K. R., Tenkova, T., Fagan, A. M., Parsadanian, M., Sartorius, L. J., Mackey, B., Olney, J., McKeel, D., Wozniak, D., Paul, S. M., 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.
- Hooff, G. P., Volmer, D. A., Wood, W. G., Muller, W. E., Eckert, G. P., 2008. Isoprenoid quantitation in human brain tissue: a validated HPLC-fluorescence detection method for endogenous farnesyl- (FPP) and geranylgeranylpyrophosphate (GGPP). *Anal Bioanal Chem.* 392, 673-80.
- Hooper, N. M., 1999. Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains, lipid rafts and caveolae. *Mol.Membr.Biol.* 16, 145-156.
- Howland, D. S., Trusko, S. P., Savage, M. J., Reaume, A. G., Lang, D. M., Hirsch, J. D., Maeda, N., Siman, R., Greenberg, B. D., Scott, R. W., Flood, D. G., 1998. Modulation of secreted beta-amyloid precursor protein and amyloid beta- peptide in brain by cholesterol. *J.Biol.Chem.* 273, 16576-16582.
- Huebbe, P., Schaffer, S., Jofre-Monseny, L., Boesch-Saadatmandi, C., Minihane, A. M., Müller, W. E., Eckert, G. P., Rimbach, G., 2007. Apolipoprotein E genotype and alpha-tocopherol modulate amyloid precursor protein metabolism and cell cycle regulation. *Mol Nutr Food Res.* 51, 1510-7.
- Huffman, J. C., Stern, T. A., 2007. Neuropsychiatric consequences of cardiovascular medications. *Dialogues Clin Neurosci.* 9, 29-45.
- Igbavboa, U., Avdulov, N. A., Schroeder, F., Wood, W. G., 1996. Increasing Age Alters Transbilayer Fluidity and Cholesterol Asymmetry in Synaptic Plasma Membrane of Mice. *J.Neurochem.* 66, 1717-1725.
- Igbavboa, U., Avdulov, N. A., Chochina, S. V., Wood, W. G., 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., Hamilton, J., Kim, H. Y., Sun, G. Y., Wood, W. G., 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, J. M., Johnson, L. N., Malo, T. M., Studniski, A. E., Yu, S., Sun, G. Y., Wood, W. G., 2003. Cholesterol distribution in the Golgi complex of DITNC1 astrocytes is differentially altered by fresh and aged amyloid beta-peptide-(1-42). *J.Biol.Chem.* 278 17150-17157.
- Igbavboa, U., Eckert, G. P., Malo, T. M., Studniski, A. E., Johnson, L. N., Yamamoto, N., Kobayashi, M., Fujita, S. C., Appel, T. R., Muller, W. E., Wood, W. G., Yanagisawa, K., 2005. Murine synaptosomal lipid raft protein and lipid composition are altered by expression of human apoE 3 and 4 and by increasing age. *J Neurol.Sci.* 229-230, 225-232.
- Ingelsson, M., Jesneck, J., Irizarry, M. C., Hyman, B. T., Rebeck, G. W., 2004. Lack of association of the cholesterol 24-hydroxylase (CYP46) intron 2 polymorphism with Alzheimer's disease. *Neurosci.Lett.* 367, 228-231.

- Istvan, E. S., Deisenhofer, J., 2001. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science*. 292, 1160-4.
- Jick, H., Zornberg, G. L., Jick, S. S., Seshadri, S., Drachman, D. A., 2000. Statins and the risk of dementia. *Lancet*. 356, 1627-1631.
- Johnson-Anuna, L. N., Eckert, G. P., Keller, J. H., Igbavboa, U., Franke, C., Fechner, T., Schubert-Zsilavecz, M., Karas, M., Müller, W. M., Wood, W. G., 2005. Chronic administration of statins alters multiple gene expression patterns in mouse cerebral cortex. *J Pharmacol.Exp.Ther.* 312, 786-793.
- Johnson-Anuna, L. N., Eckert, G. P., Franke, C., Igbavboa, U., Muller, W. E., Wood, W. G., 2007. Simvastatin protects neurons from cytotoxicity by up-regulating Bcl-2 mRNA and protein. *J Neurochem.* 101, 77-86.
- Jordan, J., Galindo, M. F., Miller, R. J., Reardon, C. A., Getz, G. S., LaDu, M. J., 1998. Isoform-specific effect of apolipoprotein E on cell survival and beta-amyloid-induced toxicity in rat hippocampal pyramidal neuronal cultures. *J Neurosci.* 18, 195-204.
- Joseph, S. B., McKilligin, E., Pei, L., Watson, M. A., Collins, A. R., Laffitte, B. A., Chen, M., Noh, G., Goodman, J., Hagger, G. N., Tran, J., Tippin, T. K., Wang, X., Lusic, A. J., Hsueh, W. A., Law, R. E., Collins, J. L., Willson, T. M., Tontonoz, P., 2002. Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 7604-9.
- Jurevics, H., Morell, P., 1995. Cholesterol for synthesis of myelin is made locally, not imported into brain. *J Neurochem.* 64, 895-901.
- Kabara, J. J., 1973. A critical review of brain cholesterol metabolism. *Prog Brain Res.* 40, 363-82.
- Kabouridis, P. S., Janzen, J., Magee, A. L., Ley, S. C., 2000a. Cholesterol depletion disrupts lipid rafts and modulates the activity of multiple signaling pathways in T lymphocytes. *Eur J Immunol.* 30, 954-63.
- Kabouridis, P. S., Janzen, J., Magee, A. L., Ley, S. C., 2000b. Cholesterol depletion disrupts lipid rafts and modulates the activity of multiple signaling pathways in T lymphocytes. *Eur J Immunol.* 30, 954-963.
- Kainu, T., Wikstrom, A. C., Gustafsson, J. A., Pelto-Huikko, M., 1994. Localization of the peroxisome proliferator-activated receptor in the brain. *Neuroreport.* 5, 2481-2485.
- Kakio, A., Nishimoto, S. S., 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.*
- Kalaria, R. N., Ballard, C., 1999. Overlap between pathology of Alzheimer disease and vascular dementia. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 13 Suppl 3, S115-23.
- Kametani, F., Usami, M., Tanaka, K., Kume, H., Mori, H., 2004. Mutant presenilin (A260V) affects Rab8 in PC12D cell. *Neurochem Int.* 44, 313-20.
- Kang, J. H., Cook, N., Manson, J., Buring, J. E., Grodstein, F., 2006. A randomized trial of vitamin E supplementation and cognitive function in women. *Arch Intern Med.* 166, 2462-8.
- Kapur, N. K., Musunuru, K., 2008. Clinical efficacy and safety of statins in managing cardiovascular risk. *Vasc Health Risk Manag.* 4, 341-53.
- Kawamura, T., Hasegawa, K., Morimoto, T., Iwakura, A., Nishina, T., Nomoto, T., Komeda, M., 2004. Down-regulation of Endothelin-1 and Alteration of Apoptosis Signaling Following Left Ventricular Volume Reduction Surgery in Heart Failure of Adult Rats. *J Cardiovasc.Pharmacol.* 44 Suppl 1, S366-S371.
- Kawashima, S., Yamashita, T., Miwa, Y., Ozaki, M., Namiki, M., Hirase, T., Inoue, N., Hirata, K., Yokoyama, M., 2003. HMG-CoA reductase inhibitor has protective effects

- against stroke events in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Stroke*. 34, 157-163.
- Keller, C., Fettstoffwechsel; Lipidsenker - Pharmakotherapie bei Fettstoffwechselstörungen. In: K. Aktories, U. Förstermann, F. Hofmann, K. Starke, Eds.), *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Urban & Fischer, München, 2005, pp. 601 - 616.
- Kelly, J. F., Joseph, J. A., Denisova, N. A., Erat, S., Mason, R. P., Roth, G. S., 1995. Dissociation of striatal GTPase and dopamine release responses to muscarinic cholinergic agonists in F344 rats: influence of age and dietary manipulation. *J. Neurochem.* 64, 2755-2764.
- Kennedy, K. R., Small, M., Fliesler, S. J., 2004. Enzyme blockade: A nonradioactive method to determine the absolute rate of cholesterol synthesis in the brain. *J Lipid Res.*
- Kirsch, C., Eckert, G. P., Mueller, W. E., 2002. Cholesterol attenuates the membrane perturbing properties of beta-amyloid peptides. *Amyloid*. 9, 149-159.
- Kirsch, C., Eckert, G. P., Koudinov, A. R., Müller, W. E., 2003a. Brain cholesterol, statins and Alzheimer's Disease. *Pharmacopsychiatry*. 36 Suppl 2, S113-S119.
- Kirsch, C., Eckert, G. P., Müller, W. E., 2003b. Statins affect cholesterol micro-domains in brain plasma membranes. *Biochem. Pharmacol.* 65 843-856.
- Kivipelto, M., Helkala, E. L., Laakso, M. P., Hanninen, T., Hallikainen, M., Alhainen, K., Iivonen, S., Mannermaa, A., Tuomilehto, J., Nissinen, A., Soininen, H., 2002. Apolipoprotein E epsilon4 allele, elevated midlife total cholesterol level, and high midlife systolic blood pressure are independent risk factors for late-life Alzheimer disease. *Ann. Intern. Med.* 137, 149-155.
- Koch, S., Donarski, N., Goetze, K., Kreckel, M., Stuerenburg, H. J., Buhmann, C., Beisiegel, U., 2001. Characterization of four lipoprotein classes in human cerebrospinal fluid. *J Lipid Res.* 42, 1143-1151.
- 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. U.S.A.* 98, 5815-5820.
- Koldamova, R. P., Lefterov, I. M., Staufenbiel, M., Wolfe, D., Huang, S., Glorioso, J. C., Walter, M., Roth, M. G., Lazo, J. S., 2005. The liver X receptor ligand T0901317 decreases amyloid beta production in vitro and in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* 280, 4079-88.
- Koudinov, A. R., Koudinova, N. V., 2005. Cholesterol homeostasis failure as a unifying cause of synaptic degeneration. *J Neurol Sci.* 229-230, 233-240.
- Koudinova, N. V., Koudinov, A. R., 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, B. R., Newton, R. S., 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.
- LaDu, M. J., Shah, J. A., Reardon, C. A., Getz, G. S., Bu, G., Hu, J., Guo, L., van Eldik, L. J., 2000. Apolipoprotein E receptors mediate the effects of beta-amyloid on astrocyte cultures. *J Biol Chem.* 275, 33974-80.
- Lala, D. S., 2005. The liver X receptors. *Curr Opin Investig Drugs*. 6, 934-43.
- Lam, F. C., Liu, R., Lu, P., Shapiro, A. B., Renoir, J. M., Sharom, F. J., Reiner, P. B., 2001. beta-Amyloid efflux mediated by p-glycoprotein. *J Neurochem.* 76, 1121-8.
- Lane, R. M., Farlow, M. R., 2005. Lipid homeostasis and apolipoprotein E in the development and progression of Alzheimer's disease. *J Lipid Res.* 46, 949-68.

- Law, M. R., Wald, N. J., Rudnicka, A. R., 2003. Quantifying effect of statins on low density lipoprotein cholesterol, ischaemic heart disease, and stroke: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 326, 1423.
- Lee, M., You, H. J., Cho, S. H., Woo, C. H., Yoo, M. H., Joe, E. H., Kim, J. H., 2002. Implication of the small GTPase Rac1 in the generation of reactive oxygen species in response to beta-amyloid in C6 astrogloma cells. *Biochem.J.* 366, 937-943.
- Lee, S. J., Liyanage, U., Bickel, P. E., Xia, W., Lansbury, P. T., Jr., Kosik, K. S., 1998. A detergent-insoluble membrane compartment contains A β in vivo. *Nat.Med.* 4, 730-734.
- Lenaz, G., Curatola, G., Fiorini, R. M., Parenti, C. G., 1983. Membrane fluidity and its role in the regulation of cellular processes. *Prog.Clin.Biol.Res.* 132C, 25-34.
- Lenaz, G., Esposti, M. D., Shinitzky, M., Membrane-bound enzymes. *Biomembranes: Structural and Functional Aspects*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1994, pp. 83-198.
- Leoni, V., Masterman, T., Patel, P., Meaney, S., Diczfalusy, U., Bjorkhem, I., 2003. Side chain oxidized oxysterols in cerebrospinal fluid and the integrity of blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. *J Lipid Res.* 44, 793-9.
- Li, G., Higdon, R., Kukull, W. A., Peskind, E., Van Valen, M. K., Tsuang, D., van, B. G., McCormick, W., Bowen, J. D., Teri, L., Schellenberg, G. D., Larson, E. B., 2004. Statin therapy and risk of dementia in the elderly: a community-based prospective cohort study. *Neurology.* 63, 1624-1628.
- Lichtenberg, D., Goni, F. M., Heerklotz, H., 2005. Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts. *Trends Biochem Sci.* 30, 430-6.
- Lisanti, M. P., Scherer, P. E., Tang, Z., Sargiacomo, M., 1994. Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains: a signalling hypothesis. *Trends Cell Biol.* 4, 231-5.
- Liscum, L., Munn, N. J., 1999. Intracellular cholesterol transport. *Biochim.Biophys.Acta.* 1438, 19-37.
- Liu, Y., Peterson, D. A., 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., Lätjohann, D., Schmidt, H. H., 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, D. M., 1999. Distinct alterations in phospholipid metabolism in brains of apolipoprotein E-deficient mice. *J.Neurosci.Res.* 58, 586-592.
- Luker, G. D., Pica, C. M., Kumar, A. S., Covey, D. F., Piwnica-Worms, D., 2000. Effects of cholesterol and enantiomeric cholesterol on P-glycoprotein localization and function in low-density membrane domains. *Biochemistry.* 39, 8692.
- Lund, E. G., Guileyardo, J. M., Russell, D. W., 1999. cDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96, 7238-43.
- Lund, E. G., Xie, C., Kotti, T., Turley, S. D., Dietschy, J. M., Russell, D. W., 2003. Knockout of the cholesterol 24-hydroxylase gene in mice reveals a brain-specific mechanism of cholesterol turnover. *J.Biol.Chem.* 278, 22980-22988.
- Lätjohann, D., Breuer, O., Ahlborg, G., Nennesmo, I., Siden, A., Diczfalusy, U., Bjorkhem, I., 1996. Cholesterol homeostasis in human brain: evidence for an age-dependent

- flux of 24S-hydroxycholesterol from the brain into the circulation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 93, 9799-9804.
- Lätjohann, D., von Bergmann, K., 2003. 24S-hydroxycholesterol: a marker of brain cholesterol metabolism. *Pharmacopsychiatry.* 36 Suppl 2, S102-S106.
- Lätjohann, D., Stroick, M., Bertsch, T., Kuhl, S., Lindenthal, B., Thelen, K., Andersson, U., Bjorkhem, I., Bergmann, K. K., Fassbender, K., 2004. High doses of simvastatin, pravastatin, and cholesterol reduce brain cholesterol synthesis in guinea pigs. *Steroids.* 69, 431-438.
- Ma, J., Brewer, H. B., Jr., Potter, H., 1996a. Alzheimer A beta neurotoxicity: promotion by antichymotrypsin, ApoE4; inhibition by A beta-related peptides. *Neurobiol Aging.* 17, 773-80.
- Ma, J. Y., Brewer, H. B., Jr., Potter, H., 1996b. Alzheimer Abeta neurotoxicity: Promotion by antichymotrypsin, ApoE4; Inhibition by Abeta-related peptides. *Neurobiol.Aging.* 17, 773-780.
- MacDonald, A. G., Wahle, K. W., Cossins, A. R., Behan, M. K., 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.* 859, 209-218.
- Mahley, R. W., 1988. Apolipoprotein E: Cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science.* 240, 622-640.
- Mahley, R. W., Huang, Y., 2006. Apolipoprotein (apo) E4 and Alzheimer's disease: unique conformational and biophysical properties of apoE4 can modulate neuropathology. *Acta Neurologica Scandinavica.* 114, 8-14.
- Maltese, W. A., 1984. Cholesterol synthesis in cultured skin fibroblasts from patients with Huntington's disease. *Biochem Med.* 32, 144-50.
- Manda, K., Bhatia, A. L., 2003. Melatonin-induced reduction in age-related accumulation of oxidative damage in mice. *Biogerontology.* 4, 133-9.
- Manfredini, R., Caracciolo, S., Salmi, R., Boari, B., Tomelli, A., Gallerani, M., 2000. The association of low serum cholesterol with depression and suicidal behaviours: new hypotheses for the missing link. *J Int Med Res.* 28, 247-57.
- Martinou, J. C., Dubois-Dauphin, M., Staple, J. K., Rodriguez, I., Frankowski, H., Missotten, M., Albertini, P., Talabot, D., Catsicas, S., Pietra, C., et al., 1994. Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron.* 13, 1017-30.
- Marx, J., 2001. Alzheimer's disease: bad for the heart, bad for the mind? *Science.* 294, 508-509.
- Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Susin, S. A., Beutner, G., Brdiczka, D., Remy, R., Xie, Z. H., Reed, J. C., Kroemer, G., 1998. The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J.Exp.Med.* 187, 1261-1271.
- Masliah, E., Mallory, M., Ge, N., Alford, M., Veinbergs, I., Roses, A. D., 1995. Neurodegeneration in the central nervous system of apoE- deficient mice. *Exp.Neurol.* 136, 107-122.
- Mason, R. P., Shoemaker, W. J., Shajenko, L., Chambers, T. E., Herbette, L. G., 1992. Evidence for changes in the Alzheimer's disease brain cortical membrane structure mediated by cholesterol. *Neurobiol.Aging.* 13, 413-419.
- Mateos, L., Akterin, S., Gil-Bea, F. J., Spulber, S., Rahman, A., Bjorkhem, I., Schultzberg, M., Flores-Morales, A., Cedazo-Minguez, A., 2008. Activity-Regulated Cytoskeleton-

- Associated Protein in Rodent Brain is Down-Regulated by High Fat Diet in vivo and by 27-Hydroxycholesterol in vitro. *Brain Pathol.*
- Matsuda, M., Korn, B. S., Hammer, R. E., Moon, Y. A., Komuro, R., Horton, J. D., Goldstein, J. L., Brown, M. S., Shimomura, I., 2001. SREBP cleavage-activating protein (SCAP) is required for increased lipid synthesis in liver induced by cholesterol deprivation and insulin elevation. *Genes Dev.* 15, 1206-16.
- Mattson, M. P., 2004. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature.* 430, 631-639.
- Mattson, M. P., Cutler, R. G., Jo, D. G., 2005. Alzheimer peptides perturb lipid-regulating enzymes. *Nat Cell Biol.* 7, 1045-7.
- Mauch, D. H., Nagler, K., Schumacher, S., Goritz, C., Muller, E. C., Otto, A., Pfrieder, F. W., 2001. CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science.* 294, 1354-1357.
- McFarlane, S. I., Muniyappa, R., Francisco, R., Sowers, J. R., 2002. Pleiotropic effects of statins: lipid reduction and beyond. *J Clin Endocrinol Metab.* 87, 1451-8.
- McShea, A., Lee, H. G., Petersen, R. B., Casadesus, G., Vincent, I., Linford, N. J., Funk, J. O., Shapiro, R. A., Smith, M. A., 2007. Neuronal cell cycle re-entry mediates Alzheimer disease-type changes. *Biochim Biophys Acta.* 1772, 467-72.
- McTaggart, S. J., 2006. Isoprenylated proteins. *Cell Mol. Life Sci.* 63, 255-267.
- Meresse, S., Delbart, C., Fruchart, J. C., Cecchelli, R., 1989. Low-density lipoprotein receptor on endothelium of brain capillaries. *J Neurochem.* 53, 340-5.
- Michikawa, M., 2003. The role of cholesterol in pathogenesis of Alzheimer's disease: dual metabolic interaction between amyloid beta-protein and cholesterol. *Mol. Neurobiol.* 27, 1-12.
- Mielke, M. M., Zandi, P. P., Sjogren, M., Gustafson, D., Ostling, S., Steen, B., Skoog, I., 2005. High total cholesterol levels in late life associated with a reduced risk of dementia. *Neurology.* 64, 1689-1695.
- Migheli, A., Cavalla, P., Piva, R., Giordana, M. T., Schiffer, D., 1994. bcl-2 protein expression in aged brain and neurodegenerative diseases. *Neuroreport.* 5, 1906-8.
- Mitter, D., Reisinger, C., Hinz, B., Hollmann, S., Yelamanchili, S. V., Treiber-Held, S., Ohm, T. G., Herrmann, A., Ahnert-Hilger, G., 2003. The synaptophysin/synaptobrevin interaction critically depends on the cholesterol content. *J. Neurochem.* 84, 35-42.
- Miyata, M., Smith, J. D., 1996. Apolipoprotein E allele - specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and beta - amyloid peptides. *Nat. Genet.* 14, 55-61.
- Modok, S., Heyward, C., Callaghan, R., 2004. P-glycoprotein retains function when reconstituted into a sphingolipid- and cholesterol-rich environment. *J Lipid Res.* 45, 1910-8.
- Mohrschladt, M. F., van der Sman-de Beer, F., Hofman, M. K., van der Krabben, M., Westendorp, R. G., Smelt, A. H., 2005. TaqIB polymorphism in CETP gene: the influence on incidence of cardiovascular disease in statin-treated patients with familial hypercholesterolemia. *Eur J Hum Genet.* 13, 877-82.
- Moore, S. A., Yoder, E., Murphy, S., Dutton, G. R., Spector, A. A., 1991. Astrocytes, not neurons, produce docosahexaenoic acid (22:6 omega-3) and arachidonic acid (20:4 omega-6). *J Neurochem.* 56, 518-24.
- 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.

- Morris, M. C., Evans, D. A., Bienias, J. L., Tangney, C. C., Bennett, D. A., Aggarwal, N., Wilson, R. S., Scherr, P. A., 2002. Dietary intake of antioxidant nutrients and the risk of incident Alzheimer disease in a biracial community study. *JAMA*. 287, 3230-3237.
- Motoyama, N., Kimura, T., Takahashi, T., Watanabe, T., Nakano, T., 1999. bcl-x prevents apoptotic cell death of both primitive and definitive erythrocytes at the end of maturation. *J Exp Med*. 189, 1691-8.
- Mueller, W. H., Kleefeld, D., Khattab, B., Meissner, J. D., Scheibe, R. J., 2000. Effects of retinoic acid on N-glycosylation and mRNA stability of the liver/bone/kidney alkaline phosphatase in neuronal cells. *J Cell Physiol*. 182, 50-61.
- Muscat, G. E., Wagner, B. L., Hou, J., Tangirala, R. K., Bischoff, E. D., Rohde, P., Petrowski, M., Li, J., Shao, G., Macondray, G., Schulman, I. G., 2002. Regulation of cholesterol homeostasis and lipid metabolism in skeletal muscle by liver X receptors. *J Biol Chem*. 277, 40722-8.
- Naassner, M., Mergler, M., Wolf, K., Schuphan, I., 2002. Determination of the xenoestrogens 4-nonylphenol and bisphenol A by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection after derivatisation with dansyl chloride. *J Chromatogr A*. 945, 133-8.
- Nagy, Z., Esiri, M. M., Cato, A. M., Smith, A. D., 1997. Cell cycle markers in the hippocampus in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 94, 6-15.
- Nakayama, K., Negishi, I., Kuida, K., Sawa, H., Loh, D. Y., 1994. Targeted disruption of Bcl-2 alpha beta in mice: occurrence of gray hair, polycystic kidney disease, and lymphocytopenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91, 3700-4.
- Naslavsky, N., Stein, R., Yanai, A., Friedlander, G., Taraboulos, A., 1997. Characterization of detergent-insoluble complexes containing the cellular prion protein and its scrapie isoform. *J Biol Chem*. 272, 6324-6331.
- Nathan, B. P., Jiang, Y., Wong, G. K., Shen, F., Brewer, G. J., Struble, R. G., 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.
- Neuhaus, O., Stuve, O., Zamvil, S. S., Hartung, H. P., 2005. Evaluation of HMG-CoA reductase inhibitors for multiple sclerosis - Opportunities and obstacles. *Cns Drugs*. 19, 833-841.
- Ng Ying Kin, N. M., Palo, J., Haltia, M., Wolfe, L. S., 1983. High levels of brain dolichols in neuronal ceroid-lipofuscinosis and senescence. *J Neurochem*. 40, 1465-73.
- Nieweg, K., Schaller, H., Pfrieger, F. W., 2009. Marked differences in cholesterol synthesis between neurons and glial cells from postnatal rats. *J Neurochem*.
- Nishio, M., Fukumoto, S., Furukawa, K., Ichimura, A., Miyazaki, H., Kusunoki, S., Urano, T., 2004. Overexpressed GM1 suppresses nerve growth factor (NGF) signals by modulating the intracellular localization of NGF receptors and membrane fluidity in PC12 cells. *J Biol Chem*. 279, 33368-33378.
- Nishiyama, K., Trapp, B. D., Ikezu, T., Ransohoff, R. M., Tomita, T., Iwatsubo, T., Kanazawa, I., Hsiao, K. K., Lisanti, M. P., 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.
- Nizzari, M., Venezia, V., Bianchini, P., Caorsi, V., Diaspro, A., Repetto, E., Thellung, S., Corsaro, A., Carlo, P., Schettini, G., Florio, T., Russo, C., 2007. Amyloid precursor protein and Presenilin 1 interaction studied by FRET in human H4 cells. *Ann N Y Acad Sci*. 1096, 249-57.

- North, P., Fleischer, S., 1983. Alteration of synaptic membrane cholesterol/phospholipid ratio using a lipid transfer protein. Effect on gamma-aminobutyric acid uptake. *J Biol Chem.* 258, 1242-53.
- Norton, W. T., Iqbal, K., Tiffany, C., Tellez-Nagel, I., 1978. Huntington disease: normal lipid composition of purified neuronal perikarya and whole cortex. *Neurology.* 28, 812-6.
- Ohyama, Y., Meaney, S., Heverin, M., Ekstrom, L., Brafman, A., Shafir, M., Andersson, U., Olin, M., Eggertsen, G., Diczfalusy, U., Feinstein, E., Bjorkhem, I., 2005. Studies on the transcriptional regulation of cholesterol 24-hydroxylase (CYP46A1): Marked insensitivity towards different regulatory axes. *J.Biol.Chem.*
- Oksman, M., Iivonen, H., Högges, E., Amtul, Z., Penke, B., Leenders, I., Broersen, L., Lätjohann, D., Hartmann, T., Tanila, H., 2006. Impact of different saturated fatty acid, polyunsaturated fatty acid and cholesterol containing diets on beta-amyloid accumulation in APP/PS1 transgenic mice. *Neurobiol.Dis.* 23, 563-572.
- Oram, J. F., Heinecke, J. W., 2005. ATP-binding cassette transporter A1: a cell cholesterol exporter that protects against cardiovascular disease. *Physiol Rev.* 85, 1343-72.
- Ostrowski, S. M., Wilkinson, B. L., Golde, T. E., Landreth, G., 2007. Statins reduce amyloid-beta production through inhibition of protein isoprenylation. *J Biol Chem.* 282, 26832-44.
- Paciaroni, M., Hennerici, M., Agnelli, G., Bogousslavsky, J., 2007. Statins and stroke prevention. *Cerebrovasc.Dis.* 24, 170-182.
- Palay, S. L., Palade, G. E., 1955. The fine structure of neurons. *J Biophys Biochem Cytol.* 1, 69-88.
- Pannu, R., Christie, D. K., Barbosa, E., Singh, I., Singh, A. K., 2007. Post-trauma Lipitor treatment prevents endothelial dysfunction, facilitates neuroprotection, and promotes locomotor recovery following spinal cord injury. *J Neurochem.* 101, 182-200.
- Papassotiropoulos, A., Lätjohann, D., Bagli, M., Locatelli, S., Jessen, F., Rao, M. L., Maier, W., Bjorkhem, I., von Bergmann, K., Heun, R., 2000. Plasma 24S-hydroxycholesterol: a peripheral indicator of neuronal degeneration and potential state marker for Alzheimer's disease. *Neuroreport.* 11, 1959-1962.
- Papassotiropoulos, A., Wollmer, M. A., Tsolaki, M., Brunner, F., Molyva, D., Lätjohann, D., Nitsch, R. M., Hock, C., 2005. A cluster of cholesterol-related genes confers susceptibility for Alzheimer's disease. *J.Clin.Psychiatry.* 66, 940-947.
- Pappolla, M. A., Bryant-Thomas, T. K., Herbert, D., Pacheco, J., Fabra, G. M., Manjon, M., Girones, X., Henry, T. L., Matsubara, E., Zambon, D., Wolozin, B., Sano, M., Cruz-Sanchez, F. F., Thal, L. J., Petanceska, S. S., Refolo, L. M., 2003. Mild hypercholesterolemia is an early risk factor for the development of Alzheimer amyloid pathology. *Neurology.* 61, 199-205.
- Parkin, E. T., Hussain, I., Karran, E. H., Turner, A. J., Hooper, N. M., 1999. Characterization of detergent-insoluble complexes containing the familial Alzheimer's disease-associated presenilins. *J.Neurochem.* 72, 1534-1543.
- Pei, B., Chen, J. W., 2003. More ordered, convex ganglioside-enriched membrane domains: the effects of GM1 on sphingomyelin bilayers containing a low level of cholesterol. *J Biochem.(Tokyo).* 134, 575-581.
- Peters, I., Igbabvoa, U., Schütt, T., Haidari, S., Hartig, U., Böttner, S., Copanaki, E., Deller, T., Kögel, D., Wood, W. G., Müller, W. E., Eckert, G. P., 2009. The interaction of beta amyloid peptide with cellular membranes stimulates its own production. *BBA - Biomembranes.* DOI 10.1016/j.bbamem.2009.01.012.

- Petersen, R. C., Thomas, R. G., Grundman, M., Bennett, D., Doody, R., Ferris, S., Galasko, D., Jin, S., Kaye, J., Levey, A., Pfeiffer, E., Sano, M., van Dyck, C. H., Thal, L. J., 2005. Vitamin E and donepezil for the treatment of mild cognitive impairment. *N Engl J Med.* 352, 2379-88.
- Pfriege, F. W., 2003. Outsourcing in the brain: do neurons depend on cholesterol delivery by astrocytes? *Bioessays.* 25, 72-8.
- Pitas, R. E., Boyles, J. K., Lee, S. H., Hui, D., Weisgraber, K. H., 1987. Lipoproteins and their receptors in the central nervous system. Characterization of the lipoproteins in cerebrospinal fluid and identification of apolipoprotein B,E(LDL) receptors in the brain. *J Biol Chem.* 262, 14352-60.
- Plump, A. S., Breslow, J. L., 1995. Apolipoprotein E and the apolipoprotein E-deficient mouse. *Annu.Rev.Nutr.* 15, 495-518.
- Poirier, J., Davignon, J., Bouthillier, D., Kogan, S., Bertrand, P., Gauthier, S., 1993. Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's Disease. *Lancet.* 342, 697-699.
- Poirier, J., 2005. Apolipoprotein E, cholesterol transport and synthesis in sporadic Alzheimer's disease. *Neurobiol.Aging.* 26, 355-361.
- Porn, M. I., Tenhunen, J., Slotte, J. P., 1991. Increased steroid hormone secretion in mouse Leydig tumor cells after induction of cholesterol translocation by sphingomyelin degradation. *Biochim Biophys Acta.* 1093, 7-12.
- Porter, F. D., 2002. Malformation syndromes due to inborn errors of cholesterol synthesis. *J Clin Invest.* 110, 715-24.
- Prives, C., 1998. Signaling to p53: breaking the MDM2-p53 circuit. *Cell.* 95, 5-8.
- Puglielli, L., Konopka, G., Pack-Chung, E., Ingano, L. A., Berezovska, O., Hyman, B. T., Chang, T. Y., Tanzi, R. E., Kovacs, D. M., 2001. Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase modulates the generation of the amyloid beta-peptide. *Nat.Cell Biol.* 3, 905-912.
- Puglielli, L., Tanzi, R. E., Kovacs, D. M., 2003. Alzheimer's disease: the cholesterol connection. *Nat.Neurosci.* 6, 345-351.
- Pullarkat, R. K., Reha, H., 1982. Accumulation of dolichols in brains of elderly. *J Biol Chem.* 257, 5991-3.
- Puttfarcken, P. S., Manelli, A. M., Falduto, M. T., Getz, G. S., LaDu, M. J., 1997. Effect of apolipoprotein E on neurite outgrowth and beta-amyloid- induced toxicity in developing rat primary hippocampal cultures. *J Neurochem.* 68, 760-769.
- Qu, Q., Sharom, F. J., 2002. Proximity of bound Hoechst 33342 to the ATPase catalytic sites places the drug binding site of P-glycoprotein within the cytoplasmic membrane leaflet. *Biochemistry.* 41, 4744-52.
- Quan, G., Xie, C., Dietschy, J. M., Turley, S. D., 2003. Ontogenesis and regulation of cholesterol metabolism in the central nervous system of the mouse. *Brain Res.Dev.Brain Res.* 146, 87-98.
- Quarles, R. H., 1989. Myelin-associated glycoprotein in demyelinating disorders. *Crit Rev Neurobiol.* 5, 1-28.
- Quelle, D. E., Zindy, F., Ashmun, R. A., Sherr, C. J., 1995. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell.* 83, 993-1000.
- Quest, A. F., Leyton, L., Parraga, M., 2004. Caveolins, caveolae, and lipid rafts in cellular transport, signaling, and disease. *Biochem Cell Biol.* 82, 129-44.
- Radeva, G., Perabo, J., Sharom, F. J., 2005. P-Glycoprotein is localized in intermediate-density membrane microdomains distinct from classical lipid rafts and caveolar domains. *FEBS J.* 272, 4924-37.

- Rajanikant, G. K., Zemke, D., Kassab, M., Majid, A., 2007. The therapeutic potential of statins in neurological disorders. *Curr.Med.Chem.* 14, 103-112.
- Rall, S. C., Jr., Weisgraber, K. H., Mahley, R. W., 1982. Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence. *J Biol Chem.* 257, 4171-8.
- Ramaswamy, G., Xu, Q., Huang, Y., Weisgraber, K. H., 2005. Effect of domain interaction on apolipoprotein E levels in mouse brain. *J Neurosci.* 25, 10658-63.
- Ramsey, R. B., Nicholas, H. J., 1972. Brain lipids. *Adv Lipid Res.* 10, 143-232.
- Rao, A. M., Igbavboa, U., Semotuk, M., Schroeder, F., Wood, W. G., 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.
- Raunser, S., Haase, W., Franke, C., Eckert, G. P., Muller, W. E., Kuhlbrandt, W., 2006. Heterologously expressed GLT-1 associates in approximately 200-nm protein-lipid islands. *Biophys J.* 91, 3718-3726.
- Rea, T. D., Breitner, J. C., Psaty, B. M., Fitzpatrick, A. L., Lopez, O. L., Newman, A. B., Hazzard, W. R., Zandi, P. P., Burke, G. L., Lyketsos, C. G., Bernick, C., Kuller, L. H., 2005. Statin use and the risk of incident dementia - The cardiovascular health study. *Archives of Neurology.* 62, 1047-1051.
- Refolo, L. M., Pappolla, M. A., Malester, B., LaFrancois, J., Bryant-Thomas, T., Wang, R., Tint, G. S., Sambamurti, K., Duff, K., 2000. Hypercholesterolemia Accelerates the Alzheimer's Amyloid Pathology in a Transgenic Mouse Model. *Neurobiol.Dis.* 7, 321-331.
- Regieli, J. J., Jukema, J. W., Grobbee, D. E., Kastelein, J. J., Kuivenhoven, J. A., Zwinderman, A. H., van der Graaf, Y., Bots, M. L., Doevendans, P. A., 2008. CETP genotype predicts increased mortality in statin-treated men with proven cardiovascular disease: an adverse pharmacogenetic interaction. *Eur Heart J.* 29, 2792-9.
- Reid, P. C., Urano, Y., Kodama, T., Hamakubo, T., 2007. Alzheimer's disease: cholesterol, membrane rafts, isoprenoids and statins. *J Cell Mol Med.* 11, 383-392.
- Repa, J. J., Liang, G., Ou, J., Bashmakov, Y., Lobaccaro, J. M., Shimomura, I., Shan, B., Brown, M. S., Goldstein, J. L., Mangelsdorf, D. J., 2000. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev.* 14, 2819-30.
- Ridley, A. J., 2001. Rho proteins: linking signaling with membrane trafficking. *Traffic.* 2, 303-10.
- Riepe, M. W., Huber, R., 2008. Secondary stroke prevention: inside the vessels and beyond. *Cns Drugs.* 22, 113-21.
- Rip, J. W., Rupar, C. A., Ravi, K., Carroll, K. K., 1985. Distribution, metabolism and function of dolichol and polyprenols. *Prog Lipid Res.* 24, 269-309.
- Rockwood, K., Kirkland, S., Hogan, D. B., 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.
- Rockwood, K., 2006. Epidemiological and clinical trials evidence about a preventive role for statins in Alzheimer's disease. *Acta Neurol.Scand.Suppl.* 185, 71-77.
- Roheim, P. S., Carey, M., Forte, T., Vega, G. L., 1979. Apolipoproteins in human cerebrospinal fluid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76, 4646-9.
- Roher, A. E., Kuo, Y. M., Kokjohn, K. M., Emmerling, M. R., Gracon, S., 1999. Amyloid and lipids in the pathology of Alzheimer disease. *Amyloid.* 6, 136-145.
- Romsicki, Y., Sharom, F. J., 1999. The membrane lipid environment modulates drug interactions with the P-glycoprotein multidrug transporter. *Biochemistry.* 38, 6887-96.

- Rosenberg, P. B., Mielke, M. M., Tschanz, J., Cook, L., Corcoran, C., Hayden, K. M., Norton, M., Rabins, P. V., Green, R. C., Welsh-Bohmer, K. A., Breitner, J. C., Munger, R., Lyketsos, C. G., 2008. Effects of cardiovascular medications on rate of functional decline in Alzheimer disease. *Am J Geriatr Psychiatry*. 16, 883-92.
- Rothblat, G. H., Mahlberg, F. H., Johnson, W. J., Phillips, M. C., 1992. Apolipoproteins, membrane cholesterol domains, and the regulation of cholesterol efflux. *J.Lipid Res*. 33, 1091-1097.
- Runquist, M., Parmryd, I., Thelin, A., Chojnacki, T., Dallner, G., 1995. Distribution of branch point prenyltransferases in regions of bovine brain. *J.Neurochem*. 65, 2299-2306.
- 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.
- 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.
- Salminen, A., Suuronen, T., Kaarniranta, K., 2008. ROCK, PAK, and Toll of synapses in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 371, 587-90.
- Sano, M., Ernesto, C., Thomas, R. G., Klauber, M. R., Schafer, K., Grundman, M., Woodbury, P., Growdon, J., Cotman, C. W., Pfeiffer, E., Schneider, L. S., Thal, L. J., 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, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D., St George-Hyslop, P. H., Pericak Vance, M. A., Joo, S. H., Rosi, B. L., Gusella, J. F., Crapper McLachlan, D. R., Alberts, M. J., Hulette, C., Crain, B., Goldgaber, D., Roses, A. D., 1993. Association of apolipoprotein E allele 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's Disease. *Neurology*. 43, 1467-1472.
- Sawamura, N., Ko, M., Yu, W., Zou, K., Hanada, K., Suzuki, T., Gong, J. S., Yanagisawa, K., Michikawa, M., 2004. Modulation of amyloid precursor protein cleavage by cellular sphingolipids. *J.Biol.Chem*. 279, 11984-11991.
- Schachter, D., Abbott, R. E., Cogan, U., Flamm, M., 1983. Lipid fluidity of the individual hemileaflets of human erythrocyte membranes. *Ann N Y Acad Sci*. 414, 19-28.
- Scheper, W., Zwart, R., Baas, F., 2004. Rab6 membrane association is dependent of Presenilin 1 and cellular phosphorylation events. *Brain Res Mol Brain Res*. 122, 17-23.
- Scheper, W., Hoozemans, J. J., Hoogenraad, C. C., Rozemuller, A. J., Eikelenboom, P., Baas, F., 2007. Rab6 is increased in Alzheimer's disease brain and correlates with endoplasmic reticulum stress. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 33, 523-32.
- Scheuer, K., Stoll, S., Paschke, U., Weigel, R., Muller, W. E., 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.
- Schinkel, A. H., 1997. The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. *Semin.Cancer Biol*. 8, 161-170.
- Schneider, A., Rajendran, L., Honsho, M., Gralle, M., Donnert, G., Wouters, F., Hell, S. W., Simons, M., 2008. Flotillin-dependent clustering of the amyloid precursor protein regulates its endocytosis and amyloidogenic processing in neurons. *J Neurosci*. 28, 2874-82.

- Schroeder, F., Gorka, C., Williamson, L. S., Wood, W. G., 1987. The influence of dolichols on fluidity of mouse synaptic plasma membranes. *Biochim Biophys Acta.* 902, 385-93.
- Schroeder, F., Morrison, W. J., Gorka, C., Wood, W. G., 1988. Transbilayer effects of ethanol on fluidity of brain membrane leaflets. *Biochim.Biophys.Acta.* 946, 85-94.
- Schroeder, F., Nemezc, G., Wood, W. G., Joiner, C., Morrot, G., Ayrault-Jarrier, M., Devaux, P. F., 1991. Transmembrane distribution of sterol in the human erythrocyte. *Biochim.Biophys.Acta.* 1066, 183-192.
- Schroeder, F., Woodford, J. K., Kavecansky, J., Wood, W. G., Joiner, C., 1995. Cholesterol domains in biological membranes. *Mol.Membr.Biol.* 12, 113-119.
- Schroeder, F., Gallegos, A. M., Atshaves, B. P., Storey, S. M., McIntosh, A. L., Petrescu, A. D., Huang, H., Starodub, O., Chao, H., Yang, H., Frolov, A., Kier, A. B., 2001. Recent advances in membrane microdomains: rafts, caveolae, and intracellular cholesterol trafficking. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)*. 226, 873-890.
- Schulte, T., Paschke, K. A., Laessing, U., Lottspeich, F., Stuermer, C. A., 1997. Reggie-1 and reggie-2, two cell surface proteins expressed by retinal ganglion cells during axon regeneration. *Development.* 124, 577-87.
- Serougne-Gautheron, C., Chevallier, F., 1973. Time course of biosynthetic cholesterol in the adult rat brain. *Biochim Biophys Acta.* 316, 244-50.
- Shepherd, J., Blauw, G. J., Murphy, M. B., Bollen, E. L., Buckley, B. M., Cobbe, S. M., Ford, I., Gaw, A., Hyland, M., Jukema, J. W., Kamper, A. M., Macfarlane, P. W., Meinders, A. E., Norrie, J., Packard, C. J., Perry, I. J., Stott, D. J., Sweeney, B. J., Twomey, C., Westendorp, R. G., 2002. Pravastatin in elderly individuals at risk of vascular disease (PROSPER): a randomised controlled trial. *Lancet.* 360, 1623-1630.
- Shohami, E., Yatsiv, I., Alexandrovich, A., Haklai, R., Elad-Sfadia, G., Grossman, R., Biegon, A., Kloog, Y., 2003. The Ras inhibitor S-trans, trans-farnesylthiosalicylic acid exerts long-lasting neuroprotection in a mouse closed head injury model. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 23, 728-738.
- Simons, K., Ikonen, E., 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature.* 387, 569-572.
- Simons, K., Ikonen, E., 2000a. How cells handle cholesterol. *Science.* 290, 1721-1726.
- Simons, K., Toomre, D., 2000b. Lipid Rafts and Signal Transduction. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 1, 31-39.
- Simons, K., Ehehalt, R., 2002. Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J.Clin.Invest.* 110, 597-603.
- Simons, M., Keller, P., De Strooper, B., Beyreuther, K., Dotti, C. G., Simons, K., 1998. Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 95, 6460-6464.
- Sing, C. F., Davignon, J., 1985. Role of the apolipoprotein E polymorphism in determining normal plasma lipid and lipoprotein variation. *Am J Hum Genet.* 37, 268-85.
- Singer, S. J., Nicholson, G. L., 1972. The fluid mosaic model of structure of cell membranes. *Science.* 175, 720-731.
- Sipione, S., Rigamonti, D., Valenza, M., Zuccato, C., Conti, L., Pritchard, J., Kooperberg, C., Olson, J. M., Cattaneo, E., 2002. Early transcriptional profiles in huntingtin-inducible striatal cells by microarray analyses. *Hum Mol Genet.* 11, 1953-65.
- Slotte, J. P., Bierman, E. L., 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, 653-8.
- Slotte, J. P., Hedstrom, G., Rannstrom, S., Ekman, S., 1989. Effects of sphingomyelin degradation on cell cholesterol oxidizability and steady-state distribution between the cell surface and the cell interior. *Biochim Biophys Acta.* 985, 90-96.

- Slotte, J. P., Bittman, R., Cholesterol - Sphingomyelin Interactions in Cells - Effects on Lipid Metabolism. *Subcellular Biochemistry*. Plenum Press, New York, 1997, pp. 277-292.
- Soderberg, M., Edlund, C., Alafuzoff, I., Kristensson, K., Dallner, G., 1992. Lipid composition in different regions of the brain in Alzheimer's disease/senile dementia of Alzheimer's type. *J Neurochem*. 59, 1646-53.
- Solomon, K. R., Freeman, M. R., 2008. Do the cholesterol-lowering properties of statins affect cancer risk? *Trends Endocrinol Metab*. 19, 113-21.
- Song, C., Hiipakka, R. A., Kokontis, J. M., Liao, S., 1995. Ubiquitous receptor: structures, immunocytochemical localization, and modulation of gene activation by receptors for retinoic acids and thyroid hormones. *Ann N Y Acad Sci*. 761, 38-49.
- Sparks, D. L., Connor, D. J., Browne, P. J., Lopez, J. E., Sabbagh, M. N., 2002. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) in the treatment of Alzheimer's disease and why it would be ill-advise to use one that crosses the blood-brain barrier. *J.Nutr.Health Aging*. 6, 324-331.
- Sparks, D. L., Sabbagh, M. N., Connor, D. J., Lopez, J., Launer, L. J., Browne, P., Wasser, D., Johnson-Traver, S., Lochhead, J., Ziolkowski, C., 2005. Atorvastatin for the treatment of mild to moderate Alzheimer disease - Preliminary results. *Archives of Neurology*. 62, 753-757.
- Sparks, D. L., Connor, D. J., Sabbagh, M. N., Petersen, R. B., Lopez, J., Browne, P., 2006a. Circulating cholesterol levels, apolipoprotein E genotype and dementia severity influence the benefit of atorvastatin treatment in Alzheimer's disease: results of the Alzheimer's Disease Cholesterol-Lowering Treatment (ADCLT) trial. *Acta Neurol.Scand.Suppl*. 185, 3-7.
- Sparks, D. L., Sabbagh, M., Connor, D., Soares, H., Lopez, J., Stankovic, G., Johnson-Traver, S., Ziolkowski, C., Browne, P., 2006b. Statin therapy in Alzheimer's disease. *Acta Neurologica Scandinavica*. 114, 78-86.
- Srere, P. A., Chaikoff, I. L., Treitman, S. S., Burnstein, L. S., 1950. The extrahepatic synthesis of cholesterol. *J Biol Chem*. 182.
- Staffa, J. A., Chang, J., Green, L., 2002. Cerivastatin and reports of fatal rhabdomyolysis. *N Engl J Med*. 346, 539-40.
- Steinberg, D., 2008. The statins in preventive cardiology. *N Engl J Med*. 359, 1426-7.
- Steiner, H., Fluhrer, R., Haass, C., 2008. Intramembrane proteolysis by gamma-secretase. *J Biol Chem*. 283, 29627-31.
- Steiner, S., Gatlin, C. L., Lennon, J. J., McGrath, A. M., Aponte, A. M., Makusky, A. J., Rohrs, M. C., Anderson, N. L., 2000. Proteomics to display lovastatin-induced protein and pathway regulation in rat liver. *Electrophoresis*. 21, 2129-37.
- Subczynski, W. K., Kusumi, A., 2003. Dynamics of raft molecules in the cell and artificial membranes: approaches by pulse EPR spin labeling and single molecule optical microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*. 1610, 231-243.
- Subramaniam, R., Koppal, T., Green, M., Yatin, S., Jordan, B., Drake, J., Butterfield, D. A., 1998. The free radical antioxidant vitamin E protects cortical synaptosomal membranes from amyloid beta-peptide(25-35) toxicity but not from hydroxynonenal toxicity: relevance to the free radical hypothesis of Alzheimer's disease. *Neurochem Res*. 23, 1403-1410.
- Sun, Y., Wu, S., Bu, G., Onifade, M. K., Patel, S. N., LaDu, M. J., Fagan, A. M., Holtzman, D. M., 1998. Glial fibrillary acidic protein-apolipoprotein E (apoE) transgenic mice: astrocyte-specific expression and differing biological effects of astrocyte-secreted apoE3 and apoE4 lipoproteins. *J Neurosci*. 18, 3261-72.

- Sun, Y., Yao, J., Kim, T. W., Tall, A. R., 2003. Expression of liver X receptor target genes decreases cellular amyloid beta peptide secretion. *J.Biol.Chem.* 278, 27688-27694.
- Suresh, S., Yan, Z., Patel, R. C., Patel, Y. C., Patel, S. C., 1998. Cellular cholesterol storage in the Niemann-Pick disease type C mouse is associated with increased expression and defective processing of apolipoprotein D. *J Neurochem.* 70, 242-51.
- Suzuki, H., Park, S. J., Tamura, M., Ando, S., 1998. Effect of the long-term feeding of dietary lipids on the learning ability, fatty acid composition of brain stem phospholipids and synaptic membrane fluidity in adult mice: a comparison of sardine oil diet with palm oil diet. *Mech.Ageing Dev.* 101, 119-128.
- Svennerholm, L., Bostrom, K., Jungbjer, B., Olsson, L., 1994. Membrane lipids of adult human brain: lipid composition of frontal and temporal lobe in subjects of age 20 to 100 years. *J.Neurochem.* 63, 1802-1811.
- Swanson, K. M., Hohl, R. J., 2006. Anti-cancer therapy: targeting the mevalonate pathway. *Curr Cancer Drug Targets.* 6, 15-37.
- Takai, Y., Sasaki, T., Matozaki, T., 2001. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev.* 81, 153-208.
- Takashima, A., Shimojo, M., Wolozin, B., 2006. The players on the gamma-secretase team. *Nature Medicine.* 12, 766-767.
- Takemoto, M., Node, K., Nakagami, H., Liao, Y., Grimm, M., Takemoto, Y., Kitakaze, M., Liao, J. K., 2001. Statins as antioxidant therapy for preventing cardiac myocyte hypertrophy. *J.Clin.Invest.* 108, 1429-1437.
- Tamboli, I. Y., Prager, K., Barth, E., Heneka, M., Sandhoff, K., Walter, J., 2005. Inhibition of Glycosphingolipid Biosynthesis Reduces Secretion of the {beta}-Amyloid Precursor Protein and Amyloid {beta}-Peptide. *J.Biol.Chem.* 280, 28110-28117.
- Tashima, Y., Oe, R., Lee, S., Sugihara, G., Chambers, E. J., Takahashi, M., Yamada, T., 2004. The effect of cholesterol and monosialoganglioside (GM1) on the release and aggregation of amyloid beta-peptide from liposomes prepared from brain membrane-like lipids. *J Biol Chem.* 279, 17587-17595.
- Tatley, M., Savage, R., 2007. Psychiatric adverse reactions with statins, fibrates and ezetimibe: implications for the use of lipid-lowering agents. *Drug Saf.* 30, 195-201.
- Teixeira, A., Chaverot, N., Schroder, C., Strosberg, A. D., Couraud, P. O., Cazaubon, S., 1999. Requirement of caveolae microdomains in extracellular signal-regulated kinase and focal adhesion kinase activation induced by endothelin-1 in primary astrocytes. *J Neurochem.* 72, 120-8.
- Teter, B., Xu, P. T., Gilbert, J. R., Roses, A. D., Galasko, D., Cole, G. M., 2002. Defective neuronal sprouting by human apolipoprotein E4 is a gain-of-negative function. *J Neurosci Res.* 68, 331-6.
- Teter, B., Finch, C. E., 2004. Caliban's heritage and the genetics of neuronal aging. *Trends Neurosci.* 27, 627-32.
- Thiele, C., Hannah, M. J., Fahrenholz, F., Huttner, W. B., 2000. Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. *Nat.Cell Biol.* 2, 42-49.
- Titov, V. N., 1997. Structure of apo A-I high-density lipoproteins: a review. *Biochemistry (Mosc).* 62, 1-14.
- Tong, H., Holstein, S. A., Hohl, R. J., 2005. Simultaneous determination of farnesyl and geranylgeranyl pyrophosphate levels in cultured cells. *Anal.Biochem.* 336, 51-59.

- Tong, H., Wiemer, A. J., Neighbors, J. D., Hohl, R. J., 2008. Quantitative determination of farnesyl and geranylgeranyl diphosphate levels in mammalian tissue. *Anal Biochem.*
- Tosi, M. R., Bottura, G., Lucchi, P., Reggiani, A., Trincherò, A., Tugnoli, V., 2003. Cholesteryl esters in human malignant neoplasms. *Int J Mol Med.* 11, 95-8.
- Tsai, S. J., 2007. Statins may enhance the proteolytic cleavage of proBDNF: implications for the treatment of depression. *Med Hypotheses.* 68, 1296-9.
- Tsujimoto, Y., Yunis, J., Onorato-Showe, L., Erikson, J., Nowell, P. C., Croce, C. M., 1984. Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11;14) chromosome translocation. *Science.* 224, 1403-6.
- Tsutsui, K., Sakamoto, H., Ukena, K., 2003. Biosynthesis and action of neurosteroids in the cerebellar Purkinje neuron. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 85, 311-321.
- Tuccori, M., Lapi, F., Testi, A., Coli, D., Moretti, U., Vannacci, A., Motola, D., Salvo, F., Rivolta, A. L., Blandizzi, C., Mugelli, A., Del Tacca, M., 2008. Statin-associated psychiatric adverse events: a case/non-case evaluation of an Italian database of spontaneous adverse drug reaction reporting. *Drug Saf.* 31, 1115-23.
- 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.
- Urano, Y., Hayashi, I., Isoo, N., Reid, P. C., Shibasaki, Y., Noguchi, N., Tomita, T., Iwatsubo, T., Hamakubo, T., Kodama, T., 2005. Association of active gamma-secretase complex with lipid rafts. *J Lipid Res.* 46, 904-12.
- Valenza, M., Rigamonti, D., Goffredo, D., Zuccato, C., Fenu, S., Jamot, L., Strand, A., Tarditi, A., Woodman, B., Racchi, M., Mariotti, C., Di Donato, S., Corsini, A., Bates, G., Pruss, R., Olson, J. M., Sipione, S., Tartari, M., Cattaneo, E., 2005. Dysfunction of the cholesterol biosynthetic pathway in Huntington's disease. *J Neurosci.* 25, 9932-9.
- Valenza, M., Cattaneo, E., 2006. Cholesterol dysfunction in neurodegenerative diseases: Is Huntington's disease in the list? *Prog. Neurobiol.*
- van der Luit, A. H., Budde, M., Ruurs, P., Verheij, M., van Blitterswijk, W. J., 2002. Alkyllysophospholipid accumulates in lipid rafts and induces apoptosis via raft-dependent endocytosis and inhibition of phosphatidylcholine synthesis. *J Biol Chem.* 277, 39541-7.
- Vance, J. E., Pan, D., Campenot, R. B., Bussiere, M., Vance, D. E., 1994. Evidence that the major membrane lipids, except cholesterol, are made in axons of cultured rat sympathetic neurons. *J Neurochem.* 62, 329-37.
- Vance, J. E., Hayashi, H., Karten, B., 2005. Cholesterol homeostasis in neurons and glial cells. *Semin. Cell Dev. Biol.* 16, 193-212.
- Vanier, M. T., 1983. Biochemical studies in Niemann-Pick disease. I. Major sphingolipids of liver and spleen. *Biochim Biophys Acta.* 750, 178-84.
- Vega, F. M., Ridley, A. J., 2008. Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Lett.* 582, 2093-101.
- Vereb, G., Szollosi, J., Matko, J., Nagy, P., Farkas, T., Vigh, L., Matyus, L., Waldmann, T. A., Damjanovich, S., 2003. Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 100, 8053-8058.
- Verkleij, A. J., Zwaal, R. F., Roelofsen, B., Comfurius, P., Kastelijn, D., van Deenen, L. L., 1973. The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy. *Biochim Biophys Acta.* 323, 178-93.

- Vetrivel, K. S., Cheng, H., Kim, S. H., Chen, Y., Barnes, N. Y., Parent, A. T., Sisodia, S. S., Thinakaran, G., 2005. Spatial segregation of gamma-secretase and substrates in distinct membrane domains. *J.Biol.Chem.* 280, 25892-25900.
- Vogelgesang, S., Cascorbi, I., Schroeder, E., Pahnke, J., Kroemer, H. K., Siegmund, W., Kunert-Keil, C., Walker, L. C., Warzok, R. W., 2002. Deposition of Alzheimer's beta-amyloid is inversely correlated with P-glycoprotein expression in the brains of elderly non-demented humans. *Pharmacogenetics.* 12, 535-41.
- von Arnim, C. A., von Einem, B., Weber, P., Wagner, M., Schwanzar, D., Spoelgen, R., Strauss, W. L., Schneckenburger, H., 2008. Impact of cholesterol level upon APP and BACE proximity and APP cleavage. *Biochem Biophys Res Commun.* 370, 207-12.
- Wada, S., Morishima-Kawashima, M., Qi, Y., Misono, H., Shimada, Y., Ohno-Iwashita, Y., Ihara, Y., 2003. Gamma-secretase activity is present in rafts but is not cholesterol-dependent. *Biochemistry.* 42, 13977-13986.
- Waelsch, H., Sperry, W. M., Stoyanoff, V. A., 1940. Lipid metabolism in brain during myelination. *J Biol Chem.* 135.
- Wahrle, S., Das, P., Nyborg, A. C., McLendon, C., Shoji, M., Kawarabayashi, T., Younkin, L. H., Younkin, S. G., Golde, T. E., 2002. Cholesterol-dependent gamma-secretase activity in buoyant cholesterol-rich membrane microdomains. *Neurobiol.Dis.* 9, 11-23.
- Wakabayashi, M., Okada, T., Kozutsumi, Y., Matsuzaki, K., 2005. GM1 ganglioside-mediated accumulation of amyloid beta-protein on cell membranes. *Biochem.Biophys Res Commun.* 328, 1019-1023.
- Wang, E., Casciano, C. N., Clement, R. P., Johnson, W. W., 2000. Cholesterol interaction with the daunorubicin binding site of P-glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun.* 276, 909-16.
- Wang, H., Yu, S. W., Koh, D. W., Lew, J., Coombs, C., Bowers, W., Federoff, H. J., Poirier, G. G., Dawson, T. M., Dawson, V. L., 2004. Apoptosis-inducing factor substitutes for caspase executioners in NMDA-triggered excitotoxic neuronal death. *J Neurosci.* 24, 10963-73.
- Wang, H., Lynch, J. R., Song, P., Yang, H. J., Yates, R. B., Mace, B., Warner, D. S., Guyton, J. R., Laskowitz, D. T., 2007. Simvastatin and atorvastatin improve behavioral outcome, reduce hippocampal degeneration, and improve cerebral blood flow after experimental traumatic brain injury. *Exp.Neurol.*
- Wang, S., Rosengren, L. E., Franlund, M., Hamberger, A., Haglid, K. G., 1999. Bcl-2 expression regulates cell sensitivity to S100beta-mediated apoptosis. *Brain Res Mol Brain Res.* 70, 167-76.
- Wassmann, S., Laufs, U., Baumer, A. T., Muller, K., Ahlbory, K., Linz, W., Itter, G., Rosen, R., Bohm, M., Nickenig, G., 2001. HMG-CoA reductase inhibitors improve endothelial dysfunction in normocholesterolemic hypertension via reduced production of reactive oxygen species. *Hypertension.* 37, 1450-1457.
- Weber, C. C., Eckert, G. P., Muller, W. E., 2006a. Effects of antidepressants on the brain/plasma distribution of corticosterone. *Neuropsychopharmacology.* 31, 2443-8.
- Weber, M. S., Youssef, S., Dunn, S. E., Prod'homme, T., Neuhaus, O., Stuve, O., Greenwood, J., Steinman, L., Zamvil, S. S., 2006b. Statins in the treatment of central nervous system autoimmune disease. *J Neuroimmunol.* 178, 140-148.
- Wei, H., Leeds, P. R., Qian, Y., Wei, W., Chen, R., Chuang, D., 2000. beta-amyloid peptide-induced death of PC 12 cells and cerebellar granule cell neurons is inhibited by long-term lithium treatment. *Eur J Pharmacol.* 392, 117-23.

- Weisgraber, K. H., Rall, S. C., Jr., Mahley, R. W., 1981. Human E apoprotein heterogeneity. Cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms. *J Biol Chem.* 256, 9077-83.
- Werner, N., Nickenig, G., Laufs, U., 2002. Pleiotropic effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Basic Res Cardiol.* 97, 105-16.
- West, K. L., Fernandez, M. L., 2004. Guinea pigs as models to study the hypocholesterolemic effects of drugs. *Cardiovasc. Drug Rev.* 22, 55-70.
- White, F., Nicoll, J. A., Horsburgh, K., 2001. Alterations in ApoE and ApoJ in relation to degeneration and regeneration in a mouse model of entorhinal cortex lesion. *Exp. Neurol.* 169, 307-318.
- Whitney, K. D., Watson, M. A., Collins, J. L., Benson, W. G., Stone, T. M., Numerick, M. J., Tippin, T. K., Wilson, J. G., Winegar, D. A., Kliewer, S. A., 2002. Regulation of cholesterol homeostasis by the liver x receptors in the central nervous system. *Mol. Endocrinol.* 16, 1378-1385.
- Willy, P. J., Umesono, K., Ong, E. S., Evans, R. M., Heyman, R. A., Mangelsdorf, D. J., 1995. LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev.* 9, 1033-45.
- Wolfe, L. S., Ng Ying Kin, N. M., Palo, J., Haltia, M., 1982. Raised levels of cerebral cortex dolichols in Alzheimer's disease. *Lancet.* 2, 99.
- Wolozin, B., Kellman, W., Ruosseau, P., Celesia, G. G., Siegel, G., 2000. Decreased prevalence of alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch. Neurol.* 57, 1439-1443.
- Wolozin, B., 2002. Cholesterol and Alzheimer's disease. *Biochem. Soc. Trans.* 30, 525-529.
- Wolozin, B., 2004. Cholesterol and the biology of Alzheimer's disease. *Neuron.* 41, 7-10.
- Wood, W. G., Gorka, C., Williamson, L. S., Strong, R., Sun, A. Y., Sun, G. Y., Schroeder, F., 1986. Dolichol alters dynamic and static properties of mouse synaptosomal plasma membranes. *FEBS Lett.* 205, 25-8.
- Wood, W. G., Gorka, C., Schroeder, F., 1989a. Acute and chronic effects of ethanol on transbilayer membrane domains. *J. Neurochem.* 52, 1925-1930.
- Wood, W. G., Sun, G. Y., Schroeder, F., 1989b. Membrane properties of dolichol in different age groups of mice. *Chem Phys Lipids.* 51, 219-26.
- Wood, W. G., Schroeder, F., Hogy, L., Rao, A. M., Nemezc, G., 1990. Asymmetric distribution of a fluorescent sterol in synaptic plasma membranes: effects of chronic ethanol consumption. *Biochim. Biophys. Acta.* 1025, 243-246.
- Wood, W. G., Rao, A. M., 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, W. G., Igbavboa, U., Rao, A. M., Schroeder, F., Avdulov, N. A., 1995. Cholesterol oxidation reduces Ca²⁺-ATPase activity, interdigitation, and increases fluidity of brain synaptic plasma membranes. *Brain Res.* 683, 36-42.
- Wood, W. G., Schroeder, F., Avdulov, N. A., Chochina, S. V., Igbavboa, U., 1999. Recent advances in brain cholesterol dynamics: transport, domains, and Alzheimer's disease. *Lipids.* 34, 225-234.
- Wood, W. G., Schroeder, F., Igbavboa, U., Avdulov, N. A., Chochina, S. V., 2002. Brain membrane cholesterol domains, aging and amyloid beta-peptides. *Neurobiol. Aging.* 23, 685.
- Wood, W. G., Eckert, G. P., Igbavboa, U., Müller, W. E., 2003. Amyloid beta-protein interactions with membranes and cholesterol: causes or casualties of Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 1610, 281-290.

- Wood, W. G., Igbavboa, U., Eckert, G. P., Johnson-Anuna, L. N., Muller, W. E., 2005. Is hypercholesterolemia a risk factor for Alzheimer's disease? *Mol. Neurobiol.* 31, 185-192.
- Wood, W. G., Igbavboa, U., Eckert, G. P., Müller, W. E., Cholesterol - A Janus Face molecule in the central nervous system. In: Lajtha, Abel, Reith, Marten, Eds.), *Neural Membranes and Transport*. Plenum Press, New York, 2007, pp. 513pp.
- Wu, C., Butz, S., Ying, Y., Anderson, R. G., 1997. Tyrosine kinase receptors concentrated in caveolae-like domains from neuronal plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 272, 3554-3559.
- Xiong, G. L., Benson, A., Doraiswamy, P. M., 2005. Statins and cognition: what can we learn from existing randomized trials? *CNS Spectr.* 10, 867-74.
- Xu, Q., Li, Y., Cyras, C., Sanan, D. A., Cordell, B., 2000. Isolation and characterization of apolipoproteins from murine microglia. Identification of a low density lipoprotein-like apolipoprotein J-rich but E-poor spherical particle. *J. Biol. Chem.* 275, 31770-31777.
- Yamada, E., 1955. The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J. Biophys Biochem Cytol.* 1, 445-58.
- Yamazaki, T., Chang, T. Y., Haass, C., Ihara, Y., 2000. Accumulation and aggregation of amyloid {beta}-protein in late endosomes of Niemann-Pick type C cells. *J. Biol. Chem.*
- Yanagisawa, K., 2007. Role of gangliosides in Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 1768, 1943-1951.
- Yang, C. C., Jick, S. S., Jick, H., 2003. Lipid-lowering drugs and the risk of depression and suicidal behavior. *Arch Intern Med.* 163, 1926-32.
- Ye, S., Huang, Y., Mullendorff, K., Dong, L., Giedt, G., Meng, E. C., Cohen, F. E., Kuntz, I. D., Weisgraber, K. H., Mahley, R. W., 2005. Apolipoprotein (apo) E4 enhances amyloid beta peptide production in cultured neuronal cells: apoE structure as a potential therapeutic target. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 18700-5.
- Yin, X. M., Oltvai, Z. N., Korsmeyer, S. J., 1995. Heterodimerization with Bax is required for Bcl-2 to repress cell death. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 194, 331-338.
- Youdim, M. B., Arraf, Z., 2004. Prevention of MPTP (N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) dopaminergic neurotoxicity in mice by chronic lithium: involvements of Bcl-2 and Bax. *Neuropharmacology.* 46, 1130-40.
- Youssef, S., Stuve, O., Patarroyo, J. C., Ruiz, P. J., Radosevich, J. L., Hur, E. M., Bravo, M., Mitchell, D. J., Sobel, R. A., Steinman, L., Zamvil, S. S., 2002. The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes a Th2 bias and reverses paralysis in central nervous system autoimmune disease. *Nature.* 420, 78-84.
- Zacco, A., Togo, J., Spence, K., Ellis, A., Lloyd, D., Furlong, S., Piser, T., 2003. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors protect cortical neurons from excitotoxicity. *J. Neurosci.* 23, 11104-11111.
- Zachowski, A., 1993. Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochem J.* 294 (Pt 1), 1-14.
- Zamrini, E., McGwin, G., Roseman, J. M., 2004. Association between statin use and Alzheimer's disease. *Neuroepidemiology.* 23, 94-98.
- Zandi, P. P., Sparks, D. L., Khachaturian, A. S., Tschanz, J., Norton, M., Steinberg, M., Welsh-Bohmer, K. A., Breitner, J. C., 2005. Do statins reduce risk of incident dementia and Alzheimer disease? The Cache County Study. *Arch. Gen. Psychiatry.* 62, 217-224.

- Zha, Q., Ruan, Y., Hartmann, T., Beyreuther, K., Zhang, D., 2004. GM1 ganglioside regulates the proteolysis of amyloid precursor protein. *Mol Psychiatry*. 9, 946-952.
- Zhang, Y., Appelkvist, E. L., Kristensson, K., Dallner, G., 1996. The lipid compositions of different regions of rat brain during development and aging. *Neurobiol.Aging*. 17, 869-875.
- Zhou, S., Zhou, H., Walian, P. J., Jap, B. K., 2007. Regulation of gamma-secretase activity in Alzheimer's disease. *Biochemistry*. 46, 2553-2563.
- Zhou, Y., Richardson, J. S., 1996. Cholesterol protects PC12 cells from beta-amyloid induced calcium disordering and cytotoxicity. *Neuroreport*. 7, 2487-2490.
- Zhou, Y., Suram, A., Venugopal, C., Prakasam, A., Lin, S., Su, Y., Li, B., Paul, S. M., Sambamurti, K., 2008. Geranylgeranyl pyrophosphate stimulates gamma-secretase to increase the generation of Abeta and APP-CTFgamma. *FASEB J*. 22, 47-54.

7. Anhang

7.1. Curriculum vitae

Persönliche Daten:

Geburtstag: 04. Juni 1969
Geburtsort: Worms
Nationalität: deutsch



Schulbildung:

1979 - 1988 Gauß-Gymnasium, Worms, Abschluss: Abitur.

Wehrdienst:

1988 - 1989 Grundwehrdienst, Lahnstein/Rhein

Studium:

1989 - 1994 Studium der Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie an der Universität Kaiserslautern. Abschluss: I. Staatsexamen.

Juli 1992 - Okt. 1992 DAAD-Stipendiat, Forschungsinstitut für Lebensmitteltechnologie, Bursa, Türkei

Praktisches Jahr:

Apr. 1994 - Sep. 1994 Lebensmittelchemiepraktikant, Firma Eckes/Granini, Nieder-Olm.

Okt. 1994 - März 1995 Lebensmittelchemiepraktikant, Chemisches Untersuchungsamt, Speyer. Abschluss: II. Staatsexamen, staatlich geprüfter Lebensmittelchemiker.

Berufspraxis:

Apr. 1995 - Sept. 1995 Lebensmittelchemiker, Chemisches Laboratorium Eckert GmbH, Osthofen
Erteilung der Unterschriftsberechtigung für Untersuchungsbefunde nach §23 WeinV vom 09.05.1995.

Jan. 1996 - Aug. 2000 Laborant, Rot-Kreuz Krankenhaus, Frankfurt

Promotion:

Okt. 1995 - März 1997 Promotion im Fach Pharmazie an der Universität Heidelberg, im Zentralinstitut für seelische Gesundheit, Abt. für Psychopharmakologie, Mannheim, bei Herrn Prof. Dr. Walter E. Müller

Apr. 1997 - Mai 2000 Fortsetzung der Promotion im Fach Pharmazie an der Universität Frankfurt am Main, am Pharmakologischen Institut für Naturwissenschaftler, bei Herrn Prof. Dr. Walter E. Müller. Thema: „Untersuchungen zum Effekt von Beta-Amyloid Protein auf neuronale Zellmembranen“; Abschluss: Magna cum laude.

Post-Doc:

Juni 2000 - Aug. 2000 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Pharmakologischen Institut für Naturwissenschaftler im Biozentrum der Universität Frankfurt/Main

Sep. 2000 - Dez. 2000 Stipendiat der Forschungsförderung des Bundesstaates São Paulo, Neurochemisches Labor, Psychiatrische Klinik, Medizinische Fakultät der Universität São Paulo, Brasilie

Feb. 2001 - März. 2001 Postdoctoral fellow, Geriatisches Forschungszentrum der medizinischen Fakultät der Universität Minnesota im VA Medical Center, Minneapolis, USA

März. 2001 - Sept. 2002 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Pharmakologischen Institut für Naturwissenschaftler der Universität Frankfurt/Main

Festanstellung:

Okt. 2002 Ernennung zum Akademischen Rat zur Anstellung am Pharmakologischen Institut für Naturwissenschaftler der Universität Frankfurt/Main

Feb. 2004 Ernennung zum Akademischen Rat auf Lebenszeit am Pharmakologischen Institut für Naturwissenschaftler der Universität Frankfurt/Main

Apr. 2007 Ernennung zum Akademischen Oberrat auf Lebenszeit am Pharmakologischen Institut für Naturwissenschaftler der Universität Frankfurt/Main

Preise:

- Preis der Arbeitsgemeinschaft für Neuropsychopharmakologie und Pharmakopsychiatrie (AGNP), 2000
- MADAUS®- Phyto-Innovation Award: „Rice Bran Supplements“, 2003
- AGNP Preis für Forschungs- und Kongressreisen, 2003

Mitgliedschaften:

- American Society for Neuroscience
- DGE (Deutsche Gesellschaft für Ernährung)
- DGPT (Deutsche Gesellschaft für klinische und experimentelle Pharmakologie und Toxikologie)
- ECNP (European College of Neuropsychopharmacology)

Zusätzliche Qualifikationen:

Weiterbildung

- | | |
|------------------|--|
| 2001 -2006 | Weiterbildung zum Fachpharmakologen. |
| Apr. 2006 | Zuerkennung der Berufsbezeichnung „Fachpharmakologe DGPT“ durch die Gesellschaft für klinische und experimentelle Pharmakologie und Toxikologie. |
| Apr. – Juli 2007 | Erwerb des Hochschuldidaktischen Basiszertifikats |

Kurse und Praktika

- | | |
|---------------|---|
| März 1996 | Grundkurs in Versuchstierkunde und tierexperimentelle Methoden, Institut für Versuchstierkunde, Universität Heidelberg. |
| März 2001 | Grundkurs zum Erwerb der Fachkunde im Strahlenschutz für Strahlenschutzbeauftragte, Fachhochschule Jülich. |
| März 2002 | Fortbildungsveranstaltung für Projektleiter und Beauftragte für die Biologische Sicherheit, Universität Heidelberg. |
| März 2003 | Kursus des Graduiertenkollegs Neuronale Plastizität: Einführung in die Makroskopie des menschlichen Gehirns. |
| Oktober 2003 | Versuchstierkunde I und Biostatistik, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Bereich Erfurt, Universität Jena. |
| Juni 2004 | Versuchstierkunde II, Universitätsklinikum Jena. |
| November 2004 | Verhaltenspharmakologische Methoden, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Magdeburg. |
| Februar 2006 | Pharmakologisches Industriepraktikum, Fa. Schwabe GmbH & Co KG, Karlsruhe. |
| Juni 2006 | Fortbildungsveranstaltung Aktualisierung und Erhaltung der Fachkunde nach §30 der Strahlenschutzverordnung, Univ.-Klinik Frankfurt. |

Pharmakologische Workshops und Symposien

- | | |
|-------------|---|
| 2001 – 2007 | Symposium der Arbeitsgemeinschaft für Neuropsychopharmakologie und Pharmakopsychiatrie (AGNP): 2001 (Nürnberg), 2003 (München), 2005 (München), 2007 (München). |
| März 2004 | Workshop “Schizophrenia - towards new drug targets“ des European College of Neuropsychopharmacology, Nizza, Frankreich. |

Administrative Tätigkeiten

- seit 2001 Webmaster und DV-Koordinator.
- seit 2001 Sicherheitsbeauftragter.
- seit 2002 Strahlenschutzbeauftragter.
- seit 2002 Verantwortliche Person für den Betäubungsmittelverkehr.
- seit 2004 Beauftragter für Biologische Sicherheit S1.
- seit 2004 Stellvertreter des Leiters von Versuchsvorhaben gemäß Tierschutzgesetz.
- seit 2004 Koordinator des Zentrums für Arzneimittelforschung, -Entwicklung und Sicherheit (www.zafes.de)
- seit 2005 Leitender Koordinator des Expertenclusters Alzheimer und Parkinson Forschung Frankfurt
(www.apff.de)
- seit 2007 Leiter von Versuchstiervorhaben gemäß Tierschutzgesetz

Organisation von Kongressen und Seminaren

- 2001 Consortium Meeting EU-Projekt "local food plants – nutraceuticals", Frankfurt.
- 2002 Biocenter Symposium on Drug Therapy: Cholesterol and Alzheimer's disease, Frankfurt.
- 2003 Local Mediterranean Diet: New Nutraceuticals for a healthier life? - Dualism of Research and Food Industry, an der Industrie und Handelskammer Frankfurt.
- 2004 BVA Seminar „Antioxidantien in der Beratungsapotheke“, Frankfurt.
- 2004 ADEXA Workshop zum Pilotprogramm „Schlafapnoe“ Frankfurt.
- 2005 ADEXA Seminar „evidenzbasierte Mikronährstoffberatung“, Frankfurt.

Mitarbeit in der universitären Selbstverwaltung

Mitglied der Berufungskommission zur Besetzung einer W2/W3-Professur am Pharmakologischen Institut für Naturwissenschaftler der Johann Wolfgang Goethe-Universität (2005/2006).

7.2. Literaturverzeichnis

7.2.1. Originalarbeiten

W.E. MÜLLER, H. HARTMANN, **G.P. ECKERT**, A. ECKERT, S. EISERT

Cholesterol affects neuronal calcium signalling.

Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Disease, 1997, 7: 210-216,

W.E. MÜLLER, **G.P. ECKERT**, K. SCHEUER, N.J. CAIRNS, A. MARAS, W.F. GATTAZ

Effects of β -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, 1998, 5: 10-15,

W.E. MÜLLER, **G.P. ECKERT**, A. ECKERT

Piracetam: Novelty in a Unique Mode of Action.

Pharmacopsychiatry, 1999, 32. (Suppl. I): 2-9.

G.P. ECKERT, N.J. CAIRNS, W.E. MÜLLER

Piracetam reverses hippocampal membrane alterations in Alzheimer's disease.

J. Neural. Transm., 1999, 106: 757-761.

G.P. Eckert, N.J. Cairns, A. Maras, W.F. Gattaz, W.E. Müller

Cholesterol Modulates the Membrane-Disordering Effects of Beta-Amyloid Peptides in the Hippocampus: Specific Changes in Alzheimer's Disease.

Dement. Geriatr. Cogn. Disord., 2000, 11: 181-186.

G.P. ECKERT, C. KIRSCH, W.E. MÜLLER

Differential effects of lovastatin treatment on brain cholesterol levels in normal and Apo E-deficient mice.

Neuro Report ,2001, 12: 883-887.

G.P. ECKERT, W.E. MÜLLER

Effects of Hyperforin on the Fluidity of Brain Membranes.

Pharmacopsychiatry, 2001, 34 (Suppl 1): S22-S25.

N. SERDAREVIC, **G.P. ECKERT**, W.E. MÜLLER

The Effects of Extracts from St. John's Wort and Kava Kava on Brain Neurotransmitter Levels in the Mouse.

Pharmacopsychiatry, 2001, 34 (Suppl 1): S134-S136.

G.P. ECKERT, W.G. WOOD, W.E. MÜLLER

Effects of aging and β -amyloid on the properties of brain synaptic and mitochondrial membranes.

J. Neural Transm., 2001, 108: 1051-1064.

C.KIRSCH, **G.P. ECKERT**, W.E. MÜLLER

Cholesterol attenuates the membrane perturbing properties of β -amyloid peptide.

Amyloid, 2002; 9: 149-159.

G.P. ECKERT, U. IGBAVBOA, W.E. MÜLLER, W.G. WOOD

Lipid rafts of purified mouse brain synaptosomes prepared with and without detergent reveal different lipid and protein domains.

Brain Res., 2003, 962: 144-150

C.KIRSCH, **G.P. ECKERT**, W.E. MÜLLER:

Statins affect cholesterol micro-domains in brain plasma membranes.

Biochem. Pharmacol., 2003, 65: 843-856.

G.P. ECKERT, C.KIRSCH, S. Leutz, W.G. Wood, W.E. MÜLLER

Cholesterol Modulates Amyloid Beta-peptide's Membrane Interaction

Pharmacopsychiatry, 2003, 36: S136-S143.

C.KIRSCH, **G.P. ECKERT**, A.R. Koudinov, W.E. MÜLLER

Brain Cholesterol, Statins and Alzheimer's Disease

Pharmacopsychiatry, 2003, 36: S107-S112.

J-H. KELLER, M. KARAS, W.E. MÜLLER D.A. VOLMER, **G.P. ECKERT**, M.A. TAWAB, H.H.

BLUME, T. DINGERMANN, M. SCHUBERT-ZSILAVEC

Determination of Hyperforin in Mouse Brain by Rapid High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

Anal. Chem., 2003, 75: 6084 – 6088.

G.P. ECKERT, J-H. KELLER, C. JOURDAN, M. KARAS, D.A. VOLMER, M. SCHUBERT-

ZSILAVEC AND W.E. MÜLLER

Hyperforin Modifies Neuronal Membrane Properties in vivo

Neurosci. Letters, 2004, 367: 139-143.

S. SCHAFFER, **G.P. ECKERT**, W.E. MÜLLER, S. GRANDE, C. GALLI, F. VISIOLI

Hypochlorous acid scavenging properties of local Mediterranean plant foods

Lipids, 2004, 39:1239-1247.

L.N. JOHNSON-ANUNA, **G.P. ECKERT**, J.H. KELLER, U. IGBAVBOA, C. FRANKE, T.

FECHNER, M. SCHUBERT-ZSILAVECZ, M. KARAS, W.E. MÜLLER, W.G. WOOD.

Chronic administration of statins alters multiple gene expression patterns in mouse cerebral cortex.

J. Pharmacol. Exp. Ther., 2005, 312: 786-793.

U. IGBAVBOA, **G.P. ECKERT**, T.M. MALO, A.E. STUDNISKI, L.N.A. JOHNSON, N.

YAMAMOTO, M. KOBAYASHI, S.C. FUJITA, T.R. APPEL, W.E. MÜLLER, W.G. WOOD, K.

YANAGISAWA

Murine synaptosomal lipid raft protein and lipid composition are altered by expression of human APOE3 and 4, and by increasing age

J. Neurol .Sci., 2005, 229-230: 225-32.

S. SCHAFFER, S. SCHMITT-SCHILLIG, W.E. MÜLLER, **G.P. ECKERT**

Antioxidant properties of Mediterranean food plant extracts: geographical differences.

J. Physiol. Pharmacol., 2005, 56 (Suppl 1):115-24.

S. SCHAFFER, S. SCHMITT- SCHILLIG, **G.P. ECKERT**, W.E. MÜLLER
Mediterrane Ernährung - Benefit und wissenschaftliche Grundlagen
Pharm. Ztg., 2005; 21:17-31.

K. REISING, J. MEINS, B. BASTIAN, **G.P. ECKERT**, W.E. MÜLLER, M. SCHUBERT-
ZSILAVECZ, M. ABDEL-TAWAB
Determination of Boswellic Acids in Brain and Plasma by High-Performance Liquid
Chromatography/Tandem Mass Spectrometry.
Anal. Chem., 2005, 77: 6640-6645.

G.P. ECKERT, T. WEGAT, S. SCHAFFER, S. THEOBALD, W.E. MÜLLER
Oxidativer Stress - Apothekenrelevante Messmethoden im Vergleich
Pharm. Ztg., 2006, 151: 2267-2279.

C. SCHULTZ, H.G. KONIG, D. DEL TURCO, C. POLITI, **G.P. ECKERT**, E. GHEBREMEDHIN,
J.H. PREHN, D. KOGEL, T. DELLER
Coincident enrichment of phosphorylated I κ B α , activated IKK, and
phosphorylated p65 in the axon initial segment of neurons.
Mol. Cell. Neurosci., 2006, 33: 68-80.

L. SLENO, R. DANESHFAR, **G.P. ECKERT**, W.E. MÜLLER, D.A. VOLMER
Detailed Mass Spectral Characterisation of Phloroglucinol Derivates Hyperforin and
Adhyperforin
Rapid. Comm. Mass Spec., 2006, 20: 2641-2648.

S. RAUNSER, HAASE W., C. FRANKE, **G.P. ECKERT**, W.E. MÜLLER, W. KÜHLBRANDT
Heterogously expressed GLT-1 associates with Lipid rafts in ~200 nm protein-lipid
islands.
Biophys. J., 2006, 20(18):2641-8.

C.C. WEBER, **G.P. ECKERT**, W.E. MÜLLER
Effects of antidepressants on the brain/plasma distribution of corticosterone.
Neuropsychopharmacology, 2006, 31: 2443-2448

C. FRANKE, M. NÖLDNER, R. ABDEL-KADER, L.N. JOHNSON-ANUNA, W. G. WOOD, W. E.
MÜLLER, **G.P. ECKERT**
Bcl-2 Upregulation and Neuroprotection in Guinea Pig Brain Following Chronic
Simvastatin Treatment
Neurobiol. Dis., 2007, 25(2):438-45

L.N. JOHNSON-ANUNA, **G.P. ECKERT**, C. FRANKE, U. IGBAVBOA, W.E. MÜLLER, W.G.
WOOD
Simvastatin Protects Neurons from Cytotoxicity by Upregulating Bcl-2 mRNA and
Protein
J. Neurochem., 2007, 101(1):77-86

S. MEYER DOS SANTOS, C.C. WEBER, C. FRANKE, W.E. MÜLLER, **G.P. ECKERT**
Cholesterol: coupling between membrane microenvironment and ABC transporter
activity
Biochem. Biophys. Res. Commun., 2007, 354(1):216-21

- S. SCHAFFER, M. PODSTAWA, F. VISIOLI, P. BOGAN, W.E. MÜLLER, **G.P. ECKERT**
Hydroxytyrosol-rich Olive Mill Waste Extract Protects Brain Cells *in vitro* and *ex vivo*
J. Agric. Food Chem., 2007, 55(13):5043-9
- G.P. ECKERT**, L. VARDANIAN, G.W. REBECK, M.P. BURNS
Regulation of central nervous system cholesterol homeostasis by the Liver X Receptor agonist TO-901317
Neurosci. Lett., 2007, 423:47-52
- P. HUEBBE, S. SCHAFFER, L. JOFRE-MONSENY, C. BOESCH-SAADATMANI, A.M. MINI-HANE, W.E. MÜLLER, **G.P. ECKERT**, G. RIMBACH
ApoE genotype and vitamin E modulate APP metabolism and cell cycle regulation
Molecular Nutrition & Food Research, 2007, 51:1510-7
- P. KRÜGER, R. DANESHFAR, **G.P. ECKERT**, J. KLEIN, D.A. VOLMER, U. BAHR, W.E. MÜLLER, M. KARAS, M. SCHUBERT-ZSILAVECZ AND M. ABDEL-TAWAB
Metabolism of boswellic acids *in vitro* and *in vivo*
Drug Metabolism and Deposition, 2008, 36: 1135-42.
- G.P. HOOFF, D. VOLMER, W.G. WOOD, W.E. MÜLLER, **G.P. ECKERT**
Isoprenoid quantitation in human brain tissue. A validated HPLC-fluorescence detection method for endogenous farnesyl- (FPP) and geranylgeranylpyrophosphate (GGPP)
Analytical and Bioanalytical chemistry 2008, 392: 673-80.
- I. PETERS, U. IGBAVBOA, U. HARTIG, T. SCHÜTT, S. HAIDARI, S. BÖTTNER E. COPANAKI, T. DELLER, D. KÖGEL, W.G. WOOD, W.E. MÜLLER, **G.P. ECKERT***
The interaction of beta amyloid peptide with cellular membranes stimulates its own production.
BBA-Biomembranes 2009, DOI 10.1016/j.bbamem.2009.01.012.

Zur Publikation eingereichte Arbeiten

- G.P. ECKERT***, G.P. HOOFF, U. IGBAVBOA, D. M. STRANDJORD, D.A. VOLMER, W.E. MÜLLER, W.G. WOOD
Regulation of Brain Isoprenoids Farnesyl and Geranylgeranyl Pyrophosphate is altered in Alzheimer's Disease
Neurobiol. Disease, 2009.
- G.P. ECKERT***, W.E. MÜLLER
Presenilin 1 modifies neuronal membranes *in vivo*
BBRC, 2009.

7.2.2. Übersichtsarbeiten

- W. E. MÜLLER, C. KIRSCH, **G.P. ECKERT**
Membrane-disordering effects of β -amyloid peptides.
Biochemical Society Transactions 2001, 29: 617-623.
- G.P. ECKERT**, C. KIRSCH, W.E. MÜLLER
Brain – membrane cholesterol in Alzheimer's Disease
J. Nutr. Health Aging, 2003, 1:18-23.

W.G. Wood, **G. P. ECKERT**, U. Igbavboa, W. E. MÜLLER:
Amyloid beta-peptide interactions with membranes and cholesterol: causes or casualties of Alzheimer' disease.

BBA - Biomembranes, 2003, 1610:281-90.

C.KIRSCH, **G.P. ECKERT**, W.E. MÜLLER:
Brain Cholesterol. Statins and Alzheimer's Disease
Pharmacopsychiatry, 2003, 36: S113-S119.

S. SCHAFFER, W.E. MÜLLER, **G.P. ECKERT**
Tocotrienols: Constitutional effects in aging and disease
J. Nutr., 2005, 135: 151-154.

S. SCHMITT-SCHILLIG, S. SCHAFFER, C.C. WEBER, **G.P. ECKERT**, W.E. MÜLLER.
Flavonoids and the aging brain.
J. Physiol. Pharmacol., 2005, 56 (Suppl 1):23-36.

THE LOCAL FOOD-NUTRACEUTICALS CONSORTIUM
Understanding local Mediterranean diets: A multidisciplinary pharmacological and ethnobotanical approach
Pharmacol. Res., 2005, 52:53-366.

W.G. WOOD, U. IGBAVBOA, **G.P. ECKERT**, L.N. JOHNSON-ANUNA, C. FRANKE, W.E. MÜLLER
Is Hypercholesterolemia a Risk Factor for Alzheimer's Disease?
Mol. Neurobiol., 2005, 31(1-3):185-92.

G.P. ECKERT, W.G. WOOD, W.E. MÜLLER
Statins: Drugs for Alzheimer's Disease?
J.Neural. Transm., 2005, 112: 1057 – 1071.

S. SCHAFFER, **G.P. ECKERT**, S. SCHMITT-SCHILLIG, W.E. MÜLLER
Plant Foods and Brain aging: A Critical Appraisal
Forum. Nutr., 2006, 59: 86-115.

G.P. ECKERT, W.E. MÜLLER, W.G. WOOD
Cholesterol lowering drugs and Alzheimer's disease
Future Lipidology, 2007, 2(4): 423-432.

G.P. ECKERT
Spezial – Sekundäre Pflanzenstoffe:
Mediterrane Ernährung zur Prophylaxe der Alzheimer Demenz
Ernährungsumschau, 2008, 55(8): 480-485.

Zur Publikation eingereichte Arbeiten

W.G. WOOD, **G.P. ECKERT**, U. IGBAVBOA, W.E. MÜLLER
Statins and Neuroprotection: A Prescription to move the field
ANYAS, 2009.

7.2.3. Buchkapitel

W.E. MÜLLER, A. ECKERT, G.P. ECKERT

Therapeutic Approaches Related to the Membrane Hypothesis of Aging and Dementia.
In: „Mental Disorders in the Elderly: New Therapeutic Approaches“. N. Brunello, S.Z. Langer, G. Racagni (eds.): Int Acad Biomed Drug Res., 13, 91-101. Karger, Basel, 1998.

W.E. MÜLLER, C. KIRSCH, G.P. ECKERT

Statin Effects on Brain Plasma Membrane Micro-Domains – May Explain Their
Therapeutic Effects in Dementia.

In: “TF”. Monduzzi, Editore E.p.A. (eds.): 113-116. Medimedimond, 2003.

G.P. ECKERT, C. KIRSCH, W.E. MÜLLER

Brain-Membrane Cholesterol In Alzheimer’s Disease

In: “Nutrition, Cognitive Decline And Aging”. B. Vellas, LJ Fitten (eds.): Research and
Practice in Alzheimer’s Disease Collection. Serdi Publisher (Paris), Springer-Verlag
(Heidelberg) 2005.

G.P. ECKERT, W.G. WOOD, W.E. MÜLLER

Membrane disordering effects of β -amyloid peptides

In: “Alzheimer’s Disease – Cellular and Molecular Aspects of Amyloid β ”. Robin Harris,
Falk Fahrenholz (eds.): Subcellular Biochemistry, Volume 38, Chapter 16, pages 319-
337, Springer –Verlag (Heidelberg), 2005. ISBN 0-387-23225-7.

W.G. WOOD, U. IGBAVBOA, G.P. ECKERT, W.E. MÜLLER

Cholesterol-A Janus faced molecule in the central nervous system

In: “Neural Membranes and Transport” Lajtha, Abel, Reith, Maarten E.A. (Eds.):
Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology, 3rd ed., 2007, XIV, 513 p.,
Plenum (New York) 2007.

ISBN: 978-0-387-30347-5.

7.2.3.1. Lehrbuchkapitel

G.P. ECKERT, W.E. MÜLLER

Nervous System (Peripheral, Central)

In: “Toxicology and Risk Assessment”, H. Greim & R. Snyder (eds.), John Wiley & Sons
Ltd (West Sussex), 2008, ISBN 978-0-470-86893-5.

7.2.4. Popularwissenschaftliche Veröffentlichungen

A. ECKERT, G.P. ECKERT, A. KASTL, S. LEUTNER, S. LEUTZ, K. SCHINDOWSKI,

B. STEINER, M. SYCH, W.E. MÜLLER

Vom unaufhaltsamen Niedergang der Hirnzellen. Wie die Alzheimer Demenz entsteht.
Forschung Frankfurt, 1999, 17: 60-67.

G. P. ECKERT, C. KIRSCH, W. E. MÜLLER

Cholesterol: Schlecht für das Herz, auch schlecht für den Geist? - Neues von einem
altbekanntem Molekül.

Forschung Frankfurt, 2002, 1-2: 62-64.

G.P. ECKERT, S. SCHAFFER, S. SCHMITT-SCHILLIG, W.E. MÜLLER. Eckert, Geistig fit durch mediterrane Kost? – Wie Menschen gesünder alt werden können
Forschung Frankfurt, 2003, 1: 10-16.

W.E. MÜLLER, G.P. ECKERT, C. FRANKE
Schützen Statine vor Schlaganfall und Alzheimer?
Forschung Frankfurt, 2005, 3: 18-21.

G.P. ECKERT, K. LEUNER, W.E. MÜLLER
Mitochondriale Dysfunktion bei Alzheimer Demenz
Das Zusammenspiel von Hirnalterung und genetischen Risikofaktoren
Forschung Frankfurt, 2007, 2: 86- 89.

7.2.5. Zitationsanalyse

- Zitierte Arbeiten: 55
- Summe der Zitate: 621
- Durchschnittliche Anzahl an Zitaten pro Arbeit: 11,3
- Hirsch-Index (h): 13
(Stand 08.01.2009)

7.3. Vorträge und Posterpräsentationen

7.3.1. Publierte Abstracts

G.P. ECKERT, A. MARAS, W.F. GATTAZ, N. J. CAIRNS, W.E. MÜLLER
Cholesterol modulates beta-amyloid effects on human brain membranes - Specific changes in Alzheimer's disease. Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology 355 (4): 342-342 Suppl. S, 1997.

G.P. ECKERT, C. KIRSCH, W.E. MÜLLER
Differential effects of lovastatin treatment on brain cholesterol levels in normal and ApoE deficient mice. Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology 363 (4): R90-R90 347 Suppl. S, APR 2001.

C. KIRSCH, G.P. ECKERT, W.E. MÜLLER
Statins induce alterations in SPM transbilayer cholesterol distribution - New pharmacological insights for the prevention of Alzheimer's disease? Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology 367: R7-R7 13 Suppl. 1, MAR 2003.

G.P. ECKERT
Geistig fit durch mediterrane Kost – Neuroprotektion durch neue Nutraceuticals, Thesenpapier zum I. Interdisziplinären Kongress Junge Wissenschaft und Praxis „Gesundheit fördern, Krankheit heilen: Neue Wege im Zusammenwirken von Naturwissenschaft – Medizin – Technik“ (Hanns Martin Schleyer-Stiftung), Jun 2003, München.

G.P. ECKERT, E. SCHAEFFER, A. SCHMITT, A. MARAS, W.E. MÜLLER, W.F. GATTAZ
Specific alterations of brain membranes in schizophrenia. European Neuropsychopharmacology 14: S71-S71 Suppl. 1, MAR 2004.

G.P. ECKERT, J.H. KELLER, C.C. WEBER, C. FRANKE, I. PETERS, M. KARAS, M. SCHUBERT-ZSILAVECZ, W.E. MÜLLER

Brain availability and effects on lipid homeostasis of statins. *Neurobiology of Aging* 25: S579-S579 Suppl. 2, JUL 2004.

L.N. JOHNSON-ANUNA, **G.P. ECKERT**, U. IGBAVBOA, J.H. KELLER, W.E. MÜLLER, W.G. WOOD Pleiotropic effects of statins on gene expression in cerebral cortex of mice *Neurobiology of Aging* 25: S82-S83 Suppl. 2, JUL 2004.

C. FRANKE, **G.P. ECKERT**, L.N. JOHNSON-ANUNA, J.H. KELLER, W.G. WOOD, M. KARAS, M. SCHUBERT-ZSILAVECZ, W.E. MÜLLER

Brain availability and central effects on gene expression patterns. *Naunyn-Schmiedebergs Archives Of Pharmacology* 371: R74-R75 Suppl. 1, FEB 2005.

C.C. WEBER, S. KRESSMANN, **G.P. ECKERT**, W.E. MÜLLER

Modulation of P-Glycoprotein-function and -expression by St John's wort extract and its major constituents. *Naunyn-Schmiedebergs Archives Of Pharmacology* 371: R74-R74 314 Suppl. 1, FEB 2005.

M. HEINRICH, M. LEONTI, S. NEBEL, W. PESCHEL, A. PIERONI, F. SMITH, D. RIVERA, C. OBON, C. INOCENCIO, A. VERDE, J. FAJARDO, R. LLORACH, W.E. MÜLLER, **G.P. ECKERT**, S. SCHAFFER, S. SCHMITT-SCHILLIG, A. GUZDEK, M. KAPISZEWSKA

Understanding local Mediterranean diets: A multidisciplinary pharmacological and ethnobotanical approach *Pharmacological Research* 52 (4): 353-366 OCT 2005.

G.P. ECKERT, C. FRANKE, C. JOURDAN, L.N. JOHNSON-ANUNA, W.G. WOOD, W. E. MÜLLER

Simvastatin elevates anti-apoptotic Bcl-2 levels in guinea pig brain. *Pharmacopsychiatry* 38 (5): 239-239 SEP 2005.

W.G. WOOD, L.N. JOHNSON-ANUNA, **G.P. ECKERT**, C. FRANKE, U. IGBAVBOA, W.E. MÜLLER

Simvastatin stimulates neuronal Bcl-2 mRNA and protein levels, providing neuroprotection which is diminished by Bcl-2 suppression. *Journal of Neurochemistry* 96: 105-105 Suppl. 1, MAR 2006.

C. FRANKE, C. JOURDAN, L.N. JOHNSON-ANUNA, M. NOLDNER, K. SCHOTZ, W.G. WOOD, W.E. MÜLLER, **G.P. ECKERT**

Simvastatin elevates anti-apoptotic Bcl-2 levels in guinea pig brain. *Naunyn-Schmiedebergs Archives Of Pharmacology* 372: 81-81 296 Suppl. 1, MAR 2006.

I. PETERS, A. POZLER, C. JOURDAN, W.E. MÜLLER, **G.P. ECKERT**

Cholesterol reduction by statins accounts for lower Alzheimer's amyloid-beta peptide levels. *Naunyn-Schmiedebergs Archives Of Pharmacology* 372: 81-81 295 Suppl. 1, MAR 2006.

7.3.2. Nicht publizierte Abstracts

G.P. ECKERT, K.SCHEUER, A. MARAS, W.F. GATTAZ, H. FÖRSTEL, N. CAIRNS AND W.E. MÜLLER

Effekte von β -Amyloid Peptiden auf die Fluidität neuronaler Membranen bei Morbus Alzheimer, Poster presentation at the Drei-Länder-Symposium für Biologische Psychiatrie, Okt. 1996, Würzburg.

G.P. ECKERT AND W.E. MÜLLER

Effects of Amyloid Beta-Peptides on Membrane Fluidity in Alzheimer's Disease. Poster presentation at the annual meeting of the Society for Neuroscience, Nov. 1996, Washington, USA.

G.P. ECKERT, N.J. CAIRNS AND W.E. MÜLLER

Cholesterol Modulates Beta-Amyloid Effects on Human Brain Membranes – Specific Changes in Alzheimer's Disease. Poster presentation at the international Conference Alzheimer's Disease – from Basic Research to Clinical Applications, Juni 1997, Leipzig.

G.P. ECKERT, N.J. CAIRNS AND W.E. MÜLLER

Cholesterol Modulates Beta-Amyloid Effects on Human Brain Membranes – Specific Changes in Alzheimer's Disease. Poster presentation at the AGNP-Symposium, Okt 1997, Nürnberg.

G.P. ECKERT, N.J. CAIRNS, W.E. MÜLLER

Cholesterol Modulates Beta-Amyloid Effects on Human Brain Membranes – Specific Changes in Alzheimer's Disease. Poster presentation at the annual meeting of the Society for Neuroscience, Nov. 1997, New Orleans, USA.

G.P. ECKERT, W.E. MÜLLER

Studies on the Membrane Disordering Effects of Alzheimer's Disease Amyloid Beta-Peptides. Age-Related Differences in Subcellular Fractions of the Mouse Brain. Poster presentation at the Congress of the German Society for Biological Psychiatry, Okt. 1998, Jena.

G.P. ECKERT, W.E. MÜLLER

Studies on the Membrane Disordering Effects of Alzheimer's Disease Amyloid Beta-Peptides. Age-Related Differences in Subcellular Fractions of the Mouse Brain. Poster presentation at the annual meeting of the Society for Neuroscience, Nov. 1998, Los Angeles, USA.

G.P. ECKERT, W.E. MÜLLER

Effects of Hyperforin on the Fluidity of Brain Membranes, Poster presentation at the Biocenter Symposium on Drug Therapy, Pharmacology of St. John's Wort and its constituents, Feb. 2000, Frankfurt.

N. SERDAREVIC, **G.P. ECKERT, W.E. MÜLLER**

Effects of Acute Administration of Hypericum Perforatum and Kava-Kava Extracts on neurotransmitter levels in mouse brain, Poster presentation at the Biocenter Symposium on Drug Therapy, Pharmacology of St. John's Wort and its constituents, Feb. 2000, Frankfurt.

G.P. ECKERT, C. KIRSCH, W.E. MÜLLER

Cholesterol modulates the effects of Alzheimer's Disease β -amyloid peptide on neuronal membranes. Poster presentation at the IBL congress, Sept. 2000, Halle.

G.P. ECKERT, C. KIRSCH, W. E. MÜLLER

Unterschiedliche Effekte der Lovastatin-Behandlung auf den Cholesterolgehalt im Gehirn von normalen und ApoE -defizienten Mäusen. Poster presentation at the DGPT congress, März 2001, Mainz.

W.G. WOOD, G.P. ECKERT, U. IGBAVBOA, W. E. MÜLLER

Lipid rafts isolated from purified mouse brain synaptosomes-Detergent vs. Detergent-Free Method; Poster presentation at the annual meeting of the Society for Neuroscience, Nov. 2001, San Diego, USA.

C.KIRSCH, G.P. ECKERT, W.E. MÜLLER

Cholesterol Diminishes $A\beta$'s Membrane Disturbing Properties in Brain Synaptic Plasma Membranes of Mice. Poster presentation at the Biocenter Symposium on Drug Therapy: Alzheimer's Disease and Cholesterol, Juli 2002, Frankfurt.

C.KIRSCH, G.P. ECKERT, W.E. MÜLLER

Statins Induce Alterations in SPM Transbilayer Cholesterol Distribution - New Pharmacological Insights for the Prevention of Alzheimer's Disease? Poster presentation at the Biocenter Symposium on Drug Therapy: Alzheimer's Disease and Cholesterol, Juli 2002, Frankfurt.

S. LEUTZ, C.KIRSCH, , W.E. MÜLLER, G.P. ECKERT

MTT- Reduction a Valid Tool to Detect $A\beta$ Mediated Cytotoxicity? – Impacts of Cholesterol. Poster presentation at the Biocenter Symposium on Drug Therapy: Alzheimer's Disease and Cholesterol, Juli 2002, Frankfurt.

G.P. ECKERT, C. KIRSCH, S. LEUTZ, W.E. MÜLLER

Impact of plasma membrane cholesterol on $A\beta$ cytotoxicity, poster presentation at the 6th International Conference Alzheimer's Disease / Parkinson Disease, May 2003, Sevilla, Spanien.

S. NEBEL, G.P. ECKERT, A. PIERONI, S. SCHAFFER, S. SCHMITT-SCHILLIG, W.E. MÜLLER, M. HEINRICH

Antioxidant activity of local food plants consumed in Southern Italy, posterpresentation at the 51. Jahreskongress der Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung, August 31-September 04, 2003, Kiel.

G.P. ECKERT, C. KIRSCH, A. KOUDINOV, W.E. MÜLLER

Transbilayer cholesterol distribution – the missing link in Alzheimer's Disease?, poster presentation at the annual meeting of the Society for Neuroscience, Nov. 2003, New Orleans, USA.

U.F. IGBAVBOA, N. YAMAMOTO, T. MALO, G.P. ECKERT, M. KOBAYASHI, W. MÜLLER, A. STUDNISKY, L.N.A. JOHNSON, W.G. WOOD, K. YANAGISAWA

Synaptosomal Lipid rafts of mice expressing human ApoE 3 & 4 differ in protein composition, poster presentation at the annual meeting of the Society for Neuroscience, Nov. 2003, New Orleans, USA.

G.P. ECKERT, M. HEINRICH, A. PIERONI, S. NEBEL, S. SCHMITT-SCHILLIG, S. SCHAFFER, W.E. MÜLLER, C. GALLI, F. VISIOLI

Radical Scavenging and Vasomodulating Properties of Mediterranean Local Food Plant Extracts, poster presentation at the 1st International Conference on Polyphenols and Health, Nov. 2003, Vichy, France.

G.P. ECKERT, E. SCHAEFFER, A. SCHMITT, A. MARAS, W.E. MÜLLER, W.F. GATTAZ
Specific alterations of brain membranes in Schizophrenia, poster presentation at the Workshop for Neuropharmacology of the European College of Neuropsychopharmacology, März 2004, Nice, France.

S. SCHAFFER, F. VISIOLI, C. GALLI, S. SCHMITT-SCHILLIG, W.E. MÜLLER, **G.P. ECKERT**
Local Mediterranean food plant extracts exhibit cardio- and neuroprotective activity in vitro, poster presentation at the 41st Scientific Congress of the German Nutrition Society, März 11-12, 2004, Freising-Weihenstephan.

G.P. ECKERT, J.H. KELLER, C. C. WEBER, C. FRANKE, I. PETERS, M. KARAS, M. SCHUBERT-ZSILAVECZ, W.E. MÜLLER

Brain availability and effects on lipid homeostasis of statins, poster presentation at the 9th International conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders, Juli 2004, Philadelphia, USA.

G.P. ECKERT, J.H. KELLER, C. FRANKE, I. PETERS, M. KARAS, M. SCHUBERT-ZSILAVECZ, W.E. MÜLLER

Brain availability of statins, poster presentation at the ZAFES kick-off meeting, Okt. 2004, Frankfurt.

C. FRANKE, **G.P. ECKERT**, M. MEYER, W.E. MÜLLER

Lovastatin changes protein patterns in the brain, poster presentation at the ZAFES kick-off meeting, Okt. 2004, Frankfurt.

G.P. ECKERT, J.H. KELLER, C. C. WEBER, C. FRANKE, I. PETERS, M. KARAS, M. SCHUBERT-ZSILAVECZ, W.E. MÜLLER

Brain availability and New Targets of Statins in the Brain, poster presentation at annual meeting of the Society for Neuroscience, Nov. 2004, San Diego, USA.

S. SCHAFFER, **G.P. ECKERT**, R. LLORACH, D. RIVERA, M. LEONTI, M. HEINRICH, Z. KYPRIOTAKIS, W.E. MÜLLER

Local Mediterranean plant food extracts and selected polyphenols affect hypochlorous acid-induced cytotoxicity in PC12 cells, poster presentation at the 42nd Scientific Congress of the German Nutrition Society, März 17-18, 2005, Kiel.

G.P. ECKERT, C. JOURDAN, I. PETERS, L. PRADIER, W.E. MÜLLER

Presenilin over expression induces lipid raft formation in vivo, poster presentation at the annual meeting of the Society for Neuroscience, Nov. 2005, Washington, USA.

C. FRANKE, C. JOURDAN, L.N. JOHNSON-ANUNA, M. NÖLDNER, K. SCHÖTZ, W.G. WOOD, W.E. MÜLLER, **G.P. ECKERT**

Simvastatin elevates anti-apoptotic Bcl-2 levels in guinea pig brain, poster presentation at the annual meeting of the Society for Neuroscience, Nov. 2005, Washington, USA.

I. PETERS, A. POZLER, C. JOURDAN, W.E. MÜLLER, **G.P. ECKERT**

Cholesterol Reduction by Statins accounts for lower Alzheimer's Amyloid-Beta peptide - levels, poster, poster presentation at the annual DGPT-meeting, März 2006, Mainz.

S. SCHAFFER, W.E. MÜLLER, **G.P. ECKERT**.

Studies of the cytoprotective/-toxic effects of Thymus piperella and its polyphenolic constituents on neuronal-like cell culture models, poster presentation at the 43rd Scientific Congress of the German Nutrition Society, März 8-9, 2006, Stuttgart.

G.P. ECKERT, L. VARDANIAN, G.W. REEBECK, M.P. BURNS

Regulation of central nervous system cholesterol homeostasis by an Liver X Receptor agonist TO-901317, poster presentation at the annual meeting of the Society for Neuroscience, Okt. 2006, Atlanta, USA.

C. FRANKE, R.A. ABDEL-KADER, M. NÖLDNER, L.N. JOHNSON-ANUNA, W.G. WOOD, W.E. MÜLLER, **G.P. ECKERT**

Simvastatin exerts neuroprotective effects in guinea pig brain, poster presentation at the annual meeting of the Society for Neuroscience, Okt. 2006, Atlanta, USA.

I. PETERS, C. JOURDAN, W.E., MÜLLER, **G.P. ECKERT**

Membrane physico-chemical properties determine A β -production in human neuroblastoma cells, poster presentation at the annual meeting of the Society for Neuroscience, Okt. 2006, Atlanta, USA.

S. SCHAFFER, M. PODSTAWA, F. VISIOLI, W.E. MÜLLER, **G.P. ECKERT**

Evidence of Neuroprotection by a Hydroxytyrosol-rich olive mill waste water extract *in vitro* and *in vivo*, poster presentation at the 3rd international congress on polyphenols, Okt. 2006, Malta.

T.A. BUTTERWICK, L.N. JOHNSON-ANUNA, **G.P. ECKERT**, U. IGBAVBOA, W.E. MÜLLER; W.G. WOOD

Simvastatin upregulation of endothelin-1 increases Bcl-2 mRNA/protein levels and neuroprotection in neurons, oral presentation at the annual meeting of the Society for Neuroscience, Nov. 2007, San Diego, USA

D.A. VOLMER, G. HOOFF, **G.P. ECKERT**, W.G. WOOD, W.E. MÜLLER

Quantification and perturbation of the isoprenoids FPP and GGPP in mouse brain and primary neurons, oral presentation at the annual meeting of the Society for Neuroscience, Nov. 2007, San Diego, USA

M.P. BURNS, G.W. REEBECK, **G.P. ECKERT**

The Liver X Receptor agonist TO-901317 increases HMG-CoA reductase activity *in vivo* and *in vitro*, poster presentation at the annual meeting of the Society for Neuroscience, Nov. 2007, San Diego, USA

S. SCHAFFER, M. PODSTAWA, F. VISIOLI, P. BOGAN, W.E. MÜLLER, **G.P.ECKERT**
Hydroxytyrosol-rich Olive Mill Waste Extract Protects Brain Cells in vitro and ex vivo,
poster presentation at the Oxygen Club of California 2008 World Congress, Oxidants and
Antioxidants in Biology, March 2008, Santa Barbara, USA

C. FRANKE, C. JOURDAN, L.N. JOHNSON-ANUNA, W.G. WOOD, W.E MÜLLER, **G.P.
ECKERT**
Bcl-2 up-regulation and neuroprotection in guinea pig brain following chronic
simvastatin treatment, poster presentation at the 5th International Symposium on
Neuroprotection and Neurorepair, Cerebral Ischemia and Stroke, May 2008, Magdeburg,
Germany

D. KÖGEL, E. COPANAKI, U. HARTIG, S. BÖTTNER, I. PETERS, W.E. MÜLLER, **G. P.
ECKERT**
Modulation of membrane fluidity by omega 3 fatty acids: Enhanced generation of
sAPPalpha is required for the neuroprotective effects of DHA, poster presentation at the
annual meeting of the Society for Neuroscience, Nov. 2008, Washington, USA

G. P. ECKERT, C. FRANKE, M. NÖLDNER, W.E. MÜLLER;
Plant derived omega-3 fatty acid modulate fatty acid composition in the brain and
provide neuroprotective properties, poster presentation at the annual meeting of the
Society for Neuroscience, Nov. 2008, Washington, USA

G. P. HOOFF, D. A. VOLMER², G. W. WOOD³, W. E. MUELLER⁴, G. P. ECKERT
Isoprenoid quantitation in human brain: a validated HPLC-fluorescence method for
farnesyl- (FPP) and geranylgeranylpyrophosphate (GGPP) , poster presentation at the
annual meeting of the Society for Neuroscience, Nov. 2008, Washington, USA

7.3.3. Vorträge

7.3.3.1. Vorträge auf Einladung

G.P. ECKERT, W.E. MÜLLER, A. ECKERT, H. HARTMANN
Polymorphism of Apolipoprotein E and Alzheimer's Disease.
Oral presentation at the 6th. Meeting of the International Neurotoxicology Association,
Juni 1997, Szeged, Hungary.

G.P. ECKERT
Thinking membranes – Implications for brain functions, Oral presentation at the
Congresso Brasileiro De Psiquiatria, Okt. 2000, Rio de Janeiro, Brazil.

G. P. ECKERT, C. KIRSCH, W. E. MÜLLER
Importance of brain-membrane cholesterol in Alzheimer's Disease, Oral presentation at
the WCBP congress, Juli 2001, Berlin.

G.P. ECKERT, C. KIRSCH, W.E. MÜLLER
Effects of Lovastatin treatment on Brain Cholesterol Levels in Normal and Apo E
deficient Mice, Oral presentation at the annual meeting of the Society for Neuroscience,
Nov. 2001, San Diego, USA.

G.P. ECKERT, C. KIRSCH, W. E. MÜLLER

Membrane Cholesterol and A β . Oral presentation at the Biocenter Symposium on Drug Therapy: Alzheimer's Disease and Cholesterol, Juli 2002, Frankfurt.

G.P. ECKERT

Effects of aggregated β -amyloid peptides on the fluidity of neuronal membranes, implications of cholesterol. Oral presentation at the IMB-Symposium "Protein Folding – Principles and Pathological Implications", September 2002, Jena.

G.P. ECKERT, C. KIRSCH, W. E. MÜLLER

Effects of Statins on the Brain Cholesterol Homeostasis, oral presentation at the annual meeting of the Society for Neuroscience, Nov. 2002, Orlando, USA.

G.P. ECKERT

Antioxydantien - Messverfahren Oxi-Status. Oral presentation at the BVA seminar „Antioxydantien in der Beratungsapotheke - Ein Seminar für die Future-Apotheke" at the Expopharm, Mai 2003, Köln.

G.P. ECKERT, J.H. KELLER, C.C. WEBER, C. FRANKE, I. PETERS, M. KARAS, M. SCHUBERT-ZSILAVECZ, W.E. MÜLLER

Brain availability and effects on lipid homeostasis of statin. Oral presentation at the Center for Cellular and Molecular Biology (CCMB), Januar 2004, Hyderabad, India.

G.P. ECKERT, T. WEGAT, W.E. MÜLLER

Antioxydantien in der Beratungsapotheke - Messmethodik und Dateninterpretation. Oral presentation at the OXI-Antioxydantien Programm des Netzwerkes Patientenkompetenz, April 2004, Frankfurt & September 2004, München.

G.P. ECKERT, T. WEGAT, S. THEOBALD, W.E. MÜLLER

FoxiStaB - Untersuchungen zur Hydroperoxid-Bestimmung in Kapillarblut, Oral presentation in the frame of the OXI-Antioxydantien Programm des Netzwerkes Patientenkompetenz, April 2005, Frankfurt.

G.P. Eckert, C. Franke, M. Nöldner, W.E. Müller

Neuroprotective Effects of Omega-3-Polyunsaturated Fatty Acids. Oral presentation at the graduate school "Natürliche Antioxydantien - ihr Wirkungsspektrum in Pflanzen, Lebensmittel, Tier und Mensch " at the Christian-Albrechts-Universität, May 2006, Kiel.

G.P. Eckert, C. Franke, I. Peters, L. Johnson-Anuna, W.G. Wood, W.E. Müller

Statin – a cure for the brain? Oral presentation at the MPI for Exp. Medicine, Göttingen, November 2006.

G.P. Eckert, S. Schaffer, W.E. Müller

Exploring Local Mediterranean Food Plants as Potential Nutraceuticals: Experiences from a Joint Pharmacological & Ethnobotanical EU-Project. Oral presentation at the International Symposium on Herbal Remedies in the 21st Century – A Biotechnological Approach, Cairo, April, 2007.

G.P. ECKERT, I. PETERS, W.E. MÜLLER

Vicious cycle in Alzheimer's disease: Amyloid beta aggravates its own production, Oral presentation at the annual meeting of the Society for Neuroscience, Nov. 2007, San Diego, USA.

G.P. Eckert

Cholesterinsenker und mediterrane Ernährung als Demenzprophylaxe. Oral presentation at the 3. Symposium of the Ingenium Foundation "Mit Sport, Fisch, Rotwein und geistiger Aktivität gegen Alzheimer", Ingolstadt, April 2008.

G.P. Eckert

Mediterrane Ernährung zur Prophylaxe der Alzheimer Demenz? Oral presentation at the Christian-Albrechts-Universität, Kiel, April 2008.

G.P. Eckert

Cholesterinsenker zur Prophylaxe der Alzheimer Demenz? Oral presentation in the frame of the summer symposium of the Neurowissenschaftliche Gesellschaft Frankfurt, Juni 2008, Frankfurt

7.3.3.2. nicht publizierte Vorträge

G.P. ECKERT AND W.E. MÜLLER

Piracetam Reverses Neuronal Membrane Alterations in Aging and Alzheimer's Disease. Oral presentation at the AGNP symposium, Okt. 1999, Nürnberg.

G.P. ECKERT, W.E. MÜLLER

Determine the anti-oxidant capacity of food-plants *in vitro* and *ex vivo*. Oral presentation at the consortium meeting of the EU project "local food - nutraceuticals", Nov. 2001, Murcia, Spain.

G.P. ECKERT, S. SCHAFFER, W.E. MÜLLER

Effects of Mediterranean food plants on lipid peroxidation parameters *in vitro*. Oral presentation at the consortium meeting of the EU project "local food - nutraceuticals", April 2002, Crete, Greek.

G.P. ECKERT, C. KIRSCH, W.E. MÜLLER

Statins affect cholesterol micro-domains in brain plasma membranes. Oral presentation at the international conference on "Cell and Molecular Biology of Alzheimer's Disease", September 2002, Hamburg.

G.P. ECKERT, S. SCHMITT-SCHILLIG, W.E. MÜLLER

Effects of Mediterranean food plant intake on brain membranes of mice. Oral presentation at the consortium meeting of the EU project "local food - nutraceuticals", Nov. 2002, Castellmezzano, Italy.

G.P. ECKERT, S. SCHAFFER, S. SCHMITT-SCHILLIG, W.E. MÜLLER

Identification of Mediterranean food plant extracts with beneficial effects on CNS properties. Oral presentation at the consortium meeting of the EU project "local food - nutraceuticals", Dez. 2004, Krakow, Poland.

G.P. ECKERT, I. PETERS, W.E. MÜLLER

Vicious cycle in Alzheimer 's disease: Amyloid beta aggravates its own production, Oral presentation at the AGNP meeting, Okt. 2007, München.

7.3.4. Patente

PCT/EP01/05359: COMBINATION OF LIPOIC ACID AND C1 DONORS FOR THE TREATMENT OF DISORDERS OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich gerne denjenigen meinen aufrichtigen Dank aussprechen, die mir auf meinem bisherigen akademischen Weg mit Rat und Tat zur Seite standen und damit direkt oder indirekt zum Gelingen der Habilitation beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. Dr. Walter E. Müller. Er gab mir durch seine langjährige, großzügige Unterstützung die Gelegenheit, diese Arbeit zu erstellen. Eine offene, sachbezogene und kontinuierliche Diskussionskultur sowie die uneingeschränkte Unterstützung zur Bereitstellung notwendiger Mittel sind auf das Engste mit seiner Person verknüpft und bieten die besten Voraussetzungen für motiviertes und erfolgreiches Arbeiten.

Der Arbeitsgruppe gilt mein aller herzlichster Dank, ohne ihr Engagement und ihre konstruktiven Anregungen wären viele der vorliegenden Ergebnisse nicht möglich gewesen. Im Labor waren oder sind aktiv tätig: Dr. Christopher Kirsch, Dr. Jan Keller, Dr. Cornelia Franke, Dr. Imke Peters, Ulrike Hartig und Gero Hooff als naturwissenschaftliche Doktoranden, Sascha Dos Santos-Meyer und Andrea Pozler als ehemalige Diplomanden und Claudia Jourdan, Ulrike Hermanni und Ina Henke als MTAs und Frau Boyzek als Tierpflegerin.

Mein besonderer Dank gilt ebenfalls meinen Kooperationspartnern, die mit konstruktiven Diskussionen, fruchtbaren Ideen und letztendlich durch ihre Motivation zum Gelingen der Habilitation beigetragen haben. Besonders erwähnen möchte ich Prof. Dr. W. Gibson Wood, der mir nicht nur zwei Post-Doc Aufenthalte in seinem Labor am VA Medical Center in Minneapolis, Minnesota, USA, ermöglichte, sondern über die Jahre zu einem besonders engen Kooperationspartner und Freund geworden ist. Ebenfalls in Minneapolis tätig ist Dr. Urule Igbavboa, dessen Genie ich viel methodisches Know-how verdanke. Weiterhin möchte ich besonders erwähnen: Prof. Dr. Manfred Schubert-Zsilavec (Frankfurt), Priv.-Doz. Dr. Donat Kögel (Frankfurt), Prof. Dr. Dietrich Volmer (Cambridge, UK), Dr. Jan Frank (Kiel), Prof. Dr. Gerald Rimbach (Kiel), Dr. Mark Burns (Washington, USA), Dr. Michael Nöldner (Karlsruhe), Prof. Dr. Michael Karas (Frankfurt), und Prof. Dr. Thomas Deller (Frankfurt). Allen Mitarbeitern in den entsprechenden Arbeitsgruppen, die hier nicht explizit erwähnt wurden, die Arbeit aber dennoch unterstützt haben, möchte ich ebenfalls auf das Allerherzlichste danken.

Prof. Dr. Günther Lambrecht, Prof. Dr. Jochen Klein, Dr. Ulrich Moser und Dr. Kristina Leuner danke ich für viele anregende wissenschaftliche Diskussionen. Denjenigen Mitarbeitern und Kollegen am Pharmakologischen Institut für Naturwissenschaftler der Goethe-Universität, die mich mit ihrer Diskussionsbereitschaft oder praktischen Hilfe bei der Verwirklichung dieser Arbeit unterstützt haben und die ich nicht namentlich erwähnt habe, möchte ich auf das Allerherzlichste danken.

Für die Bereitstellung der finanziellen Mittel zur Umsetzung der experimentellen Arbeiten danke ich der Hanna Bragard-Apfel Stiftung, der Alzheimer Forschung Initiative e.V., der Hirnliga e.V., der NATO, der Hermann-Willkomm-Stiftung, der Stiftung für Patientenkompetenz e.V. und den Freunden & Förderern der Goethe-Universität Frankfurt.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Partnerin Schamim Haidari, meiner Schwester Susanne Eckert, meinen Eltern Gudrun und Peter Eckert und meinem Freund Dr. Eltahmash Israr die immer für den notwendigen persönlichen Rückhalt sorgten.