

Aus dem Bereich der Experimentellen Neurologie

Theoretische Medizin und Biowissenschaften

Der Medizinischen Fakultät

Der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Vitamin D und die Alzheimer-Krankheit –

**Der Einfluss von Vitamin D auf die Prozessierung
des Amyloid-Vorläufer-Proteins und die A β -Degradation**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2018

vorgelegt von

Johannes Lehmann

geboren am 29. Juni 1987 in Villingen-Schwenningen

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	XI
Kooperationen	XII
1. Zusammenfassung	1
1.1. Vitamin D und die Alzheimer-Krankheit – Der Einfluss von Vitamin D auf die Prozessierung des Amyloid-Vorläufer-Proteins und die A β -Degradation.....	1
1.2. Vitamin D and Alzheimer’s disease – Impact of Vitamin D on Amyloid-Precursor-Protein processing and A β degradation.....	2
2. Einleitung	4
2.1. Die Alzheimer-Krankheit.....	4
2.2. Neuropathologie und Molekularbiologie der Alzheimer-Krankheit.....	5
2.3. Die APP-Prozessierung und A β -Degradation.....	6
2.3.1. Die nicht-amyloidogene Prozessierung.....	6
2.3.2. Die amyloidogene Prozessierung.....	7
2.3.2.1. Die β -Sekretase.....	7
2.3.2.2. Die γ -Sekretase.....	8
2.3.3. Die A β -Degradation.....	8
2.4. Der Vitamin D-Metabolismus.....	10
2.5. Vitamin D und das Gehirn.....	12
2.6. Der Vitamin D-Metabolismus, Vitamin D-Mangel und die Alzheimer-Krankheit.....	13
2.7. Fragestellung der Arbeit.....	19
3. Material und Methoden	20
3.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	20
3.2. Geräte.....	23
3.3. Primer.....	24
3.3.1. Murine Primer.....	24
3.3.2. Humane Primer.....	25
3.4. Verwendete Primärantikörper.....	25
3.5. Verwendete Zelllinien.....	26
3.6. Generierung einer Hypovitaminose D im murinen Modell.....	27
3.7. Eukaryotische Zellkultur.....	27

3.7.1. Kultivierung von SH-SY5Y- und N2a-Zellen	27
3.7.2. Auftauen von Zellen.....	28
3.7.3. Kryokonservierung von Zellen	29
3.7.4. Inkubation von Neuroblastom-Zellen mit 25(OH)D3	29
3.7.5. Transiente Transfektion von N2a-Zellen mit hAPP mittels Lipofectamine TM 200031	
3.8. RNS Methoden und quantitative RT-PCR	32
3.8.1. RNS Isolation aus Zellen und Geweben mittels Trizol.....	32
3.8.2. cDNS Synthese	33
3.8.3. Echtzeit-Polymerasekettenreaktion.....	34
3.9. Proteinchemische Analysen.....	35
3.9.1. Zellaufschluss	35
3.9.1.1. Mechanischer Zellaufschluss	35
3.9.1.2. Chemischer Zellaufschluss mittels Lysepuffer	36
3.9.2. Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bicinchoninsäure (BCA) – Test....	37
3.9.3. Immunpräzipitation.....	38
3.9.4. Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE.....	39
3.9.5. Western-Blot-Analyse.....	40
3.9.6. Proteinnachweis mittels ECL- („enhanced chemo-luminescence“) Methode	42
3.9.7. Bestimmung von A β ₄₀ und A β ₄₂ aus Maushirnen.....	44
3.9.8. Bestimmung der A β ₄₀ -Gesamtdegradation	45
3.9.9. Bestimmung der Sekretase-Aktivitäten	46
3.9.9.1. Herstellung von postnuklearen Fraktionen (PNFs)	47
3.9.9.2. <i>In vitro</i> Inkubation von 25(OH)D3 mit Maushirn-PNFs	48
3.9.9.3. Membranpräparation aus PNFs	48
3.9.9.4. Messung der Sekretase-Aktivitäten nach Membranpräparation	49
3.9.9.5. Messung der Sekretase-Aktivitäten auf lebenden Zellen	50
3.9.10. Messung der Neprilysin-Aktivität.....	51
3.9.11. Messung der IDE-Aktivität.....	52
3.9.12. Spezifität der verwendeten Enzymaktivitätsmessungen	54
3.10. Lipidanalytische Arbeiten.....	55
3.10.1. 25-OH-VitaminD-ELISA	55
3.10.2. Lipidextraktion aus Maushirnhomogenaten	56
3.11. Statistische Datenauswertung	57
4. Ergebnisse	58

4.1. Auswirkung eines Vitamin D-Mangels auf die zerebrale A β -Konzentration	58
4.1.1. Fütterung weiblicher Wildtypmäuse mit Vitamin D-freiem Futter	58
4.1.2. Bestimmung des zerebralen Vitamin D-Gehalts.....	59
4.1.3. Bestimmung des zerebralen A β -Gehalts.....	60
4.2. Sekretase-Aktivitäten aus Vitamin D-defizienten Mäusen	61
4.2.1. Amyloidogene Prozessierung	61
4.2.1.1. Bestimmung der β -Sekretase-Aktivität	61
4.2.1.2. Bestimmung der β -Sekretase-Aktivität mit zusätzlicher 25(OH)D3-Supplementierung.....	62
4.2.1.3. Bestimmung der sAPP β -Proteinspiegel	63
4.2.1.4. Western-Blot-Analyse der BACE1-Proteinspiegel	64
4.2.1.5. Bestimmung der Bace1-Genexpression	65
4.2.1.6. Bestimmung der γ -Sekretase-Aktivität	66
4.2.1.7. Western-Blot-Analyse der Nicastrin-Proteinspiegel	66
4.2.1.8. Genexpressionsanalyse der γ -Sekretase-Untereinheiten	67
4.2.2. Nicht-amyloidogene Prozessierung	69
4.2.2.1. Bestimmung der α -Sekretase-Aktivität	69
4.2.2.2. Western-Blot-Analyse der ADAM10- und ADAM17-Proteinspiegel.....	70
4.2.2.3. Bestimmung der Adam17-Genexpression	71
4.3. Die A β -Degradation aus Vitamin D-defizienten Mäusen	71
4.3.1. Bestimmung der A β -Gesamtdegradation.....	72
4.3.2. Bestimmung der Neprilysin-Aktivität.....	73
4.3.3. Bestimmung der Nep-Genexpression	74
4.3.4. Bestimmung der IDE-Aktivität.....	75
4.3.5. Genexpressionsanalyse der A β -degradierenden Enzyme	75
4.4. Zellkultur – Inkubation von SH-SY5Y- und N2a-Zellen mit 25(OH)D3	77
4.4.1. Bestimmung des A β -Gehalts aus SH-SY5Y-Zellen	78
4.4.2. Amyloidogene Prozessierung nach 25(OH)D3-Kurzzeitinkubation	79
4.4.2.1. Bestimmung der β -Sekretase-Aktivität	79
4.4.2.2. Bestimmung der BACE1-Genexpression und –Proteinspiegel.....	80
4.4.2.3. Bestimmung der γ -Sekretase-Aktivität und Nicastrin-Expression.....	81
4.4.3. Nicht-amyloidogene Prozessierung nach 25(OH)D3-Kurzzeitinkubation	81
4.4.4. A β -Gesamtdegradation auf N2a-Zellen nach 25(OH)D3-Kurzzeitinkubation.....	82
4.4.5. A β -Katabolismus nach 25(OH)D3-Langzeitinkubation	84

4.4.5.1. Bestimmung der zellulären 25(OH)D3-Konzentration	84
4.4.5.2. Bestimmung der A β -Gesamtdegradation auf N2a-Zellen.....	85
4.4.5.3. Bestimmung der Neprilysin-Aktivität	86
4.4.5.4. Bestimmung der Neprilysin-Genexpression	87
4.4.5.5. Bestimmung der IDE-Proteinspiegel und –Genexpression.....	88
4.4.5.6. Genexpressionsanalyse der A β -Degradationsenzyme	89
4.4.6. Bestimmung des A β -Gehalts aus langzeitinkubierten N2a-Zellen.....	90
4.5. Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse	92
5. Diskussion	94
5.1. Zerebraler Vitamin D-Mangel <i>in vivo</i> , supraphysiologische Vitamin D-Supplementierung <i>in vitro</i>	94
5.2. Der Einfluss von Vitamin D auf die A β -Pathologie.....	97
5.2.1. Ein Vitamin D-Mangel <i>in vivo</i> führt zu einer zerebralen A β -Erhöhung.....	97
5.2.2. Eine Vitamin D-Supplementierung <i>in vitro</i> führt zu einer A β -Reduktion	98
5.3. Beeinflussung der amyloidogenen APP-Prozessierung durch Vitamin D	99
5.3.1. Ein Vitamin D-Mangel <i>in vivo</i> führt zu einer Steigerung der β -Sekretase-Aktivität	99
5.3.2. Eine Vitamin D-Supplementierung <i>in vitro</i> führt zur Reduktion der β -Sekretase-Aktivität	101
5.3.3. Ein moderater Vitamin D-Mangel <i>in vivo</i> führt zu tendenziellen Veränderungen des γ -Sekretase-Komplexes	102
5.3.4. Eine Vitamin D-Supplementierung <i>in vitro</i> führt zur signifikanten Reduktion der γ -Sekretase-Aktivität.....	104
5.4. Beeinflussung der nicht-amyloidogenen APP-Prozessierung durch Vitamin D.....	105
5.5. Beeinflussung der A β -Degradation durch Vitamin D.....	108
5.5.1. Ein Vitamin D-Mangel <i>in vivo</i> führt zu einer Reduktion der A β -Gesamtdegradation	108
5.5.2. Eine Vitamin D-Supplementierung <i>in vitro</i> führt zu einer zeitabhängigen Steigerung der A β -Gesamtdegradation.....	109
5.5.3. Ein Vitamin D-Mangel <i>in vivo</i> führt zu einer Reduktion der Neprilysin-Aktivität und -Expression	110
5.5.4. Eine Vitamin D-Supplementierung <i>in vitro</i> führt zu einer Steigerung der Neprilysin-Aktivität und –Expression	111
5.5.5. Ein Vitamin D-Mangel <i>in vivo</i> führt zu keiner signifikanten Veränderung der IDE-Aktivität und -Expression	112

5.5.6. Eine Vitamin D-Supplementierung <i>in vitro</i> führt zu einer Erhöhung der IDE-Proteinspiegel ohne signifikante Beeinflussung der Genexpression	113
5.5.7. Ein Vitamin D-Mangel <i>in vivo</i> führt zu einer tendenziellen Reduktion der ECE-1- und ECE-2-Expression. Eine Supplementierung <i>in vitro</i> führt zu einer tendenziellen Steigerung	115
5.5.8. Ein Vitamin D-Mangel <i>in vivo</i> führt zu einer tendenziellen Reduktion der ACE-Expression. Eine Supplementierung <i>in vitro</i> führt zu einer signifikanten Steigerung	116
5.5.9. Ein Vitamin D-Mangel <i>in vivo</i> führt zu einer tendenziellen Steigerung der Cathepsin B-Expression. Eine Supplementierung <i>in vitro</i> führt zu einer signifikanten Steigerung	117
5.5.10. Ein Vitamin D-Mangel <i>in vivo</i> führt zu einer tendenziellen Steigerung der MMP-2 und MMP-9-Expression. Eine Supplementierung <i>in vitro</i> führt zu einer signifikanten Steigerung	118
5.5.11. Eine Vitamin D-Supplementierung <i>in vitro</i> führt zu einer signifikanten Steigerung der Plasminogen-Expression.....	120
5.6. Ausblick.....	123
6. Literatur	126
7. Publikationen	154
8. Danksagung	155

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
Aβ	Amyloid-β-Peptid
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym (<i>engl.: <u>angiotensin-converting enzyme</u></i>)
AD	Alzheimer Krankheit (<i>engl.: <u>Alzheimer's disease</u></i>)
ADAM	Eine Disintegrin und Metalloproteinase (<i>engl.: <u>A Disintegrin And Metalloproteinase</u></i>)
AICD	Intrazelluläre Domäne des APP (<i>engl.: <u>APP intracellular domain</u></i>)
AK	Antikörper
Ang II	Angiotensin II
Aph1	Anterior pharynx-defective 1
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amyloides Vorläuferprotein (<i>engl.: <u>Amyloid Precursor Protein</u></i>)
AS	Aminosäure
BACE1	<i>engl.: <u>β-site APP cleaving enzyme 1</u></i>
BCA	4,4'-Dicarboxy-2,2'-bichinolin, Bicinchoninsäure
BSA	Rinderalbumin (<i>engl.: <u>bovine serum albumin</u></i>)
bzw.	beziehungsweise
Ca	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	<i>engl.: <u>complementary DNA</u></i>
C/EBPβ	<i>engl.: <u>CCAAT enhancer-binding protein β</u></i>
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
CTF	C-terminales Fragment
CtsB	Cathepsin B
Cu	Kupfer
CuSO ₄	Kupfersulfat
Da	Dalton (atomare Masseinheit)
dd	bidestilliert
DBP	Vitamin D-bindendes Protein (<i>engl.: <u>vitamin D binding protein</u></i>)
DHA	Docosahexaensäure (<i>engl.: <u>Docosahexaenoic acid</u></i>)
DMEM	„Dulbecco's modified Eagels Medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA/DNS	Desoxyribonukleinsäure (<i>engl.: <u>deoxyribonucleic acid</u></i>)
ECE-1/ECE-2	Endothelin-konvertierende Enzyme 1 und 2 (<i>engl.: <u>endothelin-converting enzymes</u></i>)
ECL	<i>engl.: <u>enhanced-chemo-luminescence</u></i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	<i>engl.: <u>epidermal growth factor receptor</u></i>
ELISA	<i>engl.: <u>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</u></i>
Engl.	englisch

ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	und weitere
FBS	fetales Kälber-Serum (<i>engl.: fetal bovine serum</i>)
FRET	<i>engl.: Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
GWAS	genomweite Assoziationsstudie (<i>engl.: genome-wide association study</i>)
h	Stunde (<i>lat.: hora</i>)
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HEPES	Puffersubstanz, 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>engl.: Horseradish Peroxidase</i>)
IDE	Insulin-degradierendes Enzym (<i>engl.: insulin-degrading enzyme</i>)
I.E.	Internationale Einheit
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
k	kilo
Kap.	Kapitel
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
LRP	<i>engl.: low density lipoprotein receptor-related protein</i>
m	milli
M	mol/l
mA	Milliampere
MEM	„Minimum Essential Medium“
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
mm	Millimeter
MMP-2/MMP-9	Matrix-Metalloproteinasen 2 und 9 (<i>engl.: matrix metalloproteinases</i>)
mRNS	messenger Ribonukleinsäure
n	Nano
N ₂	Stickstoff
n.b.	nicht bestimmt
NF-κB	<i>engl.: nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
n.s.	nicht signifikant
NS	Neuroserpin
Na ₂ HPO ₄	di-Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
Ncstn	Nicastrin
NEP	Neprilysin
NP-40	Nonidet P40 Substitute
OH	Hydroxy
PAGE	<i>engl.: polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PAI-1	Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1

PBS	phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung (<i>engl.: phosphate buffered saline</i>)
PEN2	Presenilin enhancer 2
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PKC	Proteinkinase C
Plg	Plasminogen
PNF	postnukleare Fraktionen
PS	Presenilin
Psen	Presenilin (Gen)
Psenen2	Presenilin enhancer 2 (Gen)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (<i>engl.: reactive oxygen species</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>engl.: rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (<i>engl.: real-time PCR</i>)
RXR	Retinoid X-Rezeptor
S1P	Sphingosin-1-phosphat
sAPP α	<i>engl.: soluble α-secreted APP</i>
sAPP β	<i>engl.: soluble β-secreted APP</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>engl.: sodium dodecyl sulfate</i>)
sek	Sekunde
siRNA	<i>engl.: small interfering RNA</i>
s.o.	siehe oben
StabwM	Standardabweichung des Mittelwertes
s.u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
TACE	<i>engl.: TNFα converting enzyme</i>
TBP	<i>engl.: TATA-box binding protein</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Units
u.a.	unter anderem
UCHL1	<i>engl.: Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1</i>
uPA	<i>engl.: urokinase-type plasminogen activator</i>
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
UVB	Ultraviolette Strahlung im Wellenlängenbereich zwischen 290 und 315 nm
V	Volt
VDR	Vitamin D-Rezeptor
VDRE	Vitamin D-Response Element
WB	Western-Blot
WT	Wildtyp
ZnCl ₂	Zinkchlorid

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 - Schematische Darstellung der Vitamin D-Biosynthese.....	12
Abbildung 2 – Graphische Zusammenfassung der gegenseitigen Beeinflussung des Vitamin D-Metabolismus und der A β -Pathologie.....	18
Abbildung 3 - Zerebraler 25(OH)D3-Spiegel der Mäuse mit Vitamin D-Mangel	59
Abbildung 4 - Zerebrale A β ₄₀ - und A β ₄₂ -Proteinspiegel der Mäuse mit Vitamin D-Mangel....	60
Abbildung 5 - β -Sekretase-Aktivität der Mäuse mit Vitamin D-Mangel.	61
Abbildung 6 - β -Sekretase-Aktivität der Mäuse mit Vitamin D-Mangel + 25(OH)D3-Supplementierung	62
Abbildung 7 - sAPP β -Proteinspiegel der Mäuse mit Vitamin D-Mangel.....	63
Abbildung 8 - BACE1-Proteinspiegel der Mäuse mit Vitamin D-Mangel	64
Abbildung 9 - Bace1-Genexpression der Mäuse mit Vitamin D-Mangel.....	65
Abbildung 10 - γ -Sekretase-Aktivität der Mäuse mit Vitamin D-Mangel	66
Abbildung 11 - Nicastrin-Proteinspiegel der Mäuse mit Vitamin D-Mangel.....	67
Abbildung 12 - Genexpressionsanalyse der γ -Sekretase-Untereinheiten der Mäuse mit Vitamin D-Mangel.	68
Abbildung 13 - α -Sekretase-Aktivität der Mäuse mit Vitamin D-Mangel	69
Abbildung 14 - ADAM10- und ADAM17-Proteinspiegel der Mäuse mit Vitamin D-Mangel.....	70
Abbildung 15 - Adam17-Genexpression der Mäuse mit Vitamin D-Mangel.....	71
Abbildung 16 - A β -Gesamtdegradation der Mäuse mit Vitamin D-Mangel + 25(OH)D3-Supplementierung.....	72
Abbildung 17 - Neprilysin-Aktivität der Mäuse mit Vitamin D-Mangel	73
Abbildung 18 - Nep-Genexpression der Mäuse mit Vitamin D-Mangel.....	74
Abbildung 19 - IDE-Aktivität der Mäuse mit Vitamin D-Mangel.....	75
Abbildung 20 - Expressionsanalyse der A β -degradierenden Enzyme aus Vitamin D-defizienten Mäusen	76
Abbildung 21 - A β -Proteinspiegel aus SH-SY5Y APP-Zellen nach 25(OH)D3-Inkubation....	78
Abbildung 22 - β -Sekretase-Aktivität aus lebenden Zellen und PNFs nach 25(OH)D3-Inkubation.....	79

Abbildung 23 - BACE1-Genexpression und -Proteinspiegel aus SH-SY5Y WT-Zellen nach 25(OH)D3-Inkubation.....	80
Abbildung 24 - γ -Sekretase-Aktivität und NCSTN-Genexpression aus SH-SY5Y WT-Zellen nach 25(OH)D3-Inkubation	81
Abbildung 25 - α -Sekretase-Aktivität aus SH-SY5Y WT-Zellen nach 25(OH)D3-Inkubation.	82
Abbildung 26 – A β -Gesamtdegradation nach 25(OH)D3-Kurzzeitinkubation.	83
Abbildung 27 - 25(OH)D3-Spiegel nach Langzeitinkubation der N2a-Zellen.....	84
Abbildung 28 - A β -Gesamtdegradation nach 25(OH)D3-Langzeitinkubation.....	85
Abbildung 29 - Neprilysin-Aktivität aus langzeitinkubierten N2a-Zellen.	86
Abbildung 30 - Nep-Genexpression aus langzeitinkubierten N2a-Zellen.	87
Abbildung 31 - IDE-Proteinspiegel und Ide-Expression aus langzeitinkubierten N2a-Zellen..	88
Abbildung 32 - Genexpressionsanalyse der A β -degradierenden Enzyme aus langzeitinkubierten N2a-Zellen.....	90
Abbildung 33 - APP- und A β -Proteinspiegel nach transienter Transfektion aus langzeitinkubierten N2a-Zellen.....	91
Abbildung 34 – Einfluss von Vitamin D auf die APP-Prozessierung und A β -Degradation..	125

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 - Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	20
Tabelle 2 - Verwendete Geräte	23
Tabelle 3 - Sequenzen der verwendeten murinen Primer (klein und <i>kursiv</i>)	24
Tabelle 4 - Sequenzen der verwendeten humanen Primer (groß und nicht-kursiv)	25
Tabelle 5 - Verwendete Primärantikörper	25
Tabelle 6 - Verwendete Zelllinien	26
Tabelle 7 - Verwendete Zellkulturmedien	28
Tabelle 8 - 25(OH)D3-Inkubation	30
Tabelle 9 - Transfektion von N2a-Zellen mit Lipofectamine TM 2000 – eingesetzte Menge/Volumina an DNS, Lipofectamine, OptiMEM	31
Tabelle 10 - Echtzeit-Polymerasekettenreaktion – Geräteeinstellungen	35
Tabelle 11 - Immunpräzipitation - verwendete Waschpuffer	38
Tabelle 12 - Proteinelektrophorese - verwendete Proteinkonzentration, Notwendigkeit des Aufkochens der Proben	40
Tabelle 13 - Western-Blot-Analyse - Protein-abhängige Angabe der jeweiligen Transferdauer und der Möglichkeit des Transfers über Nacht	41
Tabelle 14 - Verwendete Primär- und Sekundärantikörper mit jeweiliger Angabe der eingesetzten Konzentration und des verwendeten Puffers	43
Tabelle 15 - Bestimmung der Sekretase-Aktivitäten – verwendete Proteinkonzentrationen der PNFs und Resolubilisierungsvolumina	48
Tabelle 16 - Bestimmung der Sekretase-Aktivitäten - eingesetzte Proteinkonzentration	49
Tabelle 17 - Bestimmung der Sekretase-Aktivitäten – eingesetzte Substrat-Konzentrationen, Extinktions- und Emissions-Wellenlängen	50
Tabelle 18 - Spezifität der einzelnen Enzymaktivitätsmessungen	54
Tabelle 19 - Ergebnisse der Degradationsenzym-Genexpressionsanalyse aus Vitamin D-defizienten Mäusen.	76
Tabelle 20 - Ergebnisse der Degradationsenzym-Genexpressionsanalyse aus langzeitinkubierten N2a-Zellen	89
Tabelle 21 - Tabellarische Gegenüberstellung der Ergebnisse	92

Kooperationen

Ohne die Unterstützung der Kolleginnen und Kollegen unserer und anderer Arbeitsgruppen wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Für die Kooperationen möchte ich mich an dieser Stelle herzlichst bedanken. In der folgenden Zusammenstellung sind die Kapitel mit den jeweiligen Tabellen und Abbildungen aufgeführt, welche in kollegialer Zusammenarbeit entstanden sind. Des Weiteren sind die beteiligten Personen und der durchgeführte Versuchsanteil angegeben. Ein Teil der Ergebnisse wurde primär durch Kolleginnen und Kollegen unserer Arbeitsgruppe und nicht durch den Autor dieser Arbeit selbst erhoben. Diese wurden dennoch für ein besseres Gesamtverständnis in diese Arbeit aufgenommen. Die jeweiligen Abbildungen sind mit einem * markiert und die entsprechende Publikation wird angegeben. Die Versuchsplanung und Auswertung erfolgte in Kooperation mit unserem Laborleiter PD Dr. Marcus Grimm.

Kapitel	Abbildung/ Tabelle	Tätigkeit/Experiment	Hauptsächlich an der Kooperation beteiligte Personen
4.1.2.	Abbildung 3	Gehirn-/Gewebe-Präparation	Dr. Janine Mett Johannes Lehmann
		Lipidextraktion	Dr. Janine Mett Johannes Lehmann Anleitung durch Dr. Benjamin Hundsdörfer
		Vitamin D-ELISA	Dr. Janine Mett Johannes Lehmann
4.1.3.	Abbildung 4	Erstellung Homogenate	Johannes Lehmann
		A β ₄₀ -, A β ₄₂ -ELISA	Dr. Janine Mett Johannes Lehmann
4.2.1.1.	Abbildung 5	Aktivitätsmessung β -Sekretase	Johannes Lehmann Anleitung durch Dr. Tatjana Rothhaar
4.2.1.2.	Abbildung 6	* entnommen aus GRIMM <i>et al.</i> , 2017	
4.2.1.3.	Abbildung 7	Erstellung Homogenate	Johannes Lehmann
		WB-Analyse sAPP β	Dr. Janine Mett Johannes Lehmann
4.2.1.4	Abbildung 8	Erstellung Homogenate	Johannes Lehmann
		WB-Analyse BACE1	Dr. Janine Mett Johannes Lehmann

4.2.1.5.	Abbildung 9	Gewebe-Präparation/Erstellung Homogenate	Johannes Lehmann
		RT-PCR <i>Bace1</i>	Dr. Sven Grösgen
4.2.1.6.	Abbildung 10	Aktivitätsmessung γ -Sekretase	Johannes Lehmann Anleitung durch Dr. Tatjana Rothaar
4.2.1.7.	Abbildung 11	Erstellung Homogenate	Johannes Lehmann
		WB-Analyse NCSTN	Dr. Janine Mett Johannes Lehmann
4.2.1.8.	Abbildung 12	Gewebe-Präparation/Erstellung Homogenate	Johannes Lehmann
		RT-PCR γ -Sekretase-Komplex	Dr. Sven Grösgen
4.2.2.1.	Abbildung 13	Aktivitätsmessung α -Sekretase	Johannes Lehmann Anleitung durch Dr. Viola Hauptenthal
4.2.2.2.	Abbildung 14	Erstellung Homogenate	Johannes Lehmann
		WB-Analyse ADAM10/ADAM17	Dr. Janine Mett Johannes Lehmann
4.2.2.3.	Abbildung 15	Gewebe-Präparation/Erstellung Homogenate	Johannes Lehmann
		RT-PCR <i>Adam17</i>	Dr. Sven Grösgen
4.3.1.	Abbildung 16	* entnommen aus GRIMM <i>et al.</i> , 2017	
4.3.2.	Abbildung 17	Erstellung Homogenate	Johannes Lehmann
		Aktivitätsmessung Nepriylisin	Dr. Janine Mett
4.3.3.	Abbildung 18	Gewebe-Präparation/Erstellung Homogenate	Johannes Lehmann
		RT-PCR <i>Nep</i>	Dr. Sven Grösgen
4.3.4.	Abbildung 19	Erstellung Homogenate	Johannes Lehmann
		Aktivitätsmessung IDE	Dr. Janine Mett
4.3.5.	Tabelle 19 Abbildung 20	Gewebe-Präparation/Erstellung Homogenate	Johannes Lehmann
		RT-PCR A β -Degradationsenzyme	Dr. Sven Grösgen

4.4.1.	Abbildung 21	* entnommen aus GRIMM <i>et al.</i> , 2017	
4.4.2.1.	Abbildung 22 A	* entnommen aus GRIMM <i>et al.</i> , 2017	
	Abbildung 22 B	Erstellung PNFs	Anna Lauer Johannes Lehmann
		25(OH)D3-Inkubation	Anna Lauer Johannes Lehmann
		Aktivitätsmessung β -Sekretase	Anna Lauer Johannes Lehmann
4.4.2.2.	Abbildung 23 A	Zellkultur/25(OH)D3-Inkubation	Andrea Thiel
		RT-PCR <i>BACE1</i>	Anna Lauer Johannes Lehmann
	Abbildung 23 B	* entnommen aus GRIMM <i>et al.</i> , 2017	
4.4.2.3.	Abbildung 24 A	* entnommen aus GRIMM <i>et al.</i> , 2017	
	Abbildung 24 B	Zellkultur/25(OH)D3-Inkubation	Andrea Thiel
		RT-PCR <i>NCSTN</i>	Anna Lauer Johannes Lehmann
4.4.3.	Abbildung 25	* entnommen aus GRIMM <i>et al.</i> , 2017	
4.4.4.	Abbildung 26	Zellkultur/25(OH)D3-Inkubation	Johannes Lehmann (10 h) Andrea Thiel (18 h)
		A β -Inkubation/WB-Analyse A β / Bestimmung A β - Gesamtdegradation	Dr. Janine Mett (10 h) Johannes Lehmann (10 h) Andrea Thiel (18 h)
4.4.5.1.	Abbildung 27	Zellkultur/25(OH)D3-Inkubation	Inge Tomic Dr. Janine Mett Johannes Lehmann
		25(OH)D3-ELISA	Dr. Janine Mett Johannes Lehmann
4.4.5.2.	Abbildung 28	Zellkultur/25(OH)D3-Inkubation	Inge Tomic Dr. Janine Mett Johannes Lehmann
		A β -Inkubation/WB-Analyse A β / Bestimmung A β - Gesamtdegradation	Johannes Lehmann
4.4.5.3.	Abbildung 29	Zellkultur/25(OH)D3-Inkubation	Johannes Lehmann
		Aktivitätsmessung Nephilysin	Dr. Janine Mett

4.4.5.4.	Abbildung 30	Zellkultur/25(OH)D3-Inkubation	Johannes Lehmann
		RT-PCR <i>NEP</i>	Christoph Stahlmann
4.4.5.5.	Abbildung 31 A	Zellkultur/25(OH)D3-Inkubation	Johannes Lehmann
		WB-Analyse IDE	Johannes Lehmann
	Abbildung 31 B	Zellkultur/25(OH)D3-Inkubation	Johannes Lehmann
		RT-PCR <i>IDE</i>	Christoph Stahlmann
4.4.5.6.	Tabelle 20 Abbildung 32	Zellkultur/25(OH)D3-Inkubation	Johannes Lehmann
		RT-PCR A β -Degradationsenzyme	Christoph Stahlmann
4.4.6	Abbildung 33	Zellkultur/25(OH)D3-Inkubation	Johannes Lehmann
		<i>hAPP</i> -Transfektion/WB-Analyse APP und A β	Dr. Janine Mett

1. Zusammenfassung

1.1. Vitamin D und die Alzheimer-Krankheit – Der Einfluss von Vitamin D auf die Prozessierung des Amyloid-Vorläufer-Proteins und die A β -Degradation

Die Alzheimer-Krankheit ist eine neurodegenerative Erkrankung, bei der sich histopathologisch u.a. extrazelluläre amyloide Plaques zeigen. Diese bestehen aus aggregiertem Amyloid β (A β), das aus der sequentiellen Spaltung des Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP) durch die β - und γ -Sekretase entsteht. Alternativ kann APP durch die α -Sekretase innerhalb der A β -Domäne geschnitten werden, wodurch die Entstehung des A β -Peptids verhindert wird. Die A β -Menge wird neben der Aktivität dieser Enzyme durch verschiedene A β -Degradationsenzyme, wie Neprilysin und IDE, bestimmt.

Vitamin D ist ein Secosteroid, welches in der menschlichen Haut UVB-abhängig aus Cholesterin gebildet werden kann. Neben seiner klassischen Funktion im Calciumhaushalt und beim Knochenaufbau, zeigen neuere Studien, dass Vitamin D eine wichtige Rolle im zentralen Nervensystem zukommt. Hier wirkt es u.a. neuroprotektiv und antiinflammatorisch. Ein Vitamin D-Mangel wurde in diesem Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko an der Alzheimer-Demenz zu erkranken assoziiert.

Da die molekularen Grundlagen dieses Sachverhalts weitestgehend unbekannt sind, wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Vitamin D auf den A β -Anabolismus und -Katabolismus systematisch mittels Expressionsanalysen, Bestimmung von Proteinspiegeln, sowie Enzymaktivitätsmessungen untersucht. Im *in vivo* Mausmodell führte eine leichte bis moderate Vitamin D-Mangelsituation (23%ige Reduktion im Vergleich zu den Kontrolltieren), wie sie typischerweise in der Bevölkerung beobachtet wird, zu einem signifikanten Anstieg von A β_{40} und A β_{42} . Dies war auf eine gesteigerte β -Sekretaseaktivität, bedingt durch erhöhte BACE1-Proteinspiegel, zurückzuführen. Des Weiteren konnten tendenzielle Expressionssteigerungen einzelner γ -Sekretase-Untereinheiten (Nicastrin, Presenilin 2, Presenilin Enhancer 2) nachgewiesen werden. Die A β -Gesamtdegradation war signifikant reduziert. Passend kam es zu einer Expressions- und Aktivitätsreduktion von Neprilysin. Weitere A β -Degradationsenzyme, wie ECE-1 und -2 sowie ACE waren ebenfalls tendenziell in ihrer Expression reduziert. *In vitro* führte eine (supra-)physiologische Calcidiol-Supplementierung in SH-SY5Y- sowie N2a-Neuroblastomzellen zu einer signifikanten A β -Reduktion. In Übereinstimmung mit den *in vivo* Daten war dies auf eine reduzierte β -Sekretase- sowie γ -Sekretaseaktivität zurückzuführen. Die BACE1- und NCSTN-Expression waren signifikant reduziert. Gleichzeitig zeigte sich eine Steigerung der α -Sekretase-

Gesamtaktivität. Die A β -Gesamtdegradation war zeitabhängig gesteigert. Dies war auch hier auf eine Erhöhung der Neprilysin-Expression und –Aktivität zurückzuführen. Des Weiteren kam es zu einer Erhöhung der IDE-Proteinspiegel sowie der Expression weiterer A β -degradierender Enzyme (*ACE, CtsB, MMP-2 und -9*).

Zusammenfassend bedingt bereits ein leichter bis moderater Vitamin D-Mangel eine Zunahme der A β -Gesamtmenge durch negative Beeinflussung des Gleichgewichts zwischen A β -Produktion und –Degradation. Zudem könnte eine Supplementierung bei bereits ausreichender Vitamin D-Versorgung mit dem Ziel einer *hochnormalen* Calcidiol-Serumkonzentration einen zusätzlichen positiven Effekt auf die A β -Homöostase haben.

1.2. Vitamin D and Alzheimer's disease – Impact of Vitamin D on Amyloid-Precursor-Protein processing and A β degradation

Alzheimer's disease is a neurodegenerative disorder which is histopathologically characterized by amyloid plaques. Those plaques are mainly composed of aggregated Amyloid- β (A β) which itself originates from the sequential proteolysis of the Amyloid-Precursor-Protein (APP) by shedding of the β - and γ -secretase. Alternatively APP can be cleaved within the A β domain by the α -secretase which prevents the formation of the A β -peptid. Beside the activity of these secretases, total A β is determined by various A β -degrading enzymes, like Neprilysin and IDE.

Vitamin D is a secosteroid which arises from cholesterol in the human skin in dependency of UVB radiation. Its classic function is the regulation of the calcium balance and bone augmentation. However, recent studies show that Vitamin D plays a crucial role in the central nervous system by exhibiting neuroprotective and anti-inflammatory properties. In this context Vitamin D deficiency has been associated with an increased risk of developing Alzheimer's dementia.

Since the molecular background of this data is mostly unknown, we systematically investigated the impact of Vitamin D on A β anabolism and catabolism by determining the gene expressions, protein levels and enzyme activities. In the *in vivo* mouse model a mild to moderate hypovitaminosis D lead to a significant increase of A β_{40} and A β_{42} . This was attributed to an increase of the β -secretase activity caused by an increased BACE1 protein level. In addition the gene expression of single subunits of the γ -secretase (Nicastrin, Presenilin 2, Presenilin Enhancer 2) showed an increasing trend. Total A β degradation was significantly reduced. Appropriately, the expression and enzyme activity of Neprilysin was decreased. Further A β -degrading enzymes, like ECE-1 and -2, as well as ACE showed a

reduction by trend.

In vitro a (supra-) physiological Calcidiol supplementation of SH-SY5Y and N2a neuroblastoma cells lead to a significant A β reduction. In line with the *in vivo* data this was attributed to a reduction of the β - and γ -secretase activity. BACE1 and Nicastrin gene expressions were significantly decreased. Simultaneously, there was an increase of total α -secretase activity. A β -degradation was increased in a time dependent manner, which again was caused by a raised Neprilysin gene expression and enzyme activity. Furthermore, the IDE protein levels were increased as well as the gene expression of other A β -degrading enzymes ((ACE, CtsB, MMP-2 und -9).

Taken together a mild to moderate hypovitaminosis D already seems to increase the total A β amount by negatively influencing the balance between A β production and degradation. In addition a supplementation under already sufficient Vitamin D conditions with the aim of *high normal* Calcidiol serum concentrations could affect the A β homeostasis in a positive way.

2. Einleitung

2.1. Die Alzheimer-Krankheit

Die neurodegenerative Alzheimer-Krankheit (*engl.: Alzheimer's disease, AD*) gehört zu den häufigsten Erkrankungen weltweit. 2016 litten rund 47 Millionen Menschen an Demenzerkrankungen, wobei 60-80% der Alzheimer-Form zugeschrieben werden, was diese zur häufigsten Demenzform macht. Es ist von einer jährlichen Inzidenz von 4,6 Millionen Neuerkrankungen auszugehen (FERRI et al., 2005; PRINCE et al., 2013; PRINCE et al., 2016). Die Wahrscheinlichkeit an der Alzheimer-Demenz zu erkranken nimmt mit steigendem Alter zu (EVANS et al., 1989; HOFMAN et al., 1991; OTT et al., 1995) – während in der Alterskohorte ≥ 65 Jahre bereits 11% der Bevölkerung erkrankt sind, steigt dieser Anteil auf etwa ein Drittel in der Alterskohorte ≥ 85 Jahre an. (ASSOCIATION, 2016; HEBERT et al., 2013).

Das Risiko an einer Alzheimer-Demenz zu erkranken wird u.a. durch genetische Faktoren beeinflusst (GATZ et al., 1997; GATZ et al., 2006). Neben dem seit langem bekannten Apolipoprotein- $\epsilon 4$ -Allel, welches bei heterozygoten Trägern das AD-Risiko um das Dreifache und bei homozygoten Trägern um das 12-15-fache erhöht (LAMBERT, AMOUYEL, 2011; MICHAELSON, 2014; SAUNDERS et al., 1993), konnten neuere genomweite Assoziationsstudien (*engl.: genome-wide association study - GWAS*) weitere Risikogene identifizieren: Diese stehen im Zusammenhang mit Immun- und Entzündungsreaktionen, dem endosomalen Transport sowie dem Cholesterin- und Lipidmetabolismus (INTERNATIONAL GENOMICS OF ALZHEIMER'S DISEASE CONSORTIUM et al., 2015; JONES et al., 2010; KARACA et al., 2017). Weniger als 5% der Alzheimer-Fälle werden auf meist familiäre, autosomal dominant vererbte Mutationen in den Presenilin 1- (CRUTS, VAN BROECKHOVEN, 1998; HUTTON, 2004; MURAYAMA et al., 1999), Presenilin 2- (RENBAUM, LEVY-LAHAD, 1998) oder Amyloid-Vorläufer- Protein (*engl.: Amyloid-Precursor-Protein – APP*)-Genen (FIDANI, GOATE, 1992) zurückgeführt. Diese Patienten erkranken deutlich früher, teilweise vor dem 30. Lebensjahr (BEKRIS et al., 2010; CAMPION et al., 1999; FILLEY et al., 2007; TERRY, 1995).

Neben den genetischen, nicht beeinflussbaren Risikofaktoren zeigen mehrere Studien einen Zusammenhang zwischen den klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren und Demenzerkrankungen. Entsprechend scheinen Rauchen (ANSTEY et al., 2007; RUSANEN et al., 2011), Adipositas (ANSTEY et al., 2011; LOEF, WALACH, 2013), Diabetes (GUDALA et al., 2013; VAGELATOS, ESLICK, 2013), arterielle Hypertonie (DEBETTE et

al., 2011; LAUNER et al.) und Hypercholesterinämie (SOLOMON et al., 2009) das Demenzrisiko zu erhöhen.

Symptomatisch zeigt sich meist zunächst eine Abnahme der Gedächtnisleistung, wobei vorwiegend das Kurzzeitgedächtnis betroffen ist. Im Verlauf kommt es zu kortikalen Störungen, wie dem Verlust erlernter Fähigkeiten und dem Nicht-Erkennen von Personen und Gegenständen. Begleitend treten Persönlichkeitsveränderungen und Aggression auf (CARLESIMO, OSCAR-BERMAN, 1992; PRINCE et al., 2016). Die Krankheit schreitet ab dem Auftreten der ersten Symptome über Jahre bis Jahrzehnte kontinuierlich fort und führt letztlich zur Bettlägerigkeit und absoluten Pflegebedürftigkeit der Erkrankten. Die Patienten versterben meist an sekundären Erkrankungen, wie Harnwegsinfektionen oder Pneumonien (BURNS et al., 1990; ST GEORGE-HYSLOP, 2000).

Trotz jahrzehntelanger Forschung konnte bis heute keine den Krankheitsverlauf verändernde Therapie gefunden werden. Die einzigen derzeit in Deutschland zugelassenen Medikamente, laut den aktuellen Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, sind die Acetylcholinesterase-Inhibitoren Donepezil, Rivastigmin, Galantamin und der NMDA-Rezeptorantagonist Memantin, welche lediglich eine symptomatische Wirkung auf die Kernsymptome Kognition und Alltagsaktivitäten zeigen. Ein Fortschreiten der Erkrankung konnte jedoch mit keiner der Substanzen verhindert werden (DGN, 2016).

Aufgrund einer fehlenden kausalen Therapie, kommt der Prävention durch Beeinflussung des Lebensstils eine große Bedeutung zu. In diesem Zusammenhang scheinen regelmäßige körperliche Aktivität, Reduktion kardiovaskulärer Risikofaktoren (s.o.), gesunde Ernährung und lebenslanges kognitives Training das Demenzrisiko zu reduzieren (BAUMGART et al., 2015).

2.2. Neuropathologie und Molekularbiologie der Alzheimer-Krankheit

Neuropathologisch weist die Alzheimer-Krankheit verschiedene *mikroskopische* sowie *makroskopische Eigenschaften* auf: *Mikroskopisch* zeigen sich typische extrazelluläre Proteinablagerungen in Form von amyloiden Plaques und intraneuronale Fibrillen (*engl.: neurofibrillary tangles - NFT*) aus einer hyperphosphorylierten Form des Proteins Tau (BRION, 1998). Während die amyloiden Plaques erst im späteren Verlauf der Erkrankung auftreten, bilden sich die intraneuronalen Tau-Protein Einschlüsse bereits in der Anfangsphase (BRAAK et al., 2011; SCHÖNHEIT et al., 2004). Dabei breiten sich die Tau-Fibrillen über eine lange Zeitspanne in einem stereotypischen Muster aus, welches durch die Stadieneinteilung nach Braak genauer beschrieben wird: Es sind sechs Stadien zu

unterscheiden - I-II transentorhinales Stadium, III-IV limbisches Stadium, V-VI isokortikales Stadium (BRAAK, BRAAK, 1991). Vor dem Auftreten der ersten Tau-Fibrillen im transentorhinalen Kortex (Stadium I-II), zeigen sich in der „Pretangle-Phase“ erste Tau-Ablagerungen in den cholinergen Kerngebieten des basalen Vorderhirns, in den serotoninergen Kernen der oralen Raphegruppe und im noradrenergen Locus coeruleus (GRINBERG et al., 2009; GRUDZIEN et al., 2007; MESULAM et al., 2004). *Makroskopisch* sind gerade in den Stadien V-VI deutliche Atrophien der Hirnrinde in den frontotemporalen, sowie parietookzipitalen Hirnregionen zu erkennen (HOOGENRAAD, JANSEN, 1994; SCHOTT et al., 2005). Während die Stadien V-VI dem klinischen Bild eines Morbus Alzheimers entsprechen, zeigen Patienten im Stadium III meist keine Symptome (BRAAK et al., 2013).

Die amyloiden Plaques bestehen zum Großteil aus aggregiertem Amyloid- β (kurz A β) (GLENNER, WONG, 1984; MASTERS et al., 1985). Die Isolation und Sequenzierung des 4 kDa großen Peptids führte zu einem besseren Verständnis der Pathophysiologie der Erkrankung. Während A β_{40} die häufigste Variante des Peptids darstellt, kommt A β_{42} eine entscheidende pathophysiologische Bedeutung zu (HARDY, 1997; HOLCOMB et al., 1998). Durch die zwei zusätzlichen Aminosäuren des A β_{42} Isoleucin (AS 41) und Valin (AS 42) ist dieses Peptid deutlich hydrophober und zeigt eine erhöhte Aggregationsneigung (JARRETT et al., 1993). Dementsprechend stellt es die überwiegende A β -Spezies in den Amyloid-Plaques dar (IWATSUBO et al., 1994; TAMAOKA et al., 1995).

A β selbst entsteht durch sequentielle Proteolyse des APPs. APP gehört zu einer Familie von Typ-I Transmembranproteinen mit einem großen hydrophilen extrazellulären Amino (N)-Terminus, einer hydrophoben Transmembrandomäne und einem kurzen intrazellulären Carboxy (C)-Terminus (KANG et al., 1987; YOUNKIN, 1991).

2.3. Die APP-Prozessierung und A β -Degradation

2.3.1. Die nicht-amyloidogene Prozessierung

Bei der *nicht-amyloidogenen Prozessierung* wird die Bildung des A β -Peptids durch den Schnitt der α -Sekretase innerhalb der A β -Domäne verhindert (ESCH et al., 1990). Es kommt zur Freisetzung der N-terminalen Domäne in Form von sAPP α (*engl.: soluble α -secreted APP*), während der C-terminale Anteil in der Zellmembran verbleibt. Dieser Teil wird als α -CTF (*engl.: α -cleaved c-terminal fragment*) bezeichnet und kann im Folgenden weiter prozessiert werden. sAPP α werden einige neuroprotektive und kognitionsverbessernde Eigenschaften zugeschrieben und es könnte sogar der Mediator der physiologischen APP-

Funktion sein (MATTSON et al., 1999; MEZIANE et al., 1998; RING et al., 2007). Eine gesteigerte α -Sekretaseaktivität führt zu einer Plaque-Reduktion sowie Gedächtnisverbesserung, was sie als mögliches pharmakologisches Ziel identifiziert (POSTINA et al., 2004). Die katalytische Aktivität der α -Sekretase beruht auf Metalloproteasen (ADAM, *engl.: a disintegrin and metalloprotease*), einer Gruppe von integralen Transmembranproteinen vom Typ I. ADAM10 und ADAM17 (auch TACE – *engl.: TNF α converting enzyme*) werden als die Hauptvertreter der α -Sekretaseaktivität angesehen (ASAI et al., 2003; BUXBAUM et al., 1998), wobei ADAM10 das dominante und physiologisch relevante Enzym im Gehirn darstellt (KUHN et al., 2010). ADAM17 wird im ZNS, im Gegensatz zu ADAM10, hauptsächlich in Endothelien und Gliazellen exprimiert, wohingegen es in den meisten Neuronen fehlt (GODDARD et al., 2001).

2.3.2. Die amyloidogene Prozessierung

2.3.2.1. Die β -Sekretase

Der amyloidogene Prozessierungsweg wird durch den Schnitt der β -Sekretase (*engl.: β -site APP cleaving enzyme 1 - BACE1*) eingeleitet. Es entstehen das lösliche sAPP β (*engl.: soluble β -secreted APP*) und das membranständige β -CTF (*engl.: β -cleaved c-terminal fragment*). Im Gegensatz zum neuroprotektiven sAPP α , weist sAPP β u.a. pro-apoptische Eigenschaften auf (NIKOLAEV et al., 2009). BACE1, eine membrangebundene Aspartatprotease, gehört zur Pepsinfamilie, die am stärksten im Gehirn und dort in den Neuronen exprimiert wird (LIN et al., 2000; YAN et al., 1999; ZHAO et al., 1996). BACE1 weist ein azidisches pH-Optimum auf (HAASS et al., 1993; KNOPS et al., 1995). Daher ist die β -Sekretaseaktivität vorwiegend in Kompartimenten mit einem saurem pH-Wert, wie dem Golgi-Apparat, sekretorischen Vesikeln und den Endosomen zu finden (HUSSAIN et al., 1999; KOO, SQUAZZO, 1994; STEPHENS, AUSTEN, 1996; THINAKARAN et al., 1996), wo es zu einer Ko-Lokalisation mit APP kommt (HUSSAIN et al., 1999; KINOSHITA et al., 2003).

Als Schrittmacherenzym des amyloidogenen Prozessierungswegs präsentiert sich BACE1 als attraktives pharmakologisches Ziel. BACE1 knockout Mäuse sind lebensfähig und fruchtbar, was zunächst vermuten lässt, dass BACE1 keine entscheidende vitale Funktion zukommt (LUO et al., 2001; ROBERDS et al., 2001). Jedoch zeigten weitere Studien, dass BACE1 u.a. bei der nervalen Myelinisierung (HU et al., 2006; WILLEM et al., 2006), neuronalen Migration (BARÃO et al., 2015; HITT et al., 2012), Neuro- und Astrogenese (HU et al., 2013) sowie der Bildung von Muskelspindeln (CHERET et al., 2013) beteiligt ist. Während ältere BACE1-Inhibitoren aufgrund ihrer Molekülgröße schlecht die Blut-Hirn-Schranke

überwinden konnten (CITRON, 2002), zeigen verschiedene klinische Phase I und II Studien mit neuen Molekülen signifikante Effekte auf die zerebralen A β -Konzentrationen. Ein Nachweis ihrer klinischen Wirksamkeit ist jedoch aktuell noch ausstehend (HAWKES, 2017; KENNEDY et al., 2016; YAN, 2016).

2.3.2.2. Die γ -Sekretase

Die membranständigen Produkte des *nicht-amyloidogenen* und *amyloidogenen* Weges werden anschließend durch die γ -Sekretase geschnitten. Die γ -Sekretase ist ein multimerischer Komplex, der sich aus vier Untereinheiten zusammensetzt. Dazu gehören Presenilin 1 (PS1) oder Presenilin 2 (PS2), Anterior Pharynx Defective 1 Homolog a oder b (APH1 a oder b), Presenilin Enhancer 2 (PEN2) und Nicastrin (KIMBERLY, WOLFE, 2003). Nicastrin wird als möglicher Substratrezeptor diskutiert und ist zusätzlich für die Reifung des Komplexes wichtig (CHÁVEZ-GUTIÉRREZ et al., 2008; SHAH et al., 2005). PS1 und PS2 sind Aspartylpeptidasen und stellen das katalytische Zentrum des γ -Sekretase-Komplexes dar (DE STROOPER et al., 1999; DE STROOPER et al., 1998). Dieser sitzt ebenfalls in der Zellmembran und schneidet dort die C-terminalen Reste, α - und β -CTF, innerhalb ihrer Transmembrandomäne (GRZIWA et al., 2003). Der Schnitt des α -CTFs führt zum Freisetzen von p3, wohingegen beim Schnitt des β -CTFs A β gebildet wird. Neben p3 und A β entsteht in beiden Fällen AICD (*engl.: amyloid precursor protein intracellular domain*), das in das Zytosol freigesetzt und als transkriptionell aktiv angesehen wird (CAO, SÜDHOF, 2001).

2.3.3. Die A β -Degradation

Die A β -Elimination spielt neben der A β -Produktion eine äußerst wichtige Rolle in der Pathophysiologie der sporadischen Form der Alzheimer-Krankheit. Gesunde Individuen weisen einen sehr schnellen A β -Gesamtumsatz auf. Bateman *et al.* zeigten, dass bei gesunden Probanden pro Stunde zwischen 7-8% der löslichen A β -Gesamtmenge produziert und degradiert werden (BATEMAN et al., 2006). Bei Patienten mit der sporadischen Form der Alzheimer-Krankheit hingegen ist die A β -Elimination im Vergleich zu gesunden Individuen um bis zu 30% reduziert (MAWUENYEGA et al., 2010). Dies führt zu einem Ungleichgewicht zwischen Produktion und Degradation.

Zu den A β -degradierenden Enzymen zählen u.a. Mitglieder der Zink Metallo-Endopeptidase Familie. Zu ihnen gehören neben Neprilysin (*NEP*), die Endothelin-konvertierenden Enzyme 1 und 2 (*engl.: endothelin-converting enzymes - ECE-1 und ECE-2*) (ECKMAN et al., 2006; ECKMAN et al., 2001; ECKMAN et al., 2003), das Insulin-degradierende Enzym (*engl.:*

insulin-degrading enzyme - IDE) und das Angiotensin-konvertierende Enzym (*engl.: angiotensin-converting enzyme* - ACE) (HU et al., 2001; ZOU et al., 2007). Des Weiteren werden den Matrix-Metalloproteinasen 2 und 9 (*engl.: matrix metalloproteinases – MMP-2 und -9*) (YAN et al., 2006; YIN et al., 2006), der Serinprotease Plasmin (LEDESMA et al., 2000; TUCKER et al., 2000) und der lysosomalen Cysteinprotease Cathepsin B (HOOK et al., 2010; MUELLER-STEINER et al., 2006) A β -degradierende Eigenschaften zugeschrieben. Im Verlauf der hier vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass Vitamin D Einfluss auf NEP und IDE hat. Diesen wird zusätzlich eine besondere Bedeutung bei der A β -Degradation zugeschrieben (s.u.). Daher soll im Folgenden genauer auf diese Enzyme eingegangen werden.

Neprilysin wird als eines der wichtigsten A β -degradierenden Enzyme im Gehirn angesehen. NEP zeigt unter *in vitro* Bedingungen eine sehr effektive A β -Beseitigung (SHIROTANI et al., 2001). Eine Überexpression von NEP in AD-Mausmodellen führt zu einer deutlichen Reduktion des zerebralen A β -Gehalts, der Plaque-Bildung und zu einer verlängerten Lebenserwartung (IWATA et al., 2013; LEISSRING et al., 2003), wohingegen eine Inaktivierung zu einem signifikanten Anstieg der A β -Menge sowie der A β -Oligomere und einer gestörten synaptischen Plastizität führt (HUANG et al., 2006; MADANI et al., 2006). Interessanterweise nimmt der Neprilysinproteingehalt im zerebralen Kortex sowie dem Hippocampus mit zunehmendem Alter ab (IWATA et al., 2002; PARDOSSI-PIQUARD et al., 2005). Des Weiteren sind NEP mRNA und Proteinspiegel bei Alzheimer-Patienten im Vergleich zu altersentsprechenden Kontrollpatienten erniedrigt (RUSSO et al., 2005; YASOJIMA et al., 2001). Folglich könnte eine frühe Aktivierung der Neprilysin-Expression im Krankheitsverlauf die A β -Pathologie und damit assoziierte kognitive Einschränkungen verzögern (EL-AMOURI et al., 2008). Die Neprilysin-Transkription wird u.a. über AICD reguliert (BELYAEV et al., 2010; BELYAEV et al., 2009; GRIMM et al., 2015; PARDOSSI-PIQUARD et al., 2005), sodass die APP-Prozessierung in engem Zusammenhang mit der A β -Degradation steht.

IDE ist ein weiteres wichtiges A β -Degradationsenzym. Neben seiner A β -degradierenden Eigenschaft *in vitro* (CHESNEAU et al., 2000), hat es einen Einfluss auf die A β -Degradation *in vivo* (FARRIS et al., 2003; LEISSRING et al., 2003; MILLER et al., 2003). Seine Gen-Inaktivierung führt zu einer signifikanten Erhöhung der endogenen A β -Spiegel (LEISSRING et al., 2003). IDE ist zum einen in den Mitochondrien lokalisiert, wo auch A β nachgewiesen werden konnte (LEISSRING et al., 2004). Zum anderen erfolgt die Sekretion des Proteins nach extrazellulär (BULLOJ et al., 2010; ZHAO et al., 2009). Folglich hat IDE sowohl

Einfluss auf den intra- als auch extrazellulären A β -Pool. Neben Insulin und A β spaltet IDE u.a. auch das zytosolische AICD, für das es das Hauptdegradationsenzym darstellt (EDBAUER et al., 2002). Auch die zerebralen IDE-Proteinspiegel nehmen signifikant mit zunehmendem Alter ab (COOK et al., 2003) und zeigen sich ebenfalls bei AD-Patienten reduziert (COSTA et al., 2017). Hierbei scheinen vor allem Hirnregionen betroffen zu sein, welche einer vermehrte A β -Pathologie aufweisen (CACCAMO et al., 2005). Daher erscheint auch hier eine therapeutische Gegenregulation sinnvoll.

2.4. Der Vitamin D-Metabolismus

Vitamin D gehört zu der Gruppe der Secosteroide, welche sich von den Steroiden und somit vom Cholesterin ableiten. Im menschlichen Körper erfüllt Vitamin D die Rolle eines Hormons, wobei diese Aufgabe hauptsächlich durch seine aktive Form Calcitriol (1,25(OH)₂D₃) vermittelt wird. Vitamin D₂ (*Ergocalciferol*) und D₃ (*Cholecalciferol*) sind die Hauptvertreter der Vitamin D-Gruppe. Während Vitamin D₂ photochemisch in Pflanzen und Pilzen gebildet wird, wird Vitamin D₃ vorwiegend in der Haut synthetisiert. Des Weiteren kann Vitamin D₃ durch den Verzehr von fettreichem Fisch in den Körper aufgenommen werden. Die Aufnahme über die Nahrung macht jedoch nur den geringsten Teil aus. Es wird geschätzt, dass rund 90% des Vitamin D endogen in der Haut gebildet wird (NORVAL, WULF, 2009; REICHRATH, 2009). Nach der Aufnahme werden beide Formen in gleicher Weise metabolisiert (HOLICK, 2007; LANDEL et al., 2016a). Dies wird in Abbildung 1 dargestellt.

Durch UVB Einstrahlung (*Wellenlänge 290-315 nm*) kommt es zu einer photolytischen Umwandlung von *7-Dehydrocholesterin* in *Prävitamin D₃*. Anschließend erfolgt durch thermale Isomerisierung die Bildung von *Vitamin D₃* (HOLICK et al., 1977; OKANO et al., 1977). Das lipophile *Vitamin D₃* gelangt in den Blutkreislauf und wird dort an Plasmaproteine gebunden, wobei das Vitamin D-bindende Protein (*engl.: vitamin D binding protein – DBP*) die wichtigste Rolle spielt. Es kann neben Vitamin D auch alle anderen Vitamin D-Metabolite binden, diese jedoch mit unterschiedlichen Affinitäten ($25(OH)D_3 = 24,25(OH)_2D_3 > 1,25(OH)_2D_3 > \text{Vitamin } D_3$). Ein kleinerer Anteil bindet an Albumin und Lipoproteine (COOKE, HADDAD, 1989). 99,9% des zirkulierenden 25(OH)D₃s sind letztlich an DBP gebunden, was zu einer verlängerten Halbwertszeit führt (CHUN et al., 2014).

Durch Hydroxylierung des Kohlenstoffatoms an Position 25 kommt es zur Umwandlung von *Vitamin D₃* in *Calcidiol (25(OH)D₃)*. Die Reaktion wird durch die *25-Hydroxylase (CYP2R1 und CYP27A1)* katalysiert und findet hauptsächlich in der Leber statt (CHENG et al., 2003).

Da dieses Enzym kaum reguliert wird, steigt die 25(OH)D₃ Konzentration proportional mit der endogenen Synthese/exogenen Zufuhr an und gilt daher als wichtiger klinischer Indikator für den Vitamin D-Status einer Person (DUSSO et al., 2005). Aus diesem Grund und aufgrund der längeren Halbwertszeit (s.o.) von Calcidiol im Vergleich zu den anderen Metaboliten wurde in dieser Arbeit 25(OH)D₃ in der Zellkultur verwendet.

Der zweite Umwandlungsschritt von 25(OH)D₃ in das biologisch aktive *Calcitriol* (1,25(OH)₂D₃) findet vorwiegend im proximalen Tubulus der Niere statt (FRASER, KODICEK, 1970). Jedoch exprimieren auch weitere Zellen die notwendige *1 α -Hydroxylase* (*CYP27B1*), wodurch das aktive Calcitriol auch lokal in verschiedenen Geweben gebildet werden kann (ZEHNDER et al., 2001). Im Gegensatz zu *25-Hydroxylase* steht die *1 α -Hydroxylase* unter starker Regulation, da diese durch die Bildung von *Calcitriol* maßgeblich an der Calciumhomöostase des Körpers beteiligt ist. Sie wird unter anderem durch den Blutcalciumspiegel und das Parathormon (PTH) reguliert (BRENZA et al., 1998; OMDAHL et al., 1972).

Die biologische Wirkung von *Calcitriol* wird durch den *Vitamin D-Rezeptor* (VDR) vermittelt. Dieser gehört zur Superfamilie der *nukleären Rezeptoren für Steroidhormone* (MOORE et al., 2006). Er vermittelt seine Wirkung als Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor. Neben Calcitriol kann auch Calcidiol den Rezeptor aktivieren, dies jedoch 100mal schwächer (BROWN et al., 1999). Nach Bindung von Calcitriol kommt es zur Heterodimerisierung des VDR mit dem *Retinoid X-Rezeptor* (RXR). Der Komplex wandert in den Zellkern und bindet dort an das *Vitamin D-Response Element* (VDREs) in der Promoterregion der Calcitriol-abhängigen Gene. Bemerkenswerterweise werden die intrazellulären VDR-Spiegel eigenständig durch VDR-Liganden reguliert (COSTA, FELDMAN, 1986). Durch Calcitriol kommt es zu einer Expressionssteigerung und zusätzlich zu einer Liganden-abhängigen Stabilisierung des Vitamin D-Rezeptors (ARBOUR et al., 1993).

Um Calcitriol zu inaktivieren, exprimieren die meisten Zielzellen die *24-Hydroxylase* (*CYP24A1*), welche invers zur *1 α -Hydroxylase* reguliert wird. Calcitriol selbst stimuliert die Expression der *24-Hydroxylase* (OMDAHL et al., 2002). Diese Schutzfunktion vor einer „lokalen Hypervitaminose D“ wird durch die „Pufferfunktion“ des DBP ergänzt, da nur freie, nicht gebundene Metabolite biologisch aktiv sind (DUSSO et al., 2005).

2. Einleitung

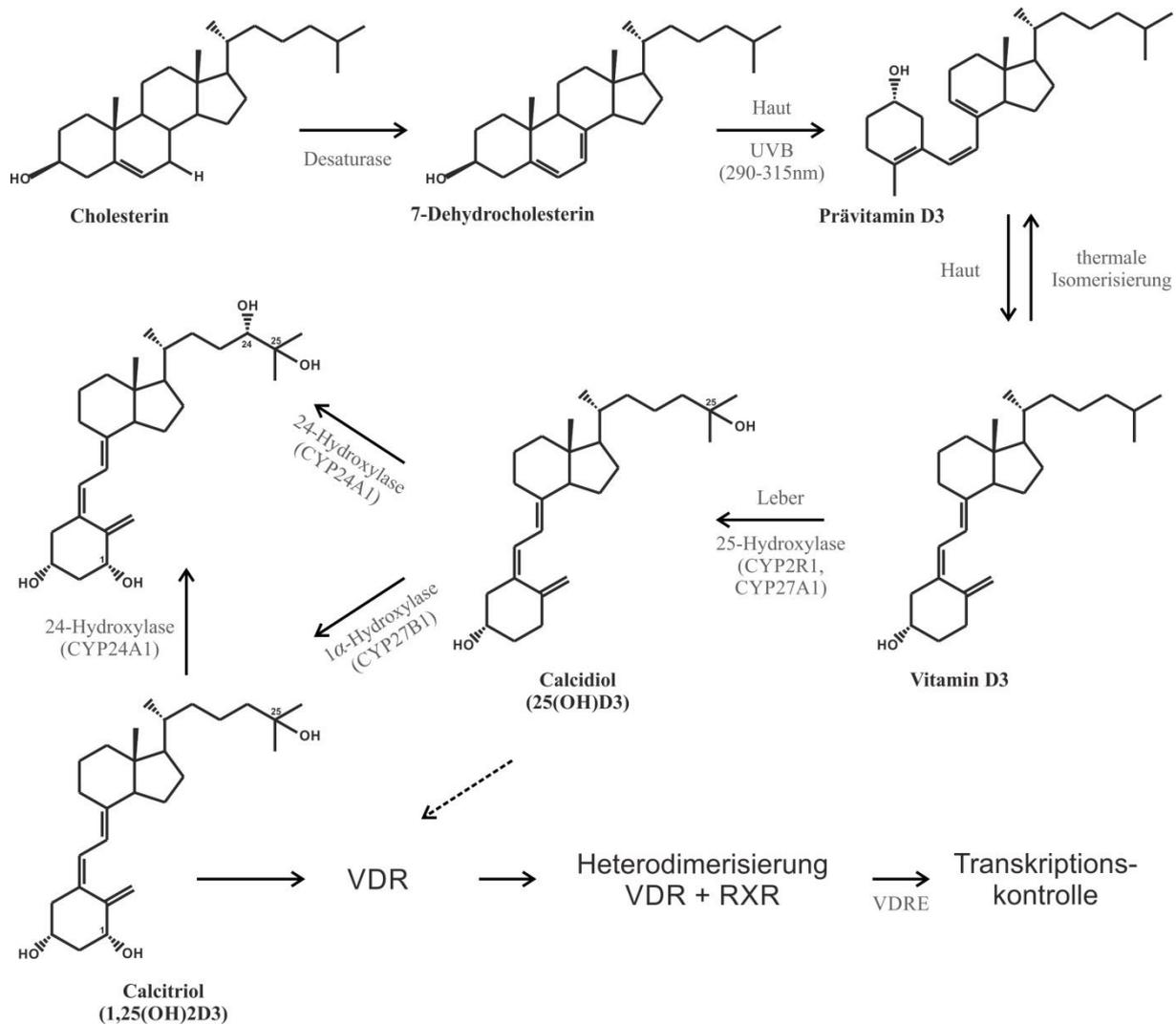


Abbildung 1 - Schematische Darstellung der Vitamin D-Biosynthese (verändert nach DUSSO, 2005)

Durch Desaturasen erfolgt die Bildung von 7-Dehydrocholesterin aus Cholesterin. Dieses wird in der Haut durch UVB Strahlung (Wellenlänge 290-315 nm) zunächst in Prävitamin D3, im Folgenden durch thermale Isomerisierung zu Vitamin D3 umgewandelt. Das lipophile Molekül gelangt in den Blutkreislauf, wo es vorwiegend an das Vitamin D-bindende Protein (DBP) gebunden ist. Durch die 25-Hydroxylase (CYP2R1, CYP27A1) erfolgt die Umwandlung in 25(OH)D3 in Leber. Der zweite Umwandlungsschritt in das biologisch aktive 1,25(OH)2D3 findet vorwiegend im proximalen Tubulus der Niere statt. Nach Binden von Calcitriol (oder Calcidiol mit niedriger Affinität) an den VDR kommt es zur Heterodimerisierung des VDRs mit dem Retinoid X Rezeptor (RXR). Der Komplex reguliert über das Vitamin D-Response Element (VDRE) die Transkription Vitamin D-abhängiger Gene. Eine Inaktivierung von Calcidiol und Calcitriol erfolgt über die 24-Hydroxylase.

2.5. Vitamin D und das Gehirn

Alle Vitamin D-Spezies sind in der Lage die Blut-Hirn-Schranke zu passieren (PARDRIDGE et al., 1985) und können entsprechend im menschlichen Liquor nachgewiesen werden (BALABANOVA et al., 1984). Dies stellt eine wichtige Grundvoraussetzung des „zerebralen Vitamin D-Metabolismus“ dar. Des Weiteren werden *CYP27A1* und die *1α-Hydroxylase (CYP27B1)* in Ratten- und Menschen-Gehirnen exprimiert (LANDEL et al., 2017;

ZEHNDER et al., 2001). Aktivierte Mikrogliazellen können $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ synthetisieren und umgekehrt mit Hilfe des *CYP24A1* wieder inaktivieren. Folglich kann die lokale Verfügbarkeit der aktiven Vitamin D-Metabolite im Gehirn unabhängig reguliert werden (NAVEILHAN et al., 1993; NEVEU et al., 1994).

Der VDR kann ebenfalls in weiten Teilen des Ratten- und Menschen-Gehirns, dort v.a. in Neuronen, Gliazellen und Astrozyten, detektiert werden (CLEMENS et al., 1988; EYLES et al., 2005; LANDEL et al., 2017; PRÜFER et al., 1999). Interessanterweise wird der VDR besonders stark in Regionen des Hippocampus exprimiert (WALBERT et al., 2001). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass hippocampale Zellexplantate, die mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ behandelt wurden ein erhöhtes Neuritenwachstum aufwiesen (BROWN et al., 2003; MARINI et al., 2010). *In vivo* führte die Behandlung von Ratten mit Calcitriol zu einer verminderten Atrophie und zu einer erhöhten neuronalen Dichte im Hippocampus (LANDFIELD, CADWALLADER-NEAL, 1998). Die Expression des VDR wird schon zu einem frühen Zeitpunkt der *Gehirnentwicklung* nachgewiesen (CUI et al., 2007; VEENSTRA et al., 1998). Passend dazu ist Calcitriol essentiell für die neuronale Proliferation und Differenzierung (BANERJEE, CHATTERJEE, 2003; DUSSO et al., 2005; GUMIREDDY et al., 2003).

Vitamin D nimmt auch bei *Inflammationsreaktionen* und der *Neuroprotektion* eine wichtige Rolle ein. Vitamin D reduziert geirneigene Inflammationsreaktionen (MIZWICKI et al., 2013) und führt zu einer Reduktion der Glutamat-induzierten Neurotoxizität in kultivierten kortikalen und hippocampalen Neuronen (BREWER et al., 2001; TANIURA et al., 2006). Zusätzlich ist Vitamin D in der Lage zelleigene Antioxidans-Systeme zu aktivieren um somit einem ROS induzierten Zelltod entgegen zu wirken (IBI et al., 2001).

Zusammengefasst gibt es zahlreiche Überschneidungen zwischen den physiologischen Aufgabenbereichen des Vitamin D-Metabolismus und der Pathophysiologie der Alzheimer-Krankheit, wie beispielsweise *Inflammationsreaktionen*, *oxidativer Stress* und *Neurotoxizität* (BUTTERFIELD et al., 2001; HENEKA et al., 2015; MARKESBERY, 1997). Dies lässt einen möglichen Einfluss des Secosteroids auf den Verlauf der Erkrankung vermuten.

2.6. Der Vitamin D-Metabolismus, Vitamin D-Mangel und die Alzheimer-Krankheit

Vitamin D-Mangel stellt ein weit verbreitetes Problem dar. Es wird geschätzt, dass zwischen 40-100% der älteren Menschen in den USA und Europa einen Vitamin D Mangel aufweisen (HOLICK, 2007). Gerade in den nördlichen Ländern mit wenig Sonneneinstrahlung können sich diese Mangelzustände während den Wintermonaten aggravierend, da die Syntheseleistung

der Haut durch verminderte UVB-Einstrahlung nachlässt (EDVARDBSEN et al., 2007; WEBB et al., 1988). Entsprechend zeigt eine Studie aus Deutschland, dass lediglich 16,1% der Studienteilnehmer im August einen schweren Vitamin D-Mangel aufwiesen, während die Rate im März auf 78,8% anstieg (KLENK et al., 2013). Gerade ältere Menschen haben ein erhöhtes Risiko einen Vitamin D-Mangelzustand zu entwickeln. Dies begründet sich einerseits auf einer geringeren Sonnenlichtexposition und andererseits auf einer verminderten Kapazität der Haut Vitamin D zu bilden (GLOTH et al., 1995; MACLAUGHLIN, HOLICK, 1985). Als Parameter für den Vitamin D-Status eines Patienten dient die 25(OH)D₃ Konzentration im Serum. Diese wird standardmäßig in *ng/ml* oder in *nmol/l* angegeben. Konzentrationen von < 20 ng/ml (50 nmol/l) werden als *Mangel* und Werte zwischen 21– 29 ng/ml (52,5 nmol/l – 72,5 nmol/l) als *insuffiziente Vitamin D-Versorgung* angesehen. Als *ausreichend* gelten Serumkonzentrationen > 30 ng/ml (75 nmol/l). Toxische Effekte werden ab einer Serumkonzentration von 150 ng/ml (374 nmol/l) beobachtet (HOLICK, 2007; HOLICK et al., 2011; ROSEN, 2011). Die westliche Ernährungsweise schützt aufgrund ihres niedrigen Vitamin D-Gehalts nicht vor einem Vitamin D-Mangel. Erwähnenswerterweise enthalten Nahrungsmittel, die hohe Konzentrationen an Vitamin D₃ aufweisen, wie fettreiche Fischarten, zusätzlich Stoffe, die sich positiv auf die Alzheimer-Pathogenese auswirken. DHA (*Docosahexaensäure*), eine Omega-3-Fettsäure, hat beispielsweise deutlichen Einfluss auf die A β -Pathologie durch Beeinflussung der A β -Produktion und -Degradation (GRIMM et al., 2011; GRIMM et al., 2013a; GRIMM et al., 2016b).

Wie in Kapitel 2.5. dargestellt, kommt Vitamin D eine physiologische und protektive Rolle im zentralen Nervensystem zu. Somit stellen sich die Fragen, welchen Einfluss der Vitamin D Status auf die kognitive Leistungsfähigkeit hat und ob ein Vitamin D-Mangel das Auftreten bzw. Fortschreiten dementieller Erkrankungen beeinflussen kann?

Epidemiologische Untersuchungen legen diesbezüglich eine Assoziation zwischen einer Vitamin D-Mangelversorgung und dem Auftreten kognitiver Beeinträchtigungen nahe. Etgen *et al.* zeigten in einer Metaanalyse von fünf Querschnitts- und zwei Längsschnittstudien mit insgesamt 7688 Teilnehmern, dass ein Vitamin D-Mangel mit einem mehr als doppelt so hohen Risiko verbunden ist kognitive Funktionseinschränkungen aufzuweisen (ETGEN et al., 2012). Auch eine weitere Metaanalyse von insgesamt 28 Studien (25 Querschnitts- und drei prospektive Studien) ergab, dass 72% der Studien einen niedrigen 25(OH)D₃ Spiegel mit einem schlechteren Ergebnis in verschiedenen kognitiven Tests in Zusammenhang brachten (VAN DER SCHAFT et al., 2013). Llewellyn *et al.* zeigten, dass das Risiko mit zunehmender Mangelsituation steigt (LLEWELLYN et al., 2011).

In Zusammenschau dieser Ergebnisse und unter Berücksichtigung der Beobachtung erniedrigter 25(OH)D₃ Konzentrationen bei Alzheimer-Patienten (BALION et al., 2012; EVATT et al., 2008; SATO et al., 1998), liegt es nahe, dass ein Vitamin D-Mangel neben der allgemeinen Beeinflussung kognitiver Funktionen, ebenfalls Einfluss auf die Entwicklung der Alzheimer-Krankheit haben könnte. Balion *et. al* zeigten diesbezüglich in einer Metaanalyse, dass ein Vitamin D-Mangel mit einem erhöhten Alzheimer-Risiko verbunden ist. Alzheimer-Patienten wiesen dabei einen um 6,2 nmol/l geringeren Vitamin D-Spiegel auf als die Kontrollgruppe (BALION et al., 2012). Auch neuere Studien bestätigten die Verbindung eines erniedrigten 25(OH)D₃ Plasmaspiegels mit dem Auftreten einer Alzheimer-Demenz (AFZAL et al., 2013; LITTLEJOHNS et al., 2014; MOKRY et al., 2016). Trotz der insgesamt eher positiven Studienlage gibt es jedoch auch weitere Untersuchungen, die keinen Zusammenhang zwischen dem Vitamin D-Status und dem Auftreten kognitiver Funktionseinschränkungen oder der Alzheimer Krankheit nachweisen konnten (CHAN et al., 2011; MCGRATH et al., 2007; OLSSON et al., 2017; TOLPPANEN et al., 2011; ULSTEIN, BØHMER, 2016).

Auch *genetische Untersuchungen* deuten auf einen Zusammenhang zwischen dem Vitamin D-Metabolismus und der Alzheimer-Krankheit hin. Eine GWAS-Studie zeigte eine mögliche Verbindung zwischen dem Vitamin D-Rezeptor Gen und der sporadischen Form der Alzheimer-Erkrankung (BEECHAM et al., 2009). Mehrere folgende Untersuchungen bestärkten diese Beobachtung. Neben dem Einfluss auf die kognitive Funktion (BEYDOUN et al., 2012; KUNINGAS et al., 2009), assoziierten die Studien verschiedene VDR-Polymorphismen mit einem erhöhten Alzheimer-Risiko (GEZEN-AK et al., 2012; LEE et al., 2014; LEHMANN et al., 2011). Auch gewisse Einzelnukleotid-Polymorphismen im VDR-Gen scheinen die AD Entstehung zu begünstigen (GEZEN-AK et al., 2007). Interessanterweise konnte in einer der Studien eine mögliche Einwirkung der VDR Polymorphismen auf AD-relevante Inflammationsgene (Interleukin-10; Dopamin-β-Hydroxylase) nachgewiesen werden (LEHMANN et al., 2011). Des Weiteren hat der VDR Einfluss auf die APP-Expression und somit auf die APP-Prozessierung: Wang *et. al* zeigten, dass eine VDR-Überexpression in Neuroblastomzellen, genauso wie die Behandlung der Zellen mit Vitamin D, zu einer verminderten APP-Transkription führt (WANG et al., 2012). Gezen-Ak *et. al* demonstrierten in einer aktuellen Studie, dass die Inkubation von Neuronen mit VDR-siRNA (*engl.: small interfering RNA*) zu einer signifikanten Änderung der Expression und Proteinspiegel aller Sekretasen führt (GEZEN-AK et al., 2017).

Molekularbiologische Untersuchungen bestärken ebenfalls einen Zusammenhang zwischen

der Alzheimer-Pathologie und dem Vitamin D-Metabolismus: Unter Zellkulturbedingungen führt A β zu einer drastischen Reduktion der VDR-Expression, was im Folgenden einen negativen Einfluss auf die A β -Zytotoxizität sowie die Apoptose und Calciumhomöostase der Zellen hat. Die Behandlung der Zellen mit Vitamin D führt im Gegenzug zu einer verstärkten VDR-Expression und zur Protektion der Neurone (DURSUN et al., 2011). Zusätzlich verhindert eine VDR-Expressionssteigerung durch Vitamin D-Supplementierung A β -induzierten oxidativen Stress in kortikalen Neuronen (DURSUN et al., 2013a). Erwähnenswerter Weise bewirkt A β in hippocampalen Neuronen neben der VDR-Expressionsreduktion auch eine 24-Hydroxylase-Expressionssteigerung und bedingt somit eine mangelhafte Verwertung der Vitamin-D-Metabolite (DURSUN et al., 2013b). Unter physiologischen Bedingungen ist dabei die Expression des VDR und der 24-Hydroxylase in hippocampalen Neuronen im Vergleich zu Kortikalneuronen erhöht, was eventuell Ausdruck eines höheren Vitamin D-Bedarfs dieser Zellen ist (GEZEN-AK et al., 2013). Passend führt eine Vitamin D-Supplementierung in hippocampalen Neuronen Vitamin D-defizienter Ratten zur Wiederherstellung der synaptischen Plastizität (TAGHIZADEH et al., 2013).

Eine mögliche Erklärung für die oben genannte Vitamin D-abhängige Neuroprotektion liefern neuere Studien. Pierucci *et al.* zeigten, dass Calcitriol die A β -abhängige Zytotoxizität *in vitro* und *in vivo* durch Beeinflussung des Sphingosin-1-phosphat (S1P)-Singalwegs reduzieren kann. A β führt zu einem niedrigen S1P/Ceramid-Verhältnis, welches mit Arrest des Zellwachstums und Zelltod assoziiert ist (CUVILLIER et al., 1996), wohingegen Calcitriol diesem Effekt entgegenwirkt (PIERUCCI et al., 2017). Des Weiteren scheint Calcitriol dem A β -induzierten ER-Stress, welcher mit der Alzheimer-Pathogenese in Verbindung gebracht wird und selbst die A β -Produktion steigert, entgegenzuwirken (CHENG et al., 2016).

Während diese Studien hauptsächlich den Einfluss von A β auf den Vitamin D-Metabolismus widerspiegeln, beeinflusst dieser im Gegenzug die A β -Pathologie: Aufgereinigtes DBP interagiert mit A β und führt zu einer Reduktion der A β -Aggregation *in vitro*. Zusätzlich vermindert es den A β -vermittelten Zelltod und synaptischen Verlust hippocampaler Mausneurone (MOON et al., 2013). Des Weiteren ist Calcitriol in der Lage Makrophagen über den VDR zu stimulieren und führt dadurch zu einer Steigerung der A β -Phagozytose (MASOUMI et al., 2009). Entsprechendes wurde bei Makrophagen von Alzheimer-Patienten beobachtet (MIZWICKI et al., 2013). Zusätzlich stimuliert 1,25(OH) $_2$ D $_3$ den A β -Transport über die Blut-Hirn-Schranke (ITO et al., 2011). Die VDR mRNA kann in Maushirnkapillaren detektiert werden (ITO et al., 2011) und eine Behandlung von Ratten- bzw. Menschen-Mikrogefäßendothelzellen führt zu einer Expressions- sowie Aktivitätssteigerung des P-

Glykoproteins, zu dessen Substraten auch A β gehört (DURK et al., 2012). Auch im transgenen Mausmodell führt Calcitriol zu einer signifikanten Steigerung der p-Glykoproteinaktivität und folglich zu einer Reduktion des löslichen und unlöslichen, plaqueassoziierten A β s (DURK et al., 2014). Guo *et al.* zeigten in einer neueren Studie, dass Calcitriol zusätzlich *in vitro* und *in vivo* zu einer Expressionssteigerung von LRP1 (engl.: *low density lipoprotein receptor-related protein 1*) führt. LRP1 ist ebenfalls maßgeblich an der zerebralen und systemischen A β -Beseitigung beteiligt und zeigt sich bei Alzheimer-Patienten erniedrigt (GUO et al., 2016). Passend zu diesen Untersuchungen konnten in einer randomisierten, kontrollierten Pilotstudie signifikant erhöhte A β ₄₀-Plasmaspiegel nach achtwöchiger Vitamin D-Supplementierung von Vitamin D unterversorgten Probanden im Vergleich zum Ausgangspunkt beobachtet werden (MILLER et al., 2016).

Weitere Erkenntnisse stammen aus Tierstudien. Vitamin D-mangelversorgte Tiere weisen kognitive Leistungsstörungen auf (BRIONES, DARWISH, 2012; LANDEL et al., 2016b; TAGHIZADEH et al., 2011; YU et al., 2011). Yu *et al.* fütterten APP transgene Mäuse über fünf Monate mit einem Kontroll-, Vitamin D-mangel oder einem Vitamin D-angereicherten Futter und detektierten nach diesem Zeitraum signifikante Effekte auf die A β -Pathologie und Neuroinflammation. Die Vitamin D-supplementierten Mäuse zeigten im Vergleich zu den anderen Gruppen eine signifikante A β ₄₀- und A β ₄₂-Reduktion sowie eine Verminderung der Amyloid-Plaque Anzahl und Größe (YU et al., 2011). Ähnliches beschrieben Landel *et al.* in drei verschiedenen Hirnregionen (frontaler Kortex, Hippocampus, Neokortex) transgener Mäuse (LANDEL et al., 2016b). Zusätzlich waren bei Yu *et al.* die β -CTF- und sAPP α -Spiegel signifikant geändert, was einen Einfluss der Fütterung auf die APP-Prozessierung nahelegte. Auch TNF- α , als Marker für die zerebrale Inflammation, war deutlich erniedrigt, während der neurotrophe NGF signifikant erhöht war (YU et al., 2011). Briones und Darwish injizierten älteren Ratten über 21 Tage Calcitriol subkutan. Auch sie beschrieben eine Reduktion der A β -Oligomere. Zusätzlich beeinflusste Vitamin D das Gleichgewicht zwischen dem pro-inflammatorischen IL-1 β und anti-inflammatorischen IL-10 positiv (BRIONES, DARWISH, 2012). In Bezug auf die anti-inflammatorischen Eigenschaften von Vitamin D zeigte Raha *et al.* in einer neueren Studie, dass das natürlich vorkommende Vitamin D₂ die A β -induzierte Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine (IL-1 β , IL-6, TNF- α) durch Hemmung des NF- κ B-Signalwegs reduzieren kann (RAHA et al., 2016). Des Weiteren führt Calcitriol in neuronalen SH-SY5Y-Zellen zu einer gesteigerten Expression an IL-34, welchem ebenfalls neuroprotektive Eigenschaften zugeschrieben werden (MA et al., 2012; MIZUNO et

al., 2011; ZHANG et al., 2017).

Abbildung 2 fasst die oben aufgeführten Zusammenhänge nochmals zusammen.

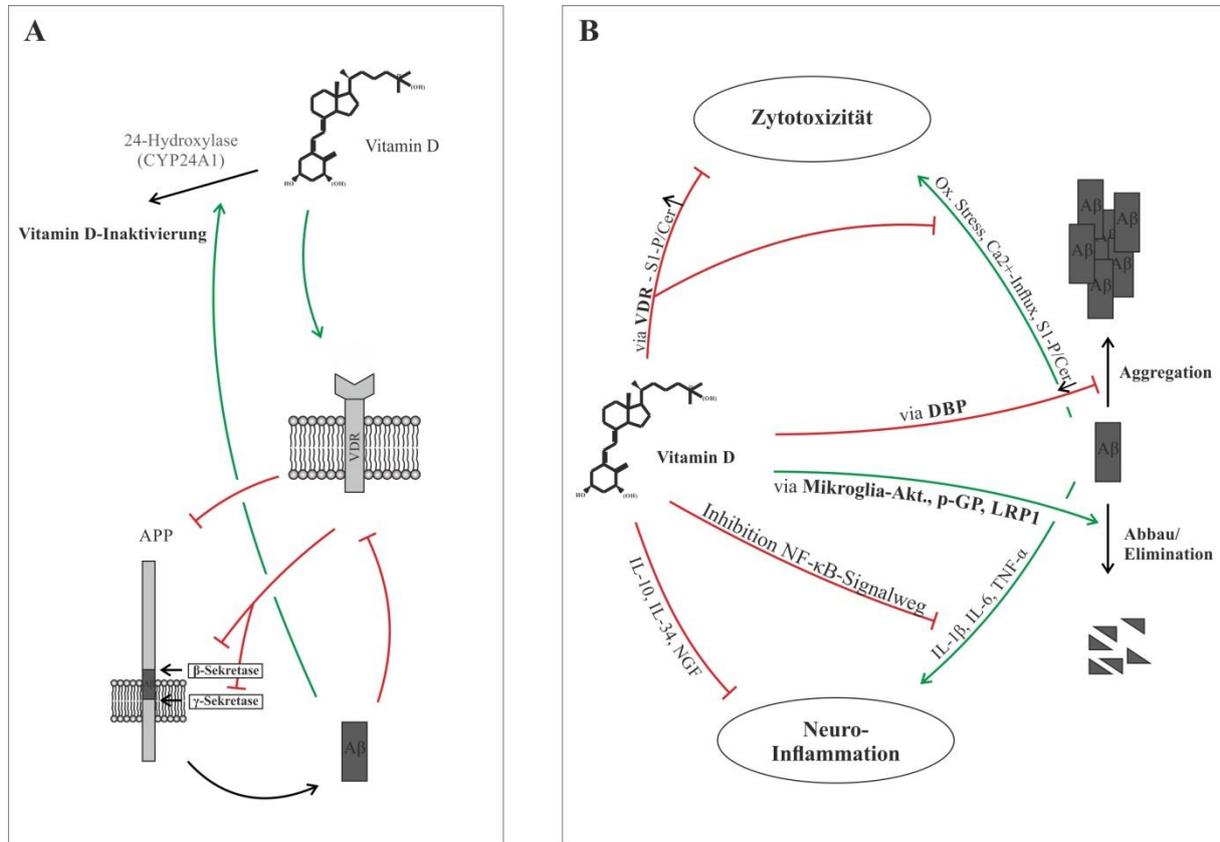


Abbildung 2 – Graphische Zusammenfassung der gegenseitigen Beeinflussung des Vitamin D-Metabolismus und der Aβ-Pathologie

A zeigt die gegenseitige Beeinflussung der jeweiligen Stoffwechselwege – Vitamin D induziert die Expression des VDRs und bedingt hierdurch u.a. eine Reduktion der APP-, β - und γ -Sekretase-Expression. A β hingegen führt zu einer VDR-Expressionsreduktion und induziert gleichzeitig die 24-Hydroxylase, welches zu einer Vitamin D-Inaktivierung führt. **B** zeigt den Einfluss von Vitamin D auf A β und die durch A β induzierten pathophysiologischen Abläufe – DBP interagiert mit A β und inhibiert dessen Aggregation. Des Weiteren aktiviert Vitamin D die A β -Phagozytose und führt über eine Aktivitätssteigerung des p-Glykoproteins (p-GP) und des LRP1 zu einer gesteigerten zerebralen A β -Elimination. Zusätzlich bedingt Vitamin D eine Reduktion der A β induzierten (*Neuro*-)Inflammation via Inhibition des NF- κ B-Signalwegs. Gleichzeitig induziert es die Freisetzung anti-inflammatorischer Zytokine (IL-10, IL-34). Die A β -abhängige Zytotoxizität ist u.a. auf eine Erhöhung des oxidativen Stresses, Beeinflussung des Calciumhaushalts und das Sphingosin-1-phosphat/Ceramid-Verhältnis zurückzuführen. Hier wirkt Vitamin D via Aktivierung des VDRs A β entgegen.

2.7. Fragestellung der Arbeit

Die Alzheimer-Krankheit ist eine neurodegenerative Erkrankung, welche mikroskopisch u.a. extrazelluläre Proteinablagerungen in Form von amyloiden Plaques aufweist. Diese bestehen zum großen Teil aus A β -Peptiden, welche aus der enzymatischen Prozessierung des Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP) durch die β - und γ -Sekretase entstehen. Zusätzlich beeinflusst die A β -Degradation die A β -Homöostase maßgeblich, wobei Neprilysin und IDE, neben anderen Proteasen, als die wichtigsten A β -degradierenden Enzyme angesehen werden. Vitamin D ist ein Secosteroid, welchem neben seiner klassischen Aufgabe in der Regulation des Calciumhaushaltes auch eine wichtige Rolle im zentralen Nervensystem zugeschrieben wird. Neuere epidemiologische Studien, wie auch genetische Untersuchungen, bringen in diesem Zusammenhang den Vitamin D-Metabolismus mit der Alzheimer-Krankheit in Verbindung.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es den Einfluss von Vitamin D auf die APP-Prozessierung bzw. die A β -Homöostase zu untersuchen. Hierbei wurde zwischen zwei verschiedenen Versuchsbedingungen unterschieden:

Zum einen wurde in einem *in vivo* Wildtyp-Mausmodell eine *milde bis moderate Vitamin D-Mangelsituation* generiert, wie sie typischerweise bei einem Großteil der Bevölkerung beobachtet wird. Dieses Modell sollte dazu beitragen die Frage zu klären, ob Patienten, die einen Vitamin D-Mangel aufweisen, durch eine Vitamin D-Substitution profitieren würden? Zum anderen wurden humane und murine Neuroblastomzellen (SH-SY5Y- und N2a-Zellen) in Anwesenheit von 25(OH)D₃ kultiviert. Es wurde zwischen einer Kurzzeit- und einer Langzeitinkubation unterschieden. Das verwendete Zellkulturmedium enthielt während dieser Zeit eine suffiziente Konzentration an FBS, sodass eine ausreichende Nährstoffversorgung inklusive Mikronährstoffen, wie den verschiedenen Vitamin D-Metaboliten, gewährleistet war. Durch die somit zusätzliche, *supraphysiologische Vitamin D-Supplementierung* sollte geklärt werden, ob Patienten, welche bereits eine ausreichende Vitamin D-Versorgung aufweisen durch eine weitere Substitution profitieren?

Unter diesen Versuchsbedingungen wurden jeweils die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen genauer herausgearbeitet mit Fokus auf den *A β -Anabolismus* und den *A β -Katabolismus*. Hierzu wurden jeweils die *Enzymaktivitäten*, die *Proteinspiegel* und die *Genexpressionen* bestimmt.

3. Material und Methoden

In der hier vorliegenden Arbeit wurden u.a. Methoden (s. ab Kap. 3.6) verwendet, die bereits im Labor etabliert waren. Um zum Ausdruck zu bringen, dass diese Etablierungsarbeit nicht durch den Autor dieser Arbeit durchgeführt wurde, sind unter den jeweiligen Kapitelüberschriften die Dissertationen/Publikationen/Protokolle angegeben, nach denen sich der Verfasser gerichtet hat. Teilweise wurden diese modifiziert. Modifikationen, welche im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, werden kurz angegeben und der jeweilige Grund dafür genannt. Alle Methoden wurden nach im Labor verwendetem Protokoll und Rücksprache mit PD Dr. Marcus Grimm durchgeführt.

3.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1 - Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Material/Chemikalien	Bezugsquelle
α -Sekretase-Substrat (#565767)	Calbiochem
β -Mercaptoethanol	Sigma
β -Sekretase-Inhibitor II (#565749)	Calbiochem
β -Sekretase-Substrat (#565758)	Calbiochem
γ -Sekretase-Inhibitor IV (#565788)	Calbiochem
γ -Sekretase-Substrat (#565764)	Calbiochem
25(OH)D3	Sigma
96-Loch-Platte (schwarz) für Fluoreszenz-Messung	Costar
96-Loch-Platte (transparent) für OD-Messung	Falcon
Bacitracin	Santacruz
BCA-Lösung	Sigma
Bromphenolblau Na-Salz	Serva
BSA (Fettsäure frei)	Sigma
CaCl ₂	Merck
Chloroform	Merck
Complete Proteaseinhibitor-Tabletten (\pm EDTA)	Roche Diagnostics
Cryo Tube Vials	nunc
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	J.T.Baker
DMEM	Sigma

DMSO	Sigma
ECL-Hyperfilm	Amersham
ECL-Lösung 1/2	Amersham
EDTA (Titriplex III)	Merck
ELISA 25-OH-Vitamin-D	Euroimmun
ELISA, Mouse A β ₄₀ , Mouse A β ₄₂	Invitrogen
Entwicklerlösung	Kodak
Ethanol	J.T.Baker
Falconröhrchen, 15 und 50ml	Sarstedt
FBS	PAN
Filterpapier	Whatman
Fluoreszierendes Peptid Substrat, Mca-RPPGFSAFK(Dnp)-OH	R&D Systems
Fotokopierfolien TypeC A4	XEROX
Glycerin	J.T.Baker
Glycin	AppliChem
HEPES, pH 7,4	Carl Roth
High Capacity cDNA RT Kit	Life Technologies
Hygromycin B	PAN
Isopropanol	J.T.Baker
Kanülen 10x 23Gx1¼ Nr.14 0,6mmx30mm 10x 27Gx¾ Nr.20 0,4mmx19mm 10x 29Gx½ 0,33mmx12,7mm	Becton Dickinson
KCl	Merck
KH ₂ PO ₄	Merck
L-Glutamin	Sigma
Lipofectamin TM 2000	Invitrogen
MaxiSorp®96-Loch Platte	Nunc
MgCl ₂	Sigma
MEM nicht-essentielle Aminosäure Lösung	Sigma
Methanol p.A.	J.T.Baker
Milchpulver blotting grade	Roth
Multitip Aufsätze für Multistep-Pipette	Eppendorf
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	J.T.Baker
NaCl	AppliChem

NaOH	Roth
Natrium-Desoxycholat	Sigma
Natriumpyruvat	Sigma
Nitrozellulose PROTRAN Porengröße 0,2 und 0,45 µm	Schleicher & Schuell
Nonidet P40 Substitute	Fluka
Novex Pre-Cast gels 10-20% Tricine 1,0 mm x 10 well, 12 well	Invitrogen
OptiMEM	Gibco
Pasteurpipetten	VWR
Penicillin-Streptomycin	Sigma
Pepstatin A	Sigma
Protease-Inhibitor-Cocktail mit AEBSF	Calbiochem
Protein Rainbow-Marker full-range	Amersham
Protein-G-Sepharose	Sigma
Reaktionsgefäße 1,5ml	Eppendorf
SDS	Sigma
Saccharose	Sigma
SYBR-Green	Applied Biosystems
Synthetisches Peptid Aβ40	Botond Penke, Szeged, Ungarn
Tricine	Biomol
Tris/HCl	Sigma
Triton X-100	Merck
Trizma Base	Sigma
Trizol	Invitrogen
Trypsin-EDTA-solution (1x)	Sigma
Tween-20	Sigma
Wheaton-Röhrchen	Wheaton
Zellkultur 24-Loch-Platte	Falcon
Zellkultur 6-Loch-Platte	Falcon
Zellkultur 96-Loch-Platte	Falcon
Zellkulturschale 100 x 20 mm	Sarstedt
ZnCl ₂	Merck

3.2. Geräte

Tabelle 2 - Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
4°C-Schüttler Rocky	Fröbel
-80°C Gefrierschrank	Thermo Electron
8-Kanal-Multipette	Eppendorf
Analysenwaage	Sartorius
Blotkammer Trans-Blot Cell	BioRad
Brutschrank 37°C	Heraeus
Fluorometer M1000Pro	Tecan
Fluorometer Safire ²	Tecan
Gelkammer Xcell SureLock Novex Mini-Cell	Invitrogen
Hamilton Pipette	Hamilton
Lichtmikroskop	Leica
Magnetheizrührer	Heidolph
Mikrowelle Micromat	AEG
Multipette plus	Eppendorf
N ₂ -Abdampfvorrichtung	VLH
N ₂ -Tank GT 140	Air Liquide
OD Lesegerät für 96-Lochplatten	Thermo Fisher
PCR cycler	Peqlab
pH-Meter 766	Calimatic Knick
Pipetten-Set Research	Eppendorf
Pipettierhilfe	Integra
Potter-Röhrchen	B. Braun
PotterS	B. Braun
Power-Supply für Tankblot	LKB Bromma
Power-Supply Model 200 / 2.0 für Gelelektrophorese	BioRad
Reagenzglasschüttler Multi-Reax	Heidolph
Rotor TLA-100 für Ultrazentrifuge	Beckman
RT-PCR cycler 7500 Fast	Life Technologies

Sterilbank	Heraeus
Teflonhomogenisator	B. Braun
Teflonschaber	neolab
Thermomixer comfort	Eppendorf
Transferkammer	Biorad
Überkopfschüttler Reax2	Heidolph
Ultrazentrifuge	Beckman
Vortex Genie2	Bender & Hobein
Zentrifuge 5415D	Eppendorf

3.3. Primer

Da in der vorliegenden Arbeit sowohl *murine* als auch *humane* Gene untersucht wurden, sollen diese aus Übersichtsgründen wie folgt dargestellt werden: *Murine Gene* – kursiv, nur erster Buchstabe groß geschrieben; *humane Gene* – kursiv, alle Buchstaben groß geschrieben (entsprechend der Guidelines for Formatting Gene and Protein Names, BioScience Writers).

3.3.1. Murine Primer

Tabelle 3 - Sequenzen der verwendeten murinen Primer

<i>Gen</i>	forward	reverse
<i>Ace</i>	5'-CCTGAGTTCTGGAACAAGTCG-3'	5'-TTGATCCTGAAGTCCTTGCC-3'
<i>Adam17</i>	5'-TGACATCAAGTACCGAACGC-3'	5'-GAGTCAGGCTCACCAACCAC-3'
<i>Aph1a</i>	5'-ACAAGCTCCTTAAGAAGGCAGA-3'	5'-CCGAAGGACAGACCAGAAAC-3'
<i>Aph1b</i>	5'-GCTGTTCAGGCTCGCATATT-3'	5'-AGAAACATAGGCCAACAGTCG-3'
<i>Bace1</i>	5'-ACATTGCTGCCATCACTGAA-3'	5'-TCCAAAGAAGGGCTCCAAAGA-3'
<i>β-Aktin</i>	5'-CCTAGGCACCAGGGTGTGAT-3'	5'-TCTCCATGTCGTCCCAGTTG-3'
<i>Ctsb</i>	5'-AAGCTGTGTGGCACTGTCCT-3'	5'-ATTGTTCCCGTGCATCAAAG-3'
<i>Ece1</i>	5'-GATCAAGGTCGGGAGTACGA-3'	5'-GTATTGCTGCACCATGCACT-3'
<i>Ece2</i>	5'-GGTGCTGAGTGAGGTAAGCC-3'	5'-GACCAGTCATAACGGGATTGA-3'
<i>Ide</i>	5'-GCTACGTGCAGAAGGACCTC-3'	5'-TGGACGTATAGCCTCGTGGT-3'
<i>Mmp2</i>	5'-GACAAGTGGTCCGCGTAAAG-3'	5'-ATCACTGCGACCAGTGTCTG-3'
<i>Mmp9</i>	5'-CATGCACTGGGCTTAGATCA-3'	5'-GCTTAGAGCCACGACCATAACA-3'
<i>Ncstn</i>	5'-TGCTCTATGGGTTCTGGTT-3'	5'-CGGCGATGTAGTGTGAAGA-3'

<i>Nep</i>	5'-ATGGAGACCTCGTTGACTGG-3'	5'-TTCCATTGAGATGCTGTCCA-3'
<i>Plg</i>	5'-GGTGGGAATACTGCAACCTG-3'	5'-GCAGTCTGTCTCAGAGTCGCT-3'
<i>Psen1</i>	5'-ACCCGGAGGAAAGAGGAGTA-3'	5'-TGGTTGTGTTCCAGTCTCCA-3'
<i>Psen2</i>	5'-TCATGCTATTTTCGTGCCTGTC-3'	5'-GTGTAGATGAGCTGCCCGTT-3'
<i>Psenen2</i>	5'-ATCTTGGTGGATTTGCGTTC-3'	5'-CCTTTGATTTGGCTCTGCTC-3'

3.3.2. Humane Primer

Tabelle 4 - Sequenzen der verwendeten humanen Primer

<i>Gen</i>	forward	reverse
<i>BACE1</i>	5'-GCCTATGCTGAGATTGCCAGG-3'	5'-GGAGAAGAGGTTGGGAACGTG-3'
β - <i>AKTIN</i>	5'-CTTCCTGGGCATGGAGTC-3'	5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'
<i>NCSTN</i>	5'-CTGTACGGAACCAGGTGGAG-3'	5'-GAGAGGCTGGGACTGATTTG-3'
<i>TBP</i>	5'-CGGAGAGTTCTGGGATTGT-3'	5'-GGTTCGTGGCTCTCTTATC-3'

3.4. Verwendete Primärantikörper

Tabelle 5 - Verwendete Primärantikörper

Antigen	Name des Antikörpers [Firma]	Beschreibung
A β , APP	W02 antibody [Millipore]	Monoklonaler AK - Epitop im Bereich der AS 1-5 der A β -Sequenz. Hergestellt mit synthetischem Peptid A β 1-16 (IDA et al., 1996)
ADAM10	Anti-ADAM10 (735-749) [422751 Merck]	Epitop AS 735-749 von ADAM10; Detektion Mensch, Maus
ADAM17	Anti-ADAM17 antibody [ab39162 Abcam]	Polyklonaler AK – Epitop zytoplasmatische Domäne des humanen ADAM17
BACE1	Anti-BACE (Ab-2) (485-501) Rabbit pAb [PC526 Calbiochem]	Epitop AS 485-501 des humanen BACE1; Detektion von Mensch und Maus
BACE1	Anti-BACE1 antibody [ab2077 Abcam]	Epitop AS 485-501 des humanen BACE1; Detektion von Mensch und Maus
IDE	Anti-IDE/Insulysin Rabbit antibody [ST1120 Calbiochem]	Polyklonaler AK – Epitop AS am N-Terminus des humanen IDE/Insulysin

NEP	Human Neprilysin/CD10 antibody [AF1182 R&D Systems]	Polyklonaler AK – Epitop AS52 (Tyr) – AS750 (Trp)
Nicastrin	Anti-Nicastrin antibody [N1660 Sigma Aldrich]	Polyklonaler AK- Epitop AS 693-709 (C-Terminus des humanen Nicastrin) Detektion von Mensch, Maus, Ratte
sAPP β	sAPP beta – Wild Type antibody [MBS492139-IJ18957MyBioSource]	Polyklonaler AK – Epitop C-Terminus des humanen sAPP β ; keine Kreuzreaktion mit sAPP α oder Volllänge-APP

3.5. Verwendete Zelllinien

Tabelle 6 - Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung
N2a Wildtyp	Murine Wildtyp Neuroblastom-Zelllinie Freundlicher Weise zur Verfügung gestellt durch Prof. Kins, Kaiserslautern
SH-SY5Y Wildtyp	Humane Wildtyp-Neuroblastom-Zelllinie
SH-SY5Y APP695	Wildtyp-Zellen, stabil transfiziert mit pCEP4/APP695 durch Frau Dr. Heike Grimm, Hygromycin-Resistenz

3.6. Generierung einer Hypovitaminose D im murinen Modell

(entsprechend GRIMM et al., 2013c)

In freundlicher Kooperation wurden die Mäuse durch die *AG Bals, Homburg, Deutschland* bereitgestellt. Die Tötung sowie Präparation der Tiere wurde gemeinsam mit Dr. Christian Herr, Inge Tomic und Dr. Janine Mett durchgeführt.

Alle Versuche am Tiermodell wurden gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt (Nummer des Tierschutzantrags: 17/2011).

Die 17 ausschließlich weiblichen C57BL/6 Mäuse (*Charles River, Sulzfeld, Deutschland*), wurden in Gruppen von 7-10 Tieren in einem Käfig untergebracht. Ab einem Alter von 6 Wochen wurden die Tiere mit der Kontroll-Diät oder dem Vitamin D-defizienten Futter gefüttert. Die Mäuse wurden bei einer Temperatur von 20-22 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 50-60% und einer Beleuchtung von 7 Uhr bis 19 Uhr gehalten. Während der gesamten Zeit war das Futter und Wasser *ad libitum* verfügbar. Die Zeitspanne zwischen Fütterungsbeginn und der Tötung der Tiere betrug 6-9 Monate. Das Kontroll-Futter C1000 enthielt 500 I.E/kg Vitamin D3, wohingegen das Vitamin D-defiziente Futter (C1017) kein Vitamin D3 enthielt (*Altromin, Lange, Deutschland*). Des Weiteren waren beide Futtermittel isokalorisch und in ihrer Protein-, Fett-, Kohlenhydrat-, Ballaststoff- und Mineralzusammensetzung identisch. Die Tötung der Tiere wurde durch eine Überdosis Ketamin mittels intraabdomineller Injektion durchgeführt. Anschließend wurde der Kopf abgetrennt, die Kalotte eröffnet, das Gehirn entnommen, mittels Sagittalschnitt geteilt, mit 1xPBS gewaschen und die Hemisphären einzeln in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte ebenfalls in flüssigem Stickstoff.

3.7. Eukaryotische Zellkultur

3.7.1. Kultivierung von SH-SY5Y- und N2a-Zellen

(Durchführung entsprechend Dissertation Dr. Johanna Kuchenbecker, Universität des Saarlandes, 2011)

Verwendete Puffer / verwendetes Kulturmedium:

1xPBS: 137 mM NaCl
 2,7 mM KCl
 8,1 mM Na₂PO₄ x 2H₂O
 1,5 mM KH₂PO₄

Tabelle 7 - Verwendete Zellkulturmedien

Zelllinie	Verwendetes Zellkulturmedium
N2a Wildtyp	DMEM; MEM (1:100); 10% FBS; 1% Penicillin-Streptomycin; 2mM L-Glutamin; 1mM Natriumpyruvat
SH-SY5Y Wildtyp	DMEM; MEM (1:100); 10% FBS
SH-SY5Y APP695	DMEM; MEM (1:100); 10% FBS; 400 µg/ml Hygromycin B

Die Zellen wurden auf beschichteten Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 10 cm im Brutschrank bei 37 °C, 90% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂-Atmosphäre mit 10 ml des Kulturmediums kultiviert. Bis zum Erreichen der 95 bis 100%igen Konfluenz, wurde alle zwei bis drei Tage das Medium gewechselt. Bei Erreichen der Konfluenz wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit autoklaviertem 1xPBS gewaschen. Nach Entfernen des 1xPBS, wurden die Zellen mittels 1,5 ml Trypsin pro Schale abgelöst. Es wurde eine geringere Trypsin-Menge als in der oben aufgeführten Dissertation verwendet (2 ml), um die Zytotoxizität zu reduzieren. Nach Zugabe von 8,5 ml Kulturmedium, welches die Wirkung des Trypsins aufhebt, wurden die Zellen mit Hilfe einer 10 ml Glaspipette durchmischt und vereinzelt. Im Folgenden wurde abhängig vom geplanten Experiment ein Teil der Zellsuspension auf neue Zellkulturschalen überführt.

3.7.2. Auftauen von Zellen

(Durchführung entsprechend Dissertation Dr. Johanna Kuchenbecker, Universität des Saarlandes, 2011)

Es wurden 5 ml des vorgewärmten Kulturmediums in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen gegeben. Nach dem Auftauen der gefrorenen Zellsuspension, wurde diese in das vorgelegte Medium überführt. Die Zellen wurden 5 min bei 800 rpm und RT abzentrifugiert. Das überständige Medium wurde abgesaugt, die Zellen in 10 ml frischem Kulturmedium resuspendiert und die Zellsuspension auf eine 10 cm Zellkulturschale gegeben, wo sie gleichmäßig verteilt wurden. Im Verlauf wurden die Zellen gemäß Kapitel 3.7.1. kultiviert.

3.7.3. Kryokonservierung von Zellen

(Durchführung entsprechend Dissertation Dr. Johanna Kuchenbecker, Universität des Saarlandes, 2011)

Einfrierlösung A: 30% FBS in DMEM

Einfrierlösung B: 30% FBS, 20% DMSO in DMEM

Um eine langfristige Lagerung einheitlich kultivierter Zellen zu ermöglichen, wurden Gefrierkulturen erstellt und diese im flüssigen Stickstoff gelagert.

Das Medium wurde von den Zellen abgenommen und diese wie unter 3.7.1. beschrieben gewaschen und von der Zellkulturschale abgelöst. Die Zellen wurden in 5 ml des *Kulturmediums* aufgenommen und die Zellsuspension in ein Falconröhrchen überführt. Dieses wurde 5 min bei 1500 rpm und RT zentrifugiert. Der Überstand mit dem enthaltenen Trypsin wurde entfernt und das entstandene Zellpellet in 1,5 ml der *Einfrierlösung A* resuspendiert. Nach Zugabe von 1,5 ml der *Einfrierlösung B* wurden die Zellen auf zwei Kryoröhrchen verteilt und diese für 24 h bei -80 °C in einer Styroporbox, um ein schonendes Herunterkühlen zu ermöglichen, eingefroren. Die dauerhafte Lagerung erfolgte im flüssigen Stickstoff.

3.7.4. Inkubation von Neuroblastom-Zellen mit 25(OH)D3

(Neu-Etablierung im Rahmen der vorliegenden Arbeit)

Die *eingesetzte Konzentration* sowie das *Verhältnis Ethanol : Medium* können der Tabelle 8 entnommen werden. Das Ethanol wurde vor dem Lösen des 25(OH)D3 mittels Ultraschallbad entgast, um eine Oxidation des Moleküls zu vermeiden. Die Stocklösungen wurden in Glasgefäße pipettiert, da das 25(OH)D3-Molekül, aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften, potentiell an Plastik adhären kann. Die Konzentration der Stocklösung wurde so gewählt, dass eine finale Ethanolkonzentration von < 2 ‰ im Inkubationsmedium nicht überschritten wurde, um die Zytotoxizität bei der späteren Inkubation gering zu halten. Bis zur Verwendung der Stocklösungen wurden diese im flüssigen Stickstoff gelagert. Auch dies diente als Oxidationsschutz des Moleküls, da hier der Sauerstoffpartialdruck sehr gering ist.

Tabelle 8 - 25(OH)D3-Inkubation

Stoff	Stocklösung	Eingesetzte Konzentration	Verhältnis Ethanol : Medium
25(OH)D3	100 μ M in Ethanol	100 nM	1 : 1000

In Abhängigkeit des Versuchsaufbaus wurden die Zellen auf 10 cm Zellkulturschalen, 6-, 24-, oder 96-Loch-Platten verteilt. Alle Schalen wurden ausgehend von einem Zellsuspensionsansatz ausgesät, um die Homogenität der zu inkubierenden Zellen untereinander zu gewährleisten. Die Zellen wurden entsprechend Kap. 3.7.1 kultiviert. In der vorliegenden Arbeit wurde zwischen einer *Kurzzeit-* und einer *Langzeitinkubation* unterschieden. Die *Kurzzeitinkubation* sollte hierbei einen „Vitamin D-Impuls“ darstellen, um schnelle zelluläre, Vitamin D-abhängige Effekte zu beurteilen. Dies entspricht im klinischen Alltag einer hochdosierten Einmalgabe. Durch die *Langzeitinkubation* sollte ein Zustand geschaffen werden, in dem sich ein Gleichgewicht zwischen den einzelnen Vitamin D-Metaboliten einstellt (siehe Abbildung 1).

Bei der *Kurzzeitinkubation* wurden die Zellen bis zu einer 80-90%igen Konfluenz kultiviert. Anschließend wurde das *Wachstumsmedium* abgenommen und die Zellen für 24 h mit 100 nM 25(OH)D3 inkubiert. Dazu wurde Kulturmedium in ein Glasgefäß vorgelegt und das 25(OH)D3 unter gleichmäßiger Bewegung in das Medium pipettiert. Pro 10 cm Schale wurden jeweils 5 ml Inkubationsmedium eingesetzt. Bei anderer Schalengröße wurde die Menge entsprechend angepasst, um ein einheitliches Oberflächen : 25(OH)D3-Verhältnis zu gewährleisten. Als Kontrolle diente das Lösungsmittel *Ethanol*, welches im gleichen Verhältnis eingesetzt wurde. Es erfolgte zunächst eine 8-stündige Vorinkubation der Zellen mit dem *Inkubationsmedium*. Hierdurch sollten zelluläre, Vitamin D-abhängige Effekte initiiert werden. Anschließend erfolgte der Mediumwechsel. Das frische *Inkubationsmedium* wurde für 16 h konditioniert. Hierdurch konnte eine höhere Konzentration der zu untersuchenden Proteine im Medium erzielt werden. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Zellen sowie das konditionierte Medium für die Versuche verwendet.

Bei der *Langzeitinkubation* wurden N2a-Zellen neu aufgetaut und gleichmäßig ausgesät. Ein Teil der Zellen wurde im *Langzeit-Kontroll-*, der andere Teil im *Langzeit-Inkubationsmedium* entsprechend Kap. 3.7.1. kultiviert. Das verwendete Kulturmedium entsprach dem unter 3.7.1 aufgeführten Medium. Dem *Langzeit-Inkubationsmedium* wurde zusätzlich 100 nM 25(OH)D3 und dem *Langzeit-Kontrollmedium* die äquivalente Menge an *Ethanol* beigelegt.

Die FBS-Konzentration der Medien wurde von 10% auf 5% reduziert. Dies sollte zu einer Reduktion der durch das FBS zugeführten Vitamin D-Menge führen (s. Kap. 5.1.). Gleichzeitig bestand eine ausreichende Nährstoffzufuhr ohne erhöhten zellulären Untergang. Die Kultivierphase belief sich auf mindestens *vier Wochen*. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Zellen für die Versuche verwendet.

3.7.5. Transiente Transfektion von N2a-Zellen mit hAPP mittels LipofectamineTM2000

(Durchführung entsprechend Dissertation Dr. Verena Burg, Universität des Saarlandes, 2014 basierend auf modifiziertem Herstellerprotokoll LipofectamineTM2000, Invitrogen)

Verwendete Substanzen/Ansätze:

Tabelle 9 - Transfektion von N2a-Zellen mit LipofectamineTM2000 – eingesetzte Menge/Volumina an DNS, Lipofectamine, OptiMEM

Schale/Platte	DNS [μg]	Lipofectamine [μl]	OptiMEM [μl]	Vorgelegtes OptiMEM [ml]
6-Loch	6-7	6	200	0,8

Ansatz 1: DNS + OptiMEM, mischen

Ansatz 2: Lipofectamine2000 + OptiMEM, mischen

Prinzip:

Unter physiologischen Bedingungen ist die DNS aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats negativ geladen. Da die Plasmamembran ebenfalls eine negative Ladung aufweist, kommt es zu einer gegenseitigen elektrostatischen Abstoßung. LipofectamineTM2000 ist eine kationische liposomale Substanz, welche mit Nukleinsäure-Molekülen einen Komplex bildet, somit die elektrostatische Abstoßung verhindert und letztlich eine effektive Transfektion ermöglicht. Die Bindung an die Nukleinsäuren findet über die positiv geladene Kopfgruppe statt, die aus einem oder mehreren positiv geladenen Stickstoffatomen besteht. Über einen Spacer ist die Kopfgruppe an zwei oder drei Hydrocarbon-Ketten gebunden (DALBY et al., 2004).

Durchführung:

Für die transiente Transfektion von *hAPP* wurden standardmäßig *6-Loch-Platten* verwendet. Die N2a-Zellen wurden nach dem Umsetzen auf die 6-Loch-Platten für mindestens 24 h entsprechend Kapitel 3.7.1 kultiviert, bis zu einer Konfluenz von 85-90%. Für die Versuchsdurchführung wurden *langzeitinkubierte* N2a-Zellen verwendet.

Für die Transfektion wurden *Ansatz 1* und *2* entsprechend den oben angegebenen Werten

angesetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Die Ansätze wurden vereinigt und erneut für 20 min bei RT inkubiert, um eine Komplexbildung zu ermöglichen. Zwischenzeitlich wurden die Zellen mit *OptiMEM* gewaschen. Nach komplettem Entfernen, wurde das gewünschte Volumen an *OptiMEM* vorgelegt. Dieses wurde im Vergleich zum Herstellerprotokoll um ca. 50 % reduziert, womit eine höhere Transfektionseffektivität erzielt werden konnte. Das *DNS/LipofectamineTM2000/OptiMEM-Gemisch* wurde hinzugegeben und die Zellen für 5 h darin inkubiert. Abschließend wurde der Transfektionsansatz abgenommen und durch 10% FBS-haltiges Kulturmedium ersetzt. Die transfizierten Zellen wurden über Nacht kultiviert, bevor sie entsprechend Kapitel 3.7.4. inkubiert wurden.

3.8. RNS Methoden und quantitative RT-PCR

3.8.1. RNS Isolation aus Zellen und Geweben mittels Trizol

(Durchführung entsprechend Dissertation Dr. Sven Grösgen, Universität des Saarlandes, 2013 basierend auf Herstellerprotokoll Trizol-Reagent, Life Technologies)

Die RNS Isolation erfolgte aus *gefrorenen Maushirnhemisphären* und aus *inkubierten Neuroblastom-Zellen*.

Die *Maushirnhemisphären* wurden in einem Potterröhrchen bei RT 45 min in 1 ml Trizol aufgetaut. Nach 20 maligem Homogenisieren der Proben mittels Teflonhomogenisator bei 1500 rpm auf Eis, wurden diese in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Die *Zellen* wurden in 1 ml Trizol mittels Gummischaber mechanisch abgelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Die im Folgenden beschriebenen Schritte wurden in analoger Weise für beide Ansätze durchgeführt:

Nach 5 minütiger Inkubation der Proben bei RT, wurde zu den jeweiligen Proben 200 µl Chloroform hinzugegeben und diese für 15 s kräftig durchmischt. Danach wurden die Proben erneut für 3 min bei RT inkubiert und anschließend 15 min bei 12000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Aus dem Zentrifugationsschritt resultieren drei Phasen: in der unteren, roten Phase befinden sich die Proteine, wohingegen sich in der oberen klaren Phase die RNS befindet. Die beiden Phasen werden durch eine mittlere, weiße Phase getrennt, die die ausgefallene DNS enthält. Die oberste Schicht wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in das anschließend 500 µl Isopropanol hinzugegeben wurden. Die darauffolgende 10 minütige Inkubation bei RT dient der Fällung der RNS. Durch anschließende Zentrifugation bei 12000 rpm und 4 °C für 10 min, wurde diese pelletiert. Der

Überstand wurde verworfen und das RNS-Pellet in 1 ml 75%igem Ethanol gewaschen. Nach kurzem Durchmischen wurde das Pellet durch einen erneuten Zentrifugationsschritt bei 7500 rpm für 5 min bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand abermals verworfen. Danach wurde das Pellet für 2 min bei RT getrocknet und anschließend in 100 µl RNase freiem Wasser in Lösung gebracht. Die isolierte RNS wurde für 10 min bei 55 °C in einem Wasserbad erwärmt, sodass die RNS in Lösung geht. Die RNS wurde bei -80 °C gelagert.

Damit die Konzentration und Reinheit der isolierten RNS bestimmt werden konnte, wurde diese zunächst in RNase freiem Wasser verdünnt und in eine Küvette (mit einer optischen Schichtdicke von 1) überführt. Grundsätzlich gilt, dass Nukleinsäuren die höchste Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm aufweisen, wohingegen Proteine ihr Extinktionsmaximum bei 280 nm zeigen. Somit wurde die Extinktion der Proben bei diesen Wellenlängen bestimmt. Des Weiteren gilt, dass eine Extinktion von 1 einer RNS-Konzentration von 40 µg/ml entspricht, sodass sich die entsprechende RNS-Konzentration der Probe nach Umstellung des *Lambert-Beerschen Gesetzes* wie folgt berechnen ließ:

$$c \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right] = \text{Extinktion } 260 \text{ nm} * \text{Verdünnungsfaktor} * 40 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$$

Darüber hinaus konnte mit Hilfe des Quotienten der Extinktionen von 260 und 280 nm (*260 nm/280 nm*) Rückschlüsse auf die Reinheit der isolierten RNS gezogen werden. Der Quotient sollte für reine RNS zwischen 2,0 und 2,2 liegen.

3.8.2. cDNS Synthese

(nach Herstellerprotokoll *High Capacity cDNA RT Kit, Life Technologies*)

Nach der Isolation der RNS und deren Reinheits- und Konzentrationsbestimmung wurde diese mit dem *High Capacity cDNA RT Kit (Life Technologies)* in cDNS umgeschrieben. Die erhaltene cDNS konnte dann für die Echtzeit-Polymerasekettenreaktion verwendet werden. Für das Umschreiben wurden 2 µg RNS eingesetzt und folgender Ansatz pipettiert:

2 µl	10x RT Buffer
0,8 µl	25x dNTP Mix (100 mM)
2 µl	10x RT Random Primer
1 µl	MultiScribe Reverse Transkriptase
4,2 µl	Nuklease-freies Wasser
10 µl	RNS (2 µg/µl, ad 10 µl H ₂ O)

Der Ansatz wurde für 10 min bei 25 °C, anschließend 120 min bei 37 °C und letztlich für 5 min bei 85 °C in einem Thermocycler inkubiert. Nach dem Herunterkühlen auf 4 °C konnte die so erhaltene cDNS 1:10 in Nuklease-freiem Wasser verdünnt und anschließend bei -80 °C eingefroren werden.

3.8.3. Echtzeit-Polymerasekettenreaktion

(Durchführung entsprechend Dissertation Dr. Sven Grösgen, Universität des Saarlandes, 2013 und GRIMM et. al, 2017)

Prinzip:

Mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-Polymerasekettenreaktion kann die Expression verschiedener Gene aus unterschiedlichen Geweben quantitativ bestimmt werden. Dies wurde in dieser Arbeit aus *Maushirnproben* sowie aus *Neuroblastom-Zellen* durchgeführt. Um verschiedene Ansätze miteinander vergleichen zu können, wurden die Ergebnisse in Relation zur Expression der Haushaltsgene (engl.: „*Housekeeping Gen*“) β -Aktin und TATA-Box bindendes Protein (engl.: *TATA-box binding protein, TBP*) gesetzt. Da die Haushaltsgene durch äußere Einflüsse nicht in ihrer Expression beeinflusst und gleichmäßig in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden, eignen sich diese besonders zur Normierung der Proben. Als Fluoreszenz-Farbstoff wurde SYBR-Green verwendet. Die erhaltenen Ergebnisse wurden mittels Δ/Δ Ct-Methode nach *Livak und Schmittgen* (LIVAK, SCHMITTGEN, 2001) ausgewertet.

Durchführung:

Für die Messung des Expressionsniveaus der verschiedenen Gene in der zu untersuchenden Probe wurde in eine 96-Loch-Platte folgender Ansatz pipettiert:

0,5 μ l	Primer forward
0,5 μ l	Primer reverse
4 μ l	Nuklease freies Wasser
10 μ l	SYBR Green Master Mix
5 μ l	cDNS

Die anschließende Messung erfolgte im *7500 Fast Real Time PCR System Gerät der Firma Life Technologie (Software SDS V 1.3.1.21.)* sowie im *Piko Real Cycler der Firma ThermoScientific*. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der *PikoReal Software (Version 2.1.158.545)*.

Folgende Geräteeinstellungen wurden verwendet:

Tabelle 10 - Echtzeit-Polymerasekettenreaktion – Geräteeinstellungen

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [Sek.]	Zyklen
I	95	20	1
II	95	3	40
III	60	30	
IV	Schmelzkurvenanalyse		1

Nachdem der Messvorgang abgeschlossen war, konnten die einzelnen Schmelzkurven der Amplifikate überprüft werden. Dadurch konnte entschieden werden, ob ein Primer spezifisch gebunden hatte oder ob unspezifische Amplifikate entstanden waren. Nach anschließender Bestimmung des Schwellenwerts (C_T -Wert) aller Proben, bei dem die Steigungen aller Schmelzkurven identisch sein sollten, konnten die C_T -Werte mittels $\Delta/\Delta C_t$ -Methode ausgewertet werden. Es wurde darauf geachtet, dass sich die C_T -Werte der Haushaltsgene zwischen Kontroll- und Defizienz-/Inkubations-Gruppe nicht signifikant unterschieden.

3.9. Proteinchemische Analysen

3.9.1. Zellaufschluss

Beim Zellaufschluss können prinzipiell zwei Methoden unterschieden werden, die abhängig vom Versuchsaufbau und der Fragestellung zur Anwendung kommen. Diese sollen im Folgenden genauer erläutert werden.

Vor dem jeweiligen Zellaufschluss wurde das Zellmedium abgenommen und die Zellen zweimalig mit 1xPBS gewaschen, um jegliche Medium-Rückstände zu entfernen. Alle Schritte erfolgten auf Eis.

3.9.1.1. Mechanischer Zellaufschluss

(Durchführung entsprechend Dissertation Dr. Tatjana Rothhaar, Universität des Saarlandes, 2013)

Bei diesem Verfahren wird ein Teflonkolben, in einem den Kolben dicht umschließenden, Glasröhrchen auf und ab bewegt. Durch die entstehenden Scherkräfte werden die Zellen zerstört und Zellproteine und -lipide freigegeben, wohingegen die Zellorganellen

weitestgehend ihre Integrität erhalten.

Diese Methode wurde zum Homogenisieren von Neuroblastom-Zellen und Gehirnen verwendet. Auf die Proben wurde der entsprechende Puffer, abhängig vom Versuchsaufbau, oder ddH₂O gegeben. Das verwendete Volumen war abhängig von der zu erwartenden Proteinkonzentration. Für 10 cm Zellkulturschalen wurde beispielsweise ein Volumen von 400 µl verwendet. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Gummischabers mechanisch von der Zellkulturschale abgelöst und in ein gläsernes Potterröhrchen überführt. Durch 25 maliges (Zellen) bzw. 50 maliges (Gehirne) Auf- und Abbewegen des Teflonkolbens, bei einer Umdrehungszahl von 1000 rpm, wurden diese sukzessiv aufgeschlossen.

3.9.1.2. Chemischer Zellaufschluss mittels Lysepuffer

(Durchführung entsprechend Dissertation Dr. Tatjana Rothhaar, Universität des Saarlandes, 2013)

Verwendete Puffer:

Lysepuffer:	150 mM NaCl
	50 mM Tris/HCl pH 7,4
	0,1% (v/v) Triton X-100
	0,1% (v/v) NP-40
	2 mM EDTA
	in ddH ₂ O
	Vor der Benutzung wurde der Proteaseinhibitor (s.u.) im Verhältnis 1:10 mit dem Lysepuffer versetzt.
10x Proteaseinhibitor:	Lösen einer Complete-Tablette in 5ml ddH ₂ O
	Lagerung bei -20°C

Der chemische Zellaufschluss erfolgte aus inkubierten Neuroblastom-Zellen und bereits in ddH₂O homogenisierten Maushirnhemisphären zur weiteren proteinanalytischen Untersuchung. Nach dem Waschen der Zellen wurden je 400 µl Lysepuffer auf jede 10 cm Zellkulturschale gegeben. Die Zellen wurden mittels Gummischaber von der Schale abgelöst, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 45 min chemisch aufgeschlossen. Aufgrund der verlängerten Inkubationsphase im Vergleich zur oben aufgeführten Dissertation (45 min vs. 30 min), wurde auf eine weitere Bearbeitung der Proben mittels 27G-Kanüle verzichtet. Die Homogenate der Maushirnhemisphären wurden mit zweifach konzentriertem Lysepuffer

im Verhältnis 1:1 versetzt und für denselben Zeitraum lysiert, um einen adäquaten Zellaufschluss zu erzielen. Anschließend wurden die Lysate 5 min bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen. Die erhaltenen Lysate wurden bei -20 °C gelagert.

3.9.2. Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bicinchoninsäure (BCA) – Test

(Durchführung entsprechend Dissertation Dr. Johanna Kuchenbecker, Universität des Saarlandes, 2011 basierend auf modifiziertem Protokoll nach SMITH et al., 1985)

Verwendete Puffer:

BCA-Arbeitsreagenz:

BCA-Lösung 1: 4% (w/v) $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$

BCA-Lösung 2: BCA-Lösung

Eingesetzt im Verhältnis *BCA-Lösung 1 : BCA-Lösung 2 = 1 : 40*

Prinzip:

Der BCA-Test dient der quantitativen Bestimmung des Proteingehalts einer Probe. Die Grundlage dieser Methode ist die Reduktion der Cu^{2+} - zu Cu^+ -Ionen durch die zu bestimmenden Proteine bei alkalischem pH. Die entstandenen Cu^+ -Ionen bilden mit jeweils zwei Bicinchoninsäure-Molekülen einen Komplex, welcher zu einem violetten Farbumschlag führt. Diese Reaktionsprodukte zeigen ein Absorptionsmaximum bei 562 nm und können photometrisch gemessen werden. Die Intensität des Farbumschlags ist dabei über einen weiten Bereich direkt proportional zur Menge des enthaltenen Proteins.

Durchführung:

Es wurden 20 µl einer Standardreihe aus Rinderserum-Albumin, welche Proteinkonzentrationen von 0 bis 1,1 µg/µl, in jeweils 0,1 mg/ml Abständen umfasst, in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Die zu messenden Proben wurden, entsprechend der zu erwartenden Proteinmenge, mittels passendem Puffer verdünnt und jeweils 5 µl als 5-fach Bestimmung in die Platte gegeben. Von dem angesetzten *BCA-Arbeitsreagenz* wurden mit Hilfe einer 8-Kanal-Pipette je 200 µl auf die Proben gegeben. Der Reaktionsansatz wurde 15 min bei 37 °C und danach 15 min bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Abschließend wurden die Proben im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen. Von den ausgegebenen Werten wurde jeweils der Nullwert abgezogen, der Mittelwert der Proben nach Exklusion des minimalsten und maximalsten Wertes gebildet und dieser in Relation zur erstellten Standardreihe gesetzt.

3.9.3. Immunpräzipitation

(Durchführung entsprechend Dissertation Dr. Johanna Kuchenbecker, Universität des Saarlandes, 2011)

Die Methode wurde in dieser Arbeit zur Detektion von A β -Peptiden aus konditioniertem Medium inkubierter Neuroblastom-Zellen verwendet.

Verwendete Puffer:

Tabelle 11 - Immunpräzipitation - verwendete Waschpuffer

	Waschpuffer A	Waschpuffer B	Waschpuffer C
Tris/HCl (pH 7,5)	10 mM	10 mM	10 mM
NaCl	150 mM	500 mM	-
NP-40	0,1% (v/v)	0,1% (v/v)	-
Triton X-100	0,1% (v/v)	0,1% (v/v)	-
EDTA	2 mM	2 mM	-

Prinzip:

Die Immunpräzipitation (IP) dient der Anreicherung von Protein aus konditioniertem Zellkulturmedium oder Zelllysaten. Dies ist sinnvoll, wenn das zu untersuchende Protein nur in sehr geringem Umfang von der entsprechenden Zelllinie bzw. vom entsprechenden Gewebe exprimiert wird.

Ein spezifischer Antikörper bindet mit seiner *Fab*-Region an das Protein und mit seiner *Fc*-Region an Protein G. Das Protein G ist zusätzlich an Sepharose gekoppelt, welche aufgrund ihres Gewichts die Anreicherung nach Zentrifugation ermöglicht.

Durchführung:

Nach Durchführung des BCA-Tests aus den Zelllysaten wurden die konditionierten Medien auf den niedrigsten bestimmten Proteingehalt eingestellt. Das Endvolumen betrug 1 ml. In jede Probe wurden 20 μ l der Protein G-Sepharose und 5 μ g/ml W02-Antikörper gegeben. Der Ansatz wurde über Nacht bei 4 °C auf dem Überkopftaumler inkubiert. Anschließend wurden die Proben 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, das überständige Medium vorsichtig abgesaugt und anschließend die Immunpräzipitate nacheinander mit *Waschpuffer A, B und C* gewaschen. Abschließend wurden je 15 μ l *3xProteinprobenpuffer* (s. Kap. 3.9.4.) auf die Proben gegeben und diese im Thermomixer 5 min bei 98 °C inkubiert. Dadurch lösten sich die A β -Peptide von der Protein G-Sepharose und konnten anschließend auf ein Proteingel aufgetragen werden.

3.9.4. Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE

(Durchführung entsprechend Dissertation Dr. Tatjana Rothhaar, Universität des Saarlandes, 2013 basierend auf modifiziertem Protokoll nach SCHÄGGER, VON JAGOW, 1987)

Verwendete Puffer:

3xProteinprobenpuffer: 187,5 mM Tris/HCl pH 6,8
 6% (w/v) SDS
 30% (v/v) Glycerin
 15% (v/v) β -Mercaptoethanol
 0,03% (w/v) Bromphenolblau
 in ddH₂O

1xKathodenpuffer: 100 mM Tris
 100 mM Tricine
 1% (w/v) SDS
 in ddH₂O – pH 8,25-8,5

Prinzip:

Bei dieser Methode werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch aufgetrennt. Als Trägermedium dient Polyacrylamid, welches nach Auspolymerisierung zur optimalen Auftrennung der Proteine beiträgt. Die Proteine werden in *Natrium-Dodecylsulfat* (engl.: *Sodium dodecyl sulfate, SDS*), einem negativ geladenen Detergens, aufgenommen, welches die Proteine entfaltet und mit einer negativen Ladung versieht. Dabei ist die Menge an proteingebundenem SDS ungefähr proportional zu dessen Molekülgröße. β -Mercaptoethanol dient zur Spaltung von Disulfidbrücken und unterstützt die Denaturierung von Proteinkomplexen. Im anschließenden Gellauf wandern kleine Proteine am schnellsten, wodurch eine Auftrennung entsprechend ihrer Größe gelingt.

Durchführung:

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte aus Zell-/Gewebelysaten, konditionierten Medien sowie nach Immunpräzipitation. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration der Lysate bzw. Medien wurden die Proben auf die gewünschte Proteinkonzentration mittels entsprechenden Puffern angeglichen (s. Tabelle 12) und mit *3xProteinprobenpuffer* versetzt. Abhängig von dem zu untersuchenden Protein, wurden die Proben 5 min bei 98 °C im Thermomixer gekocht. Die A β -Präzipitate wurden mit 20 μ l

Proteinprobenpuffer versetzt und ebenfalls für 5 min bei 98 °C gekocht. Die Proben wurden anschließend auf kommerziell erhältliche 10-20% Tris/Tricin-Gele aufgetragen. Der darauffolgende Gellauf, in einer speziellen Gelkammer gefüllt mit *1xKathodenpuffer*, fand bei 120 V und RT für ca. 1-1,5 h statt.

Tabelle 12 - Proteinelektrophorese - verwendete Proteinkonzentration, Notwendigkeit des Aufkochens der Proben

Protein	Aufgetragene Proteinmenge	Aufkochen
Aβ	IP aus konditioniertem Medium	x
APP	40-50 μ g	x
sAPPβ	Normiert auf geringste Proteinkonzentration	x
ADAM 10	40-50 μ g	-
ADAM 17	40-50 μ g	-
BACE1	40-50 μ g	-
Nicastrin	40-50 μ g	x
IDE	40-50 μ g	x

3.9.5. Western-Blot-Analyse

(Durchführung entsprechend Dissertation Dr. Tatjana Rothhaar, Universität des Saarlandes, 2013)

Verwendete Puffer:

10xTransferpuffer: 250 mM Trizma Base
1,57 M Glycin
in ddH₂O – pH 8,3-8,7

1xTransferpuffer

mit Methanol und SDS: 1/10 *10xTransferpuffer*
20% (v/v) Methanol
0,025% (v/v) SDS

Prinzip:

Nach dem beschriebenen Gellauf wurden die negativ geladenen Proteine, durch das Anlegen einer äußeren Spannung, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (PROTRAN, Porengröße 0,45 bzw. 0,2 μ m (für A β - aufgrund seiner geringen Proteingröße)). Die Proteine

wandern entsprechend ihrer negativen Ladung zur Anode und bleiben dabei an der Membran haften. Im weiteren Verlauf können die Proteine mittels *Primär-* und *HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern* markiert und somit qualitativ und quantitativ nachgewiesen werden.

Durchführung:

Im Anschluss an den Gellauf wurde das Tris/Tricin-Gel entnommen und auf die Nitrozellulosemembran gelegt, die zuvor mit *1xTransferpuffer (ohne Methanol)* befeuchtet wurde. Nitrozellulosemembran und Gel wurden anschließend zwischen zwei befeuchtete Schwämme und drei befeuchtete Whatman-Papiere in eine Transferhalterung eingespannt. Der Transfer erfolgte in einer Transferkammer bei 4 °C. In die Kammer wurde *1xTransferpuffer* gefüllt und eine Stromstärke von 380 mA angelegt. Lediglich A β wurde, aufgrund seiner geringen Größe, in einer speziellen Metallhalterung bei ebenfalls 380 mA transferiert. Die Nitrozellulosemembran wurde so in der Transferhalterung eingespannt, dass sich diese auf der Seite der Anode befand. Die Transferdauer richtete sich nach der Größe des zu untersuchenden Proteins – je größer das Protein, desto länger wurde transferiert. Größere Proteine wurden alternativ über Nacht mit einer Stromstärke von 200 mA transferiert (s.Tabelle 13).

Tabelle 13 - Western-Blot-Analyse - Protein-abhängige Angabe der jeweiligen Transferdauer und der Möglichkeit des Transfers über Nacht

Protein	Transferdauer	Transfer über Nacht möglich
Aβ	45min-1 h	-
APP	3 h	x
sAPPβ	3 h	x
ADAM 10	3 h	x
ADAM 17	3 h	x
BACE1	3 h	x
IDE	3 h	x
Nicastrin	3 h	x

3.9.6. Proteinnachweis mittels ECL- („enhanced chemo-luminescence“) Methode

(Durchführung entsprechend Dissertation Dr. Johanna Kuchenbecker, Universität des Saarlandes, 2011 basierend auf modifiziertem Protokoll des Amersham ECL-Detection Kit und IDA et al., 1996)

Verwendete Puffer:

1xTBST: 10 mM Tris/HCl pH 8
 150 mM NaCl
 0,2% (v/v) Tween-20

Prinzip:

Die ECL-Methode ermöglicht die Detektion der auf der Nitrozellulosemembran immobilisierten Proteine. An die Proteine wird zunächst ein spezifischer Antikörper gebunden. Anschließend wird dieser mit einem *Meerrettich-Peroxidase* (engl.: *horseradish peroxidase* (HRP-)) gekoppelten *Sekundärantikörper* markiert. Die Meerrettich-Peroxidase ist in der Lage Luminol zu oxidieren. Das entstehende Produkt emittiert Licht, welches mit Hilfe eines speziellen Films detektiert werden kann. Die Lichtintensität ist direkt proportional zur Proteinmenge.

Durchführung:

Nach dem Transfer der Proteine wurde die Membran in einer *Blocklösung* (10% (w/v) Magermilchpulver (MP) in 1xPBS (s. Kap. 3.7.1.) oder 1xTBST) bei 4 °C über Nacht inkubiert. Alle Membranen mit Proteinen, die anschließend mit dem W02-Antikörper detektiert wurden, wurden zuvor für 5 min in 1x PBS gekocht. Dies erleichtert die spätere Zugänglichkeit des Antikörpers zu dessen Epitop. Nach dem Blockvorgang, welcher die unspezifische Bindung des Primärantikörpers verringert, wurde die Membran dreimalig je 5 min mit entsprechendem Puffer (1xPBS oder 1xTBST) gewaschen und anschließend für 1 ½ h mit dem *spezifischen Primärantikörper* inkubiert. Nach erneutem Waschen des Blots wurde dieser mit dem Spezies-geeigneten *Meerrettich-Peroxidase- gekoppelten Sekundärantikörper* für 1 h inkubiert. Die AK-Konzentrationen, -Spezies sowie die -Puffer sind Tabelle 14 zu entnehmen. Abschließend wurde die Membran nochmals gewaschen, mit ECL-Lösung 1 und ECL-Lösung 2 im Verhältnis 1:1 beschichtet und zwischen zwei Fotokopierfolien gelegt. Die durch die beiden ECL-Lösungen gestartete Lichtemission konnte in der Dunkelkammer mit Hilfe von ECL-Hyperfilmen detektiert und die Banden

daraufliegend im Entwicklerbad sichtbar gemacht werden. Die Banden wurden mit der Software „Image Gauge V3.45“ ausgewertet.

Tabelle 14 - Verwendete Primär- und Sekundärantikörper mit jeweiliger Angabe der eingesetzten Konzentration und des verwendeten Puffers

Protein/Antigen	Primär-AK [Firma]	Konzentration/ Puffer	Sekundär-AK [Firma]	Konzentration/ Puffer
A β APP	W02	1 μ g/ml [1% MP (w/v) in PBS]	Anti-mouse [Dako]	1:5000/ PBS
sAPP β	Anti-sAPP β [MyBio Source]	1:200 [5% MP (w/v) in PBS]	Anti-rabbit [Promega]	1:10000/ 5% MP (w/v) in PBS
ADAM 10	Anti- ADAM10 [Merck]	1:2000 [1% MP (w/v) in PBS]	Anti-rabbit [Promega]	1:10000/ 5% MP (w/v) in PBS
ADAM 17	Anti- ADAM17 [Abcam]	1:5000 [5% MP (w/v) in PBS]	Anti-rabbit [Promega]	1:10000/ 5% MP (w/v) in PBS
BACE1	Anti-BACE1 [Merck]	1:1000 [5% MP (w/v) in PBS]	Anti-rabbit [Promega]	1:10000/ 5% MP (w/v) in PBS
IDE	Anti-IDE [Calbiochem]	1:2000 [5% MP (w/v) in TBST]	Anti-rabbit [Promega]	1:5000/ 5% MP (w/v) in TBST
Nicastrin	Anti- Nicastrin [S. Aldrich]	1:500 [5% MP (w/v) in TBST]	Anti-rabbit [Promega]	1:10000/ 5% MP (w/v) in PBS

3.9.7. Bestimmung von A β ₄₀ und A β ₄₂ aus Maushirnen

(Durchführung entsprechend Dissertation Dr. Verena Burg, Universität des Saarlandes, 2014 und BURG et al., 2013 basierend auf modifiziertem Herstellerprotokoll Mouse A β ₄₀, A β ₄₂ ELISA Kit, Invitrogen)

Verwendete Puffer:

2xLysepuffer: 100 mM Tris/HCl pH 7,4
 2% (v/v) NP-40
 0,5% (w/v) Natrium-Desoxycholat
 300 mM NaCl
 2 mM EDTA
 2xProtease-Inhibitor-Cocktail mit AEBSF (*Calbiochem*)

200 μ l der in *Saccharosepuffer (ohne EDTA)* homogenisierten Proben wurden in dem oben aufgeführten *2xLysepuffer* im Verhältnis 1:2 nachlysiert. Nach der Inkubation von 15 min bei 4 °C wurden die Proben für 10 min bei 3000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 150 μ l *1xLysepuffer* mittels 24G-Kanüle resuspendiert und die Proben anschließend für 90 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation für 20 min bei 13.000 rpm und 4 °C wurde der Überstand, mit dem gelösten A β , in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinmenge wurde bestimmt, die Proben auf eine Proteinkonzentration von 4,5 mg/ml angeglichen und anschließend 1:2 im *Standard Verdünnungspuffer* verdünnt. Von den Verdünnungen wurden 100 μ l pro Vertiefung der Mikrotiterplatte eingesetzt, sodass die finale Proteinmenge pro Vertiefung 225 μ g betrug. Als Blank wurden 100 μ l des *Standard-Verdünnungspuffers* und als Standard 100 μ l eines 100 pg/ml konzentrierten, synthetischen Peptids auf die Platte gegeben.

Die Proben wurden bei RT für 2 h unter Schütteln auf der abgedeckten Mikrotiterplatte inkubiert. Danach wurde die Platte viermal je 30 s mit 200 μ l des im Kit enthaltenen *Waschpuffers* gewaschen und zwischen den Waschsritten jeweils ausgeklopft. Anschließend wurden 100 μ l des A β ₄₀- bzw. A β ₄₂-*Detektionsantikörpers* für 1 h bei RT auf der Platte inkubiert. Die Platte wurde erneut wie beschrieben gewaschen und im Folgenden für 30 min mit 100 μ l des *Meerrettichperoxidase-gekoppelten Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper* inkubiert. Nach einem abschließenden Waschschrift wurden 100 μ l des Chromogens auf die Platte pipettiert und diese nochmals für 20 min lichtgeschützt inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 μ l *Stopplösung* beendet und die Proben bei einer

Wellenlänge von 450 nm im Spektralphotometer gemessen.

Von den erhaltenen Messwerten wurde der Blank-Wert abgezogen und die zu untersuchende A β ₄₀- und A β ₄₂-Konzentration anhand des Standards bestimmt.

3.9.8. Bestimmung der A β ₄₀-Gesamtdegradation

(Durchführung entsprechend Dissertation Dr. Janine Mett, Universität des Saarlandes, 2017 und GRIMM et. al, 2017 basierend auf modifiziertem Protokoll nach SUN et al., 2005)

Prinzip:

Der Versuchsaufbau diente der Beurteilung der A β ₄₀-Degradation nach Kurzzeit- bzw. Langzeitinkubation von N2a-Zellen mit 25(OH)D3 (s. Kap. 3.7.4.). Es wurde *synthetisches A β ₄₀*, entsprechend der humanen Aminosäuresequenz, verwendet, welches vom W02-Antikörper detektiert werden kann. Das während der Inkubationsphase entstehende endogene A β hatte, aufgrund des murinen Ursprungs der N2a-Zellen, keinen Einfluss auf das Gesamtsignal. Spezifische Enzyminhibitoren wurden nicht verwendet. Die Ergebnisse spiegeln somit die Gesamtaktivitätsänderung aller A β -degradierenden Enzyme unter 25(OH)D3-Einfluss wider, ohne eine Aussage über einzelne Enzyme zuzulassen.

Durchführung:

Inkubationsansatz: 200 μ l Kulturmedium
 0,5 μ g/ml synthetisches A β ₄₀
 \pm 100 nM 25(OH)D3

Die A β -Gesamtdegradation wurde in der vorliegenden Arbeit sowohl *in vitro* (auf N2a-Zellen) als auch *ex vivo* (aus Maushirnhomogenaten) untersucht. Zunächst soll das Vorgehen *in vitro* dargelegt werden:

Ausgehend von einer konfluenten 10 cm Zellkulturschale, wurden die N2a-Zellen auf eine 24-Loch-Platte umgesetzt. Die Zellen wurden mittels Trypsin abgelöst und in 10% FBS-haltiges Kulturmedium aufgenommen. Die langzeitinkubierten Zellen wurden im entsprechenden Kontroll- bzw. 25(OH)D3-haltigen Medium resuspendiert und vereinzelt. Die Zellsuspension wurde mittels Multi-Step-Pipette in jede Vertiefung der 24-Loch-Platte gegeben, die Zellen für 24 h kultiviert und anschließend für 10 bzw. 18 h im Kulturmedium \pm 100nM 25(OH)D3 vorinkubiert. Nach Entfernen des Mediums wurden je 200 μ l des Inkubationsansatzes (s.o) auf die Zellen gegeben. Das Medium wurde für 6 h auf den Zellen belassen. Abschließend wurde das Medium abgenommen und in 1,5 ml Reaktionsgefäße

überführt. Die Zellen wurden in 200 µl Lysepuffer abgelöst und der Proteingehalt pro Vertiefung bestimmt, um die Homogenität der Vertiefungen untereinander zu überprüfen. Die verbleibende A β -Menge wurde mittels Western-Blot-Analyse bestimmt. Dazu wurden je 12 µl des Inkubationsmediums + 6 µl 3xProteinprobenpuffer auf ein Gel aufgetragen. Die A β -Degradation wurde rechnerisch durch Bildung des Kehrwertes ermittelt. *Ex vivo* wurden 50 µg der Maushirnhomogenate für 15 min mit 100 nM 25(OH)D₃ inkubiert. Die Kontroll-Maushirnhomogenate wurden mit der entsprechenden Menge Ethanol behandelt. Zu den jeweiligen Ansätzen wurde zur Erhöhung der Spezifität je 1 µM β -Sekretase- und 20 µM γ -Sekretase-Inhibitor gegeben. Anschließend wurden die behandelten Homogenate für 1 h mit 1 µg/ml A β ₄₀ inkubiert. Die verbleibende A β ₄₀-Menge wurde wie oben beschrieben bestimmt.

3.9.9. Bestimmung der Sekretase-Aktivitäten

(Durchführung entsprechend Dissertation Dr. Verena Burg, Universität des Saarlandes, 2014 und ROTHHAAR et al., 2012)

Die Enzymaktivität der α -, β - und γ -Sekretase wurde in verschiedenen Systemen und mit unterschiedlicher Fragestellung fluorometrisch mit Hilfe intern gequenchter (*engl.: to quench – löschen, abfangen*) Peptidsubstrate, welche spezifische Schnittstellen der jeweiligen Sekretase aufweisen, untersucht. Intern gequenchte Peptide tragen an entgegengesetzten Enden einen Fluoreszenzdonor und einen Fluoreszenzakzeptor. Bei intaktem Substrat wird die Emission des Donors durch den Akzeptor nahezu vollständig absorbiert. Kommt es hingegen zur Spaltung des Substrats und somit zur räumlichen Dissoziation, wird das Quenching aufgehoben und das Signal kann detektiert werden.

Folgendes wurde untersucht:

- Es wurden postnukleare Fraktionen (PNFs) aus Gehirnen von Vitamin D-defizienten und Kontroll-Mäusen erstellt und hieraus die *ex vivo* Aktivitäten aller drei Sekretasen bestimmt
- SH-SY5Y-Zellen wurden für 24 h mit 25(OH)D₃ inkubiert und anschließend die Aktivität auf lebenden Zellen bestimmt

Diesen Versuchsaufbauten ist gemeinsam, dass sie den Gesamteinfluss von Vitamin D auf die Aktivität der Prozessierungsenzyme widerspiegeln. Es kann nicht zwischen einem *direkten* oder einem *indirekten Einfluss* unterschieden werden.

Unter dem *direkten Einfluss* ist die direkte inhibitorische oder stimulierende Wirkung des Vitamin D-Moleküls auf das Enzym zu verstehen, wohingegen sich der *indirekte Einfluss* auf

3.9.9.2. *In vitro* Inkubation von 25(OH)D3 mit Maushirn-PNFs

(*Neu-Etablierung im Rahmen der vorliegenden Arbeit, modifiziert nach ROTHHAAR et al., 2012*)

Diese Methode dient der Untersuchung des *direkten Einflusses* (s.o.) von 25(OH)D3 auf die Enzymaktivität. In dieser Arbeit wurde dies ausschließlich in Bezug auf die β -Sekretase-Aktivität untersucht. Die verwendete Inkubationskonzentration betrug 100 nM, da dies der physiologischen, entsprechend internationalen Empfehlungen als ausreichend geltenden 25(OH)D3-Serumkonzentration entspricht (vgl. Kap. 2.6.).

Das Vorgehen entsprach hierbei der oben genannten Publikation. Es wurde jedoch erstmalig Calcidiol verwendet.

Durchführung:

Die PNFs aus murinen Hirnproben wurden auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 100 nM 25(OH)D3 bzw. der äquivalenten Ethanolmenge zu den Kontrollen wurden die Proben für 15 min bei 4 °C unter Schütteln mit 800 rpm inkubiert. Hierdurch konnte das 25(OH)D3-Molekül potentiell in die Membran inkorporiert werden bzw. mit regulatorischen Domänen von BACE1 interagieren. Abschließend wurden 950 μ l der Proben in Ultrazentrifugen-Reaktionsgefäße überführt. Das weitere Vorgehen entsprach dem folgenden Kapitel 3.9.9.3..

3.9.9.3. Membranpräparation aus PNFs

(*Durchführung entsprechend Dissertation Dr. Verena Burg, Universität des Saarlandes, 2014 und GRIMM et al., 2011*)

Die Membranpräparationen unterschieden sich, abhängig von der zu untersuchenden Sekretase-Aktivität, in der eingesetzten *Proteinkonzentration* sowie den *Resolubilisierungsvolumina*. Siehe dazu Tabelle 15:

Tabelle 15 - Bestimmung der Sekretase-Aktivitäten – verwendete Proteinkonzentrationen der PNFs und Resolubilisierungsvolumina

PNF	Sekretase	Proteinkonzentration der PNFs	Resolubilisierungsvolumen [<i>Puffer</i>]
Maushirne	α -Sekretase	1 mg/ml	1000 μ l [<i>Alpha-Puffer</i>]
	β -Sekretase	2 mg/ml	600 μ l [<i>SP ohne EDTA</i>]
	γ -Sekretase	2 mg/ml	600 μ l [<i>SP ohne EDTA</i>]

Durchführung:

Die Proben wurden mit Hilfe einer Grammwaage tariert. Anschließend wurden die Ansätze für 75 min bei 4 °C und 55.000 rpm in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Membranpellets im entsprechenden Assaypuffer (s. Tabelle 15) aufgenommen und resolubilisiert. Dazu wurden die Pellets nacheinander je 10 mal mit einer 23G-, 27G- und 29G-Kanüle vereinzelt. Die so aufbereiteten Membranen wurden auf die Assay-Platte pipettiert und die Enzymaktivität anschließend fluorometrisch bestimmt (s. Kap. 3.9.9.4).

3.9.9.4. Messung der Sekretase-Aktivitäten nach Membranpräparation

(Durchführung entsprechend Dissertation Dr. Tatjana Rothhaar, Universität des Saarlandes, 2013)

Zur Bestimmung der Sekretase-Aktivitäten wurden je 100 µl der Membranpräparationen als Dreifachbestimmung auf eine lichtundurchlässige 96-Loch-Platte pipettiert. Bei der Bestimmung der β -Sekretase-Aktivität wurde die Probe 1:1 mit *saurem 1xPBS* (pH 4,5) verdünnt. Die entsprechenden eingesetzten Proteinmengen können

Tabelle 16 entnommen werden. Nach Zugabe der jeweiligen in DMSO verdünnten Substrate wurde deren Umsetzung kontinuierlich im Fluorometer gemessen. Die eingesetzten *Konzentrationen*, die *Extinktions-* und *Emissions-Frequenzen* sowie deren *Bandbreiten* sind Tabelle 17 zu entnehmen.

Tabelle 16 - Bestimmung der Sekretase-Aktivitäten - eingesetzte Proteinkonzentration

Sekretase	Proteinkonzentration
α -Sekretase	100 µg/Loch
β -Sekretase	250 µg/Loch
γ -Sekretase	250 µg/Loch

Tabelle 17 - Bestimmung der Sekretase-Aktivitäten – eingesetzte Substrat-Konzentrationen, Extinktions- und Emissions-Wellenlängen

Substrat [Firma]	Eingesetzte Konzentration [μM]	Ext.-Wellenlänge [nm]	Emissions- Wellenlänge [nm]
α -Sekretase-Substrat II [Calbiochem, 565767]	3	340 ± 10	490 ± 10
β -Sekretase-Substrat IV [Calbiochem, 565758]	20	345 ± 5	500 ± 5
γ -Substrat [Calbiochem, 565764]	6,25	355 ± 10	440 ± 10

3.9.9.5. Messung der Sekretase-Aktivitäten auf lebenden Zellen

(Durchführung entsprechend GRIMM et al., 2013b und GRIMM et al., 2016a)

Verwendete Puffer/Lösung:

Assay-Puffer: 140 mM NaCl
 5 mM KCl
 8 mM CaCl₂
 1 mM MgCl₂
 20 mM HEPES, pH 7,4

Durchführung:

Für die Messung der Sekretase-Aktivitäten auf lebenden Zellen wurden SH-SY5Y Wildtyp-Zellen wie unter 3.7.1. beschrieben kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden diese auf eine 96-Loch-Platte umgesetzt und erneut für mindestens 24 h kultiviert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 25(OH)D₃ wie unter 3.7.4. beschrieben. Vor der Messung wurden die Zellen zweifach mit dem *Assay-Puffer* gewaschen. Abschließend wurden 100 μl (α -Sekretase) bzw. 50 μl (β - und γ -Sekretase) des *Assay-Puffers* auf die Zellen gegeben, die in Tabelle 17 aufgeführte Menge an Substrat hinzugefügt und die Proben bei den entsprechenden *Extinktions- und Emissionswellenlängen* (s. Tabelle 17) vermessen.

3.9.10. Messung der Neprilysin-Aktivität

(Durchführung entsprechend Dissertation Dr. Janine Mett, Universität des Saarlandes, 2017 basierend auf modifiziertem Protokoll nach MINERS et al., 2008c)

In dieser Arbeit wurde die Neprilysin-Aktivität aus Maushirnen und langzeitinkubierten N2a-Zellen bestimmt.

Verwendete Puffer/Antikörper/Substrat:

Assaypuffer:	100 mM Tris/HCl pH 7,0 50 mM NaCl 10 μ M ZnCl ₂ 1xComplete-Protease-Inhibitor ohne EDTA Inhibitoren (β -Sekretase-Inhibitor II (1 μ M); γ -Sekretase-Inhibitor IV (25 μ M); Bacitracin (10 μ M))
Waschpuffer:	0,05% Tween20 in 1xPBS
Blocklösung:	10% BSA (Fettsäure frei) in 1xPBS
Lysepuffer:	0,5% Triton X-100 10% Saccharose 20 mM Tris pH 7,4
Antikörper:	anti-NEP-AK (1,6 μ g/ml in 1xPBS), R&D Systems
Substrat:	Mca-RPPGFSAFK(Dnp)-OH (2 mM in DMSO), R&D Systems

Durchführung:

Eine MaxiSorp-96-Loch-Platte wurde mit dem oben beschriebenen Antikörper beschichtet. Pro Vertiefung wurden 100 μ l des obigen *Antikörperansatzes* eingesetzt. Die Platte wurde abgeklebt, 10 min schüttelnd bei RT sowie weitere 24 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Platte 6 mal 1 min mit 200 μ l *Waschpuffer* gewaschen und nach den Waschsritten ausgeklopft. Zum Blocken unspezifischer Bindungen wurde 10% BSA (Fettsäure-frei) in 1xPBS verwendet. Je 125 μ l der *Blocklösung* wurden pro Vertiefung für 3 h bei RT und unter Schütteln inkubiert und anschließend, wie oben beschrieben, gewaschen. Während des Blockvorgangs wurden die Proben vorbereitet: Dazu wurden sie in dem oben beschriebenen *Lysepuffer* aufgeschlossen und anschließend mit 1xPBS auf eine Proteinkonzentration von 1,25 μ g/ μ l verdünnt. 100 μ l jeder Probe wurden pro Vertiefung

eingesetzt und die Platte für 1,5 h bei RT unter Schütteln inkubiert. Nach einem abschließenden Waschschrift wurden 100 µl des *Assaypuffers* in jede Vertiefung pipettiert und dieser nochmals für 30 min inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl des zuvor 1:4 in DMSO verdünnten Substrats (finale Konzentration 5 µM) wurde die Neprilysin-Aktivität bei einer Extinktion von 320 nm und einer Emission von 405 nm fluorometrisch gemessen.

3.9.11. Messung der IDE-Aktivität

(Durchführung entsprechend Dissertation Dr. Janine Mett, Universität des Saarlandes, 2017 basierend auf modifiziertem Protokoll nach MINERS et al., 2008b)

Die Messung der IDE-Aktivität erfolgte in dieser Arbeit ausschließlich aus Maushirnhomogenaten. Die Methode wurde aufgrund ihrer höheren Sensitivität im Vergleich zur Western-Blot-Analyse ausgewählt, da die IDE-Expression im Mausgehirn wesentlich geringer ist, als in N2a-Zellen.

Die Methode beruht, entsprechend der NEP-Aktivitätsmessung (s. Kap. 3.9.10.), auf einer Isolation des Enzyms aus dem Homogenat durch Inkubation auf einer IDE-Antikörper beschichteten 96-Loch-Platte. Ergänzend zu MINERS et al. wurden zusätzliche Blockschritte durchgeführt und dem Assaypuffer die unten aufgeführten Inhibitoren hinzugefügt, um die Spezifität zu erhöhen.

Verwendete Puffer:

2xLysepuffer:	1% Triton X-100 40 mM Tris pH 7,4 20% Saccharose
Blocklösung:	10% BSA (Fettsäure frei) in 1xPBS
Waschpuffer:	0,05% Tween20 in 1xPBS
Assaypuffer:	50 mM Tris pH 7,0 1 M NaCl 10 µM MgCl ₂ in ddH ₂ O
Inhibitoren:	1 µM β-Sekretase-Inhibitor II 25 µM γ-Sekretase-Inhibitor IV 1xComplete-Protease-Inhibitor ohne EDTA

Antikörper:	Anti-IDE/Insulysin Rabbit antibody (5 µg/ml in 1xPBS), ST1120 Calbiochem
Substrat:	Mca-RPPGFSAFK(Dnp)-OH (2 mM in DMSO), R&D Systems

Durchführung:

100 µl des oben aufgeführten IDE-Antikörpers wurden in einer Konzentration von 5 µg/ml in 1xPBS in jede Vertiefung der 96-Loch-Platte gegeben. Es erfolgte eine Inkubation über 24 h bei RT. Die Platte wurde fünfmal mit dem *Waschpuffer* gewaschen und anschließend 125 µl der *Blocklösung* in jede Vertiefung gegeben. Die Blocklösung wurde für 2 h bei RT und unter Schütteln (150 U/min) inkubiert. Währenddessen wurden die Mausirnhemisphären in ddH₂O homogenisiert und anschließend in dem oben angegeben *2xLysepuffer* über 60 min nachlysiert. Die Proben wurden mit dem Waschpuffer auf eine Proteinkonzentration von 0,5 µg/µl. 100 µl jeder Probe wurden nach dreimaligem Waschen der Platte in jede Vertiefung pipettiert und für 1 h bei 20°C und unter Schütteln inkubiert. Die 96-Loch-Platte wurde anschließend fünfmal gewaschen und 150 µl des Assaypuffers (inklusive Inhibitoren) in jede Vertiefung gegeben. Es erfolgte eine weitere 30 minütige Inkubation bei RT und Schütteln. In einer Konzentration von 10 µM pro Vertiefung wurde das oben aufgeführte Substrat hinzugegeben und die Umsetzung kontinuierlich bei einer Extinktion von 320 nm und einer Emission von 405 nm gemessen.

3.9.12. Spezifität der verwendeten Enzymaktivitätsmessungen

Tabelle 18 gibt die Spezifität der jeweiligen Enzymaktivitätsmessung und die entsprechende Quelle an.

Tabelle 18 - Spezifität der einzelnen Enzymaktivitätsmessungen

Enzym	Spezifität	Quelle
α -Sekretase [Membranpräp.]	~ 80%	(ROTHHAAR et al., 2012)
β -Sekretase [Membranpräp.]	~ 90%	(BURG et al., 2013)
γ -Sekretase [Membranpräp.]	80-90%	(BURG et al., 2013; GRIMM et al., 2014)
α -Sekretase [lebende Zellen]	80%	(GRIMM et al., 2013b)
β -Sekretase [lebende Zellen]	~ 70%	Dissertation Frau Dr. Tatjana Rothhaar (GRIMM et al., 2015)
γ -Sekretase [lebende Zellen]	~ 70-80%	Dissertation Frau Dr. Tatjana Rothhaar (GRIMM et al., 2015)
Neprilysin	~ 80%	(GRIMM et al., 2015)
IDE	60%	Dissertation Frau Dr. Janine Mett (GRIMM et al., 2015)

3.10. Lipidanalytische Arbeiten

3.10.1. 25-OH-VitaminD-ELISA

(Neu-Etablierung im Rahmen der vorliegenden Arbeit in Kooperation mit Dr. Janine Mett; modifiziert nach Herstellerprotokoll 25-OH-VitaminD-ELISA, Euroimmun)

Die quantitative Bestimmung der 25(OH)D₃-Spiegel wurde unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen 25-OH-VitaminD-ELISA Kits (25-OH-VitaminD-ELISA, Euroimmun) durchgeführt. Laut Herstellerangaben ist hiermit die Bestimmung aus Serum und/oder Plasma möglich. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte in Kooperation mit Dr. Janine Mett die Etablierung der Messung aus N2a-Zellkulturen und Maushirnhomogenaten.

Prinzip:

Das 25(OH)D₃ bindet an die, an der Mikrotiterplatte fixierten, Anti-25(OH)D₃-Antikörper. Dabei werden umso mehr Antikörper-Bindungsstellen besetzt, desto höher die Calcidiol-Konzentration in der entsprechenden Probe ist. Das im zweiten Inkubationsschritt dazugegebene *Enzymkonjugat*, bestehend aus einer an 25(OH)D₃ gekoppelten Peroxidase, bindet an die freien Fab-Regionen der Antikörper. Somit besteht ein reziprokes Verhältnis zwischen der 25(OH)D₃ Probenkonzentration und der Intensität des Farbumschlages.

Durchführung:

Aus N2a-Zellen

Die verwendeten N2a-Zellen wurden in 1xPBS mechanisch aufgeschlossen (s. Kap. 3.9.1.1.), die Proteinmenge bestimmt und alle Proben auf eine Konzentration von 6 µg/µl in einem Endvolumen von 100 µl eingestellt. Die verwendete Proteinkonzentration entsprach ca. 1/10 der Eiweiß-Serumkonzentration (ca. 60 µg/µl). Im Rahmen der Etablierungsarbeit hatte sich gezeigt, dass eine höhere Proteinkonzentration der Homogenate mit einer geringeren Sensitivität bzw. verringerten Linearität der Vitamin D-Bestimmung einherging. Es wurde sich für einen *mechanischen Zellaufschluss* entschieden, um störende Effekte des Lysepuffers (s. Kap. 3.9.1.2.) auf das verwendete ELISA Kit auszuschließen. Das weitere Vorgehen entsprach dem Herstellerprotokoll. Zu jedem Ansatz wurden 160 µl der 1:10 angesetzten *Biotinlösung* gegeben. Die Reaktionsansätze wurden für 10 min bei RT inkubiert. Neben den zu untersuchenden Proben, wurden jeweils ein *Standard von 60 ng/ml* und eine Negativkontrolle analog zu den Homogenaten inkubiert.

Je 200 µl der Ansätze wurden in die Vertiefungen der Antikörper-beschichteten Mikrotiterplatte gegeben und diese für 2 h unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die

Platte dreimal 60 Sekunden mit 300 µl Waschpuffer gewaschen und nach jedem Mal trockengeklopft. Nach vollständigem Entfernen des Waschpuffers wurden 100 µl des *Enzymkonjugats* in jede Vertiefung gegeben und die Mikrotiterplatte erneut für 30 min geschüttelt. Der anschließende Waschschrift erfolgte analog zum oben genannten. Abschließend wurden 100 µl der *Chromogen/Substrat-Lösung* in jedes Loch der Platte gegeben. Die darauffolgende Reaktion wurde nach 15 minütiger Inkubation unter Schütteln mittels *Stopplösung* angehalten und die Proben bei 450 nm im Spektralphotometer gemessen.

Aus Maushirnhomogenaten

Da die 25(OH)D₃-Konzentration in den Maushirnhomogenaten sehr gering ist (s. Kap. 5.1.), wurde das 25(OH)D₃ mit Hilfe einer Lipidextraktion modifiziert *nach Bligh und Dyer* angereichert (s. Kap. 3.10.2.). Während der Lipidextraktion wurde die Phase mit den polaren Nukleinsäuren, Zuckern und Proteinen verworfen, welche die 25(OH)D₃-Detektion durch Blockierung des Epitops gestört hätten. Des Weiteren wurde das DBP denaturiert, welches einen Großteil des Vitamin Ds bindet, sodass das freigesetzte 25(OH)D₃ ebenfalls in der lipophilen Phase detektiert werden konnte. Die extrahierten Lipide wurden nach Abdampfen des Lösungsmittels in 400 µl Ethanol resuspendiert. Es zeigte sich, dass Ethanol keinen störenden Einfluss auf die ELISA-Messung hatte. Je 30 µl der Lipidlösung wurden zu 70 µl 1xPBS in ein Reaktionsgefäß überführt. Ausgehend von diesem 100 µl Ansatz wurde nach Zugabe von 160 µl der verdünnten Biotinlösung in gleicher Weise verfahren, wie oben beschrieben.

3.10.2. Lipidextraktion aus Maushirnhomogenaten

(Durchführung entsprechend Dissertation Dr. Benjamin Hundsdörfer, Universität des Saarlandes, 2014 basierend auf modifiziertem Protokoll nach BLIGH und DYER, 1959)

Prinzip:

In dieser Arbeit wurde die Lipidextraktion zur Isolierung und Konzentrierung von 25(OH)D₃ aus Maushirnhomogenaten verwendet. Das Prinzip der Methode beruht auf der Löslichkeit verschiedener Stoffe in bestimmten Lösungsmitteln. Lipide, wie beispielsweise die Secosteroide, sind aufgrund ihrer langen Kohlenwasserstoffketten unpolarer als viele andere Zellbausteine und lösen sich dadurch gut in Chloroform. Zucker, DNS und Proteine hingegen reichern sich in der polaren Methanol-haltigen Phase an, wodurch eine klare Trennung

garantiert wird. Zwischen beiden Phasen befindet sich die Interphase, welche Zelltrümmer und denaturierte Proteine enthält.

Durchführung:

Die Maushirnhemisphären wurden in ddH₂O homogenisiert und der Proteingehalt der Homogenate ermittelt. Die Proben wurden in verschließbaren 10 ml Glasröhrchen durch Zugabe von ddH₂O auf eine Proteinmenge von 5 mg, bei einem Endvolumen von 1 ml eingestellt. Zu den jeweiligen Ansätzen wurden 3,75 ml eines Chloroform/Methanol/Salzsäure (37%) Gemisch im Verhältnis 5/10/0,075 hinzugegeben und diese für 1 h auf einem Schüttler (*Multi Reax, Firma Heidolph*) durchmischt. Nach weiterer Zugabe von je 1 ml Chloroform und Wasser wurden die Proben erneut 15 min geschüttelt und anschließend für 10 min bei 4700 rpm und RT zentrifugiert. Die dabei entstandene oberste Phase wurde abgenommen, die Interphase mit einer neuen Spitze durchstoßen und die untere, lipidhaltige Phase aufgezogen und in ein neues Glasröhrchen überführt. Im Anschluss wurde das Procedere mit der lipidhaltigen Phase erneut durchlaufen, um die Ansätze weiter aufzureinigen. Zuletzt wurde das Lösungsmittel unter einem gleichmäßigen Stickstoffstrom abgedampft und die erhaltenen Lipide in Ethanol resuspendiert.

3.11. Statistische Datenauswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte unter Verwendung von Microsoft Excel und/oder SPSS Statistics 22.0.

Eine Überprüfung der Normalverteilung erfolgte mittels Shapiro-Wilk-Test. Die statistische Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen, ungepaarten Student's t-test bestimmt. p-Werte $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

Alle quantifizierten Daten entsprechen dem Mittelwert von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken stellen die mittlere Standardabweichung dar.

4. Ergebnisse

4.1. Auswirkung eines Vitamin D-Mangels auf die zerebrale A β -Konzentration

4.1.1. Fütterung weiblicher Wildtypmäuse mit Vitamin D-freiem Futter

In vivo wurde der Einfluss eines reduzierten Vitamin D-Spiegels auf die A β -Pathologie untersucht. Hierzu wurden sechs Wochen alte, weibliche C57BL/6 Wildtypmäuse (*Charles River, Sulzfeld, Germany*) untersucht. Es wurden weibliche Mäuse verwendet, da kognitive Funktionseinschränkungen unter Vitamin D-Defizienz v.a. bei Frauen beschrieben wurden (ANNWEILER et al., 2010; SEAMANS et al., 2010). Die Mäuse wurden für vier bis sechs Monate *ad libitum* mit Vitamin-D-defizientem Futter der Firma *Altromin* gefüttert. Die Kontrollgruppe erhielt während dieser Zeit ein Vitamin D-haltiges Futter. Der Fütterungsversuch wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Christian Herr, AG Bals durchgeführt. Der Vitamin D-Gehalt der Kontrolldiät *Altromin C1000* betrug 500 I.E./kg, wohingegen das Vitamin D-arme Futter *Altromin C1017* kein Vitamin D enthielt. Eine *internationale Einheit* (I.E.) entspricht dabei 0,025 μg Vitamin D. Beide Futtermittel waren isokalorisch und identisch in ihrem Protein-, Kohlenhydrat-, Ballaststoff- und Mineral-Gehalt. Ausgehend von einer täglichen Nahrungsaufnahme pro Maus von ca. 3 g Futter entspricht dies 1,5 I.E./Tag. Bei einem Gewicht der Mäuse von ca. 30 g wäre dies eine Aufnahme von 50 I.E./kg. Aktuelle Empfehlungen zur Vitamin D-Substitution bei Patienten, die gefährdet sind einen Vitamin D-Mangel zu entwickeln, sehen eine tägliche Aufnahme von 1500-2000 I.E./Tag als ausreichend an (HOLICK et al., 2011). Normiert man dies wiederum auf ein Gewicht von ca. 80 kg entspricht dies 25 I.E./Tag. Dies zeigt, dass durch die Fütterung eine ausreichende Substitution gewährleistet war und diese annähernd der humanen Situation entsprach.

Ziel des Fütterungsversuches war es einen geringen bis moderaten Vitamin D-Mangel der Wildtypmäuse unter experimentellen Bedingungen zu generieren. Dies lässt zum einen Rückschlüsse auf die Auswirkung eines nur geringen Vitamin D-Mangels auf die Alzheimer-Pathologie zu und entspricht zum anderen dem Vitamin D-Mangelzustand, wie er meist beim Menschen beobachtet wird (BUELL et al., 2010).

Um eine Mangelversorgung durch die unterschiedlichen Futtermittel auszuschließen, wurde das Gewicht der Mäuse direkt nach dem Töten bestimmt. Es zeigte sich kein signifikanter Gewichtsunterschied beider Gruppen (*Kontrollen*: 27,94 g \pm 1,17 g; *Vitamin D-Defizient*: 27,69 g \pm 0,97 g; p = 0,88 n.s.)

4.1.2. Bestimmung des zerebralen Vitamin D-Gehalts

Nach der in Kapitel 4.1.1 beschriebenen Fütterungsphase wurden die Mäuse in strikter Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz getötet, die Gehirne entnommen und in Saccharosepuffer homogenisiert. Um eine globale Aussage treffen zu können, wurden die gesamten Gehirnhemisphären und nicht nur einzelne Gehirnregionen verwendet. Da die kommerziell erhältlichen Vitamin D-Elisa-Kits ausschließlich zur Bestimmung des 25(OH)D₃-Gehalts aus Serum geeignet sind, wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Janine Mett ein Verfahren zur Detektion von 25(OH)D₃ aus Gehirngeweben etabliert. Hierfür wurde das fettlösliche 25(OH)D₃ aus den Hirnhomogenaten mit Hilfe einer Lipidextraktion (s. Kap. 3.10.2.) angereichert und die 25(OH)D₃ Konzentration unter Verwendung eines ELISA Kits bestimmt (s. Kap. 3.10.1).

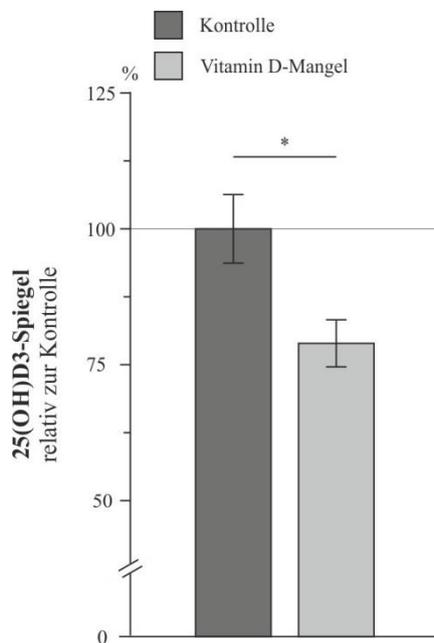


Abbildung 3 - Zerebraler 25(OH)D₃-Spiegel der Mäuse mit Vitamin D-Mangel (verändert nach GRIMM et al., 2013c)

Weibliche Wildtypmäuse wurden für einen Zeitraum von vier bis sechs Monaten *ad libitum* mit Vitamin D-armen Futter gefüttert, anschließend getötet und der 25(OH)D₃-Gehalt aus den Hirnhomogenaten mittels modifiziertem ELISA bestimmt (s. Kap. 3.10.1). Die Abbildung zeigt die zerebralen 25(OH)D₃-Spiegel relativ zur Kontrolle. Die Fehlerbalken stellen die mittlere Standardabweichung von vier unabhängigen Messungen dar.

Abbildung 3 zeigt eine 23%ige Reduktion ($\pm 4,33\%$; $p = 0,027^*$) des zerebralen 25(OH)D₃-Gehalts der Vitamin D-defizienten Tiere relativ zu den Kontrollmäusen. Somit konnte durch den Fütterungsversuch eine Vitamin D-Mangelbedingung erreicht werden, die in diesem Maße typischerweise beim Menschen beobachtet wird (BUELL et al., 2010).

4.1.3. Bestimmung des zerebralen A β -Gehalts

Es wurde die Auswirkung des zerebralen Vitamin D-Mangels auf die A β -Spiegel untersucht. Aufgrund des störenden Einflusses der Detergenzien bei der 25(OH)D3-Bestimmung, wurden die in Saccharosepuffer homogenisierten Proben in einem speziellen Lysepuffer nachlysiert und die löslichen A β_{40} - und A β_{42} -Spiegel mittels ELISA Kit bestimmt (*Mouse A β_{40} , A β_{42} ELISA Kit, Invitrogen*) (s. Kap. 3.9.7.).

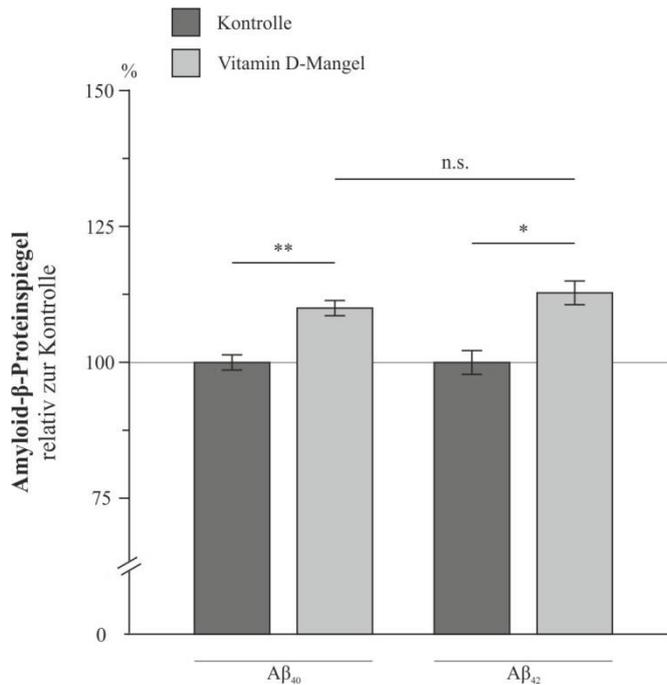


Abbildung 4 - Zerebrale A β_{40} - und A β_{42} -Proteinspiegel der Mäuse mit Vitamin D-Mangel (verändert nach GRIMM et al., 2013c und Dissertation Dr. Janine Mett, Universität des Saarlandes, 2017)

Der Einfluss eines leichten zerebralen Vitamin D-Mangelzustands auf die A β -Menge wurde durch die Bestimmung der löslichen A β_{40} - sowie A β_{42} -Proteinspiegel aus den Vitamin D-defizienten Mäusen untersucht. Die Detektion der Peptide erfolgte mittels A β -ELISA (*Mouse A β_{40} , A β_{42} ELISA Kit, Invitrogen*). Die Abbildung zeigt den zerebralen A β -Gehalt der Tiere relativ zur Kontrolle. Die Fehlerbalken stellen die mittlere Standardabweichung von vier unabhängigen Messungen (pro Messung je drei Tiere) dar.

Abbildung 4 zeigt, dass es bei einer physiologisch relevanten zerebralen 25(OH)D3-Reduktion zu einem signifikanten Anstieg des löslichen A β_{40} - ($10\% \pm 1,4\%$, $p = 0,006^{**}$), wie auch des A β_{42} -Gehalts ($12,8\% \pm 2,18\%$, $p = 0,014^*$) in den Vitamin D-defizienten Mäusen kommt. Das A β_{40} /A β_{42} -Verhältnis ist hingegen nicht signifikant verändert ($2,5\% \pm 3,0\%$, $p = 0,57$).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass eine zerebrale Hypovitaminose D zu einer Erhöhung der löslichen A β -Spiegel führt, ohne das A β_{40} /A β_{42} -Verhältnis zu beeinflussen. Der zerebrale A β -Gehalt wird von mehreren Faktoren bestimmt: U.a. kann eine gesteigerte

amyloidogene Prozessierung durch die β - und γ -Sekretase zu einem Anstieg der A β -Produktion führen. Auch *A β -degradierende Enzyme* können in ihrer Aktivität und Expression vermindert sein, was zu einem verringerten Abbau der A β -Peptide und zu deren Akkumulation führt. Im Folgenden wurden daher die möglichen Mechanismen des A β -Anstiegs unter Vitamin D-Mangelbedingungen untersucht.

4.2. Sekretase-Aktivitäten aus Vitamin D-defizienten Mäusen

4.2.1. Amyloidogene Prozessierung

Die amyloidogene APP-Prozessierung wird durch den Schnitt der β -Sekretase eingeleitet. Es entstehen das lösliche sAPP β sowie das membranständige β -CTF. Im weiteren Verlauf wird das β -CTF durch die γ -Sekretase geschnitten, wodurch A β und AICD entstehen.

4.2.1.1. Bestimmung der β -Sekretase-Aktivität

Die β -Sekretase-Aktivität wurde aus den in Saccharosepuffer homogenisierten Maushirnen bestimmt. Dazu wurden postnukleare Fraktionen (PNFs) erstellt (s. Kap. 3.9.9.1.), anschließend Membranen isoliert (s. Kap. 3.9.9.3) und die β -Sekretase-Aktivität im Zeitraum von 0-5000 Sekunden gemäß Kapitel 3.9.9.4. fluorometrisch bestimmt.

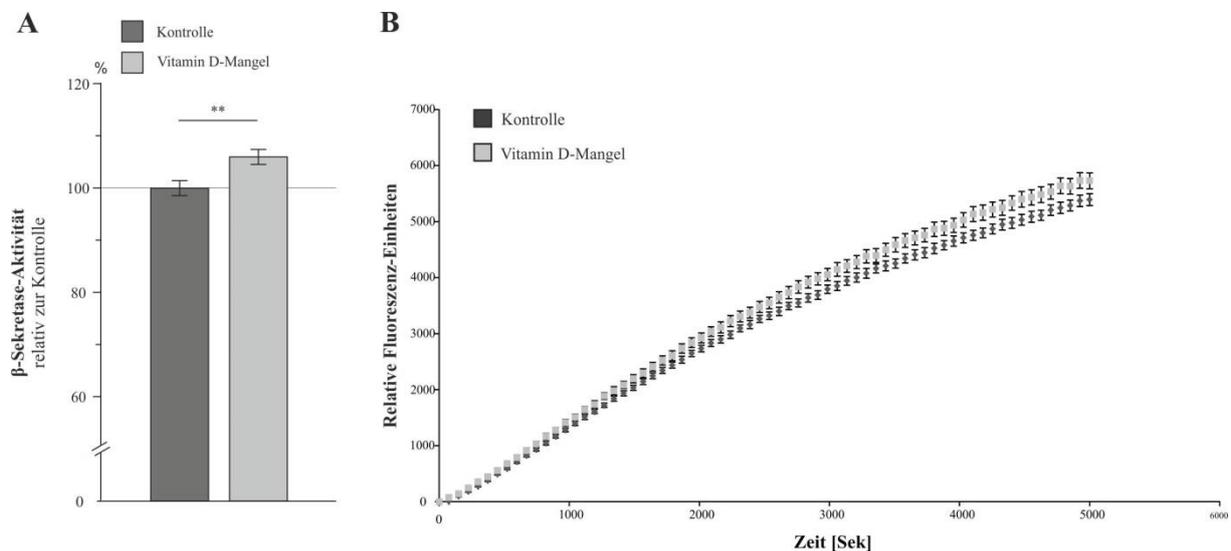


Abbildung 5 - β -Sekretase-Aktivität der Mäuse mit Vitamin D-Mangel (verändert nach GRIMM et al., 2013c)

Es wurde die β -Sekretase-Aktivität nach Membranisolation bestimmt. **A** – zeigt die β -Sekretase-Aktivität der Vitamin D-defizienten Mäuse relativ zu den Kontrolltieren. **B** – zeigt die gemittelte Enzymkinetik der β -Sekretase im Zeitraum von 0-5000 Sekunden. Die Fehlerbalken stellen die mittlere Standardabweichung von je 15 gemessenen Tieren dar.

Abbildung 5 zeigt, dass es unter Vitamin D-Mangelbedingungen zu einer signifikanten Aktivitätssteigerung der β -Sekretase um 6% ($\pm 1,44\%$, $p = 0,007^{**}$) kommt. Dies bedingt eine Verschiebung der APP-Prozessierung in Richtung des amyloidogenen Prozessierungswegs.

4.2.1.2. Bestimmung der β -Sekretase-Aktivität mit zusätzlicher 25(OH)D3-Supplementierung

* entnommen aus und modifiziert nach GRIMM *et al.*, 2017

Die unter 4.2.1.1. beschriebene β -Sekretase-Aktivitätsänderung wurde in einem zweiten Versuchsansatz reproduziert. Zusätzlich erfolgte vor der Aktivitätsbestimmung die Supplementierung von 100 nM 25(OH)D3 zu den PNFs, um mögliche *direkte Effekte* des Moleküls auf die β -Sekretase zu untersuchen.

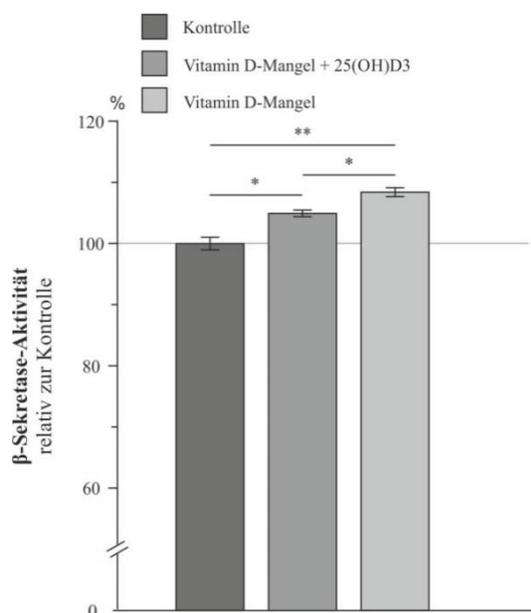


Abbildung 6 - β -Sekretase-Aktivität der Mäuse mit Vitamin D-Mangel + 25(OH)D3-Supplementierung (verändert nach GRIMM *et al.*, 2017)

Die β -Sekretase-Aktivität wurde entsprechend 4.2.1.1. bestimmt. Zusätzlich erfolgte die Messung nach Zugabe von 25(OH)D3 in den Assay-Ansatz um einen möglichen *direkten Effekt* des 25(OH)D3-Moleküls auf die β -Sekretase zu untersuchen. Die Fehlerbalken stellen die mittlere Standardabweichung von je 15 gemessenen Tieren dar.

Abbildung 6 zeigt entsprechend dem Kap. 4.2.1.1. eine signifikante Steigerung der β -Sekretase-Aktivität unter Vitamin D-Mangelbedingungen auf 108,4% ($\pm 1,2\%$, $p = 0,003^{**}$) im Vergleich zu den Kontrollen. Nach Hinzugabe von Calcidiol zeigt sich eine signifikante Reduktion der Aktivität in Richtung des Kontroll-Niveaus auf 104,9% ($\pm 0,9\%$, $p = 0,03^*$), welches jedoch nicht erreicht wird. Folglich müssen weitere, *indirekte Effekte*, wie

beispielsweise eine veränderte Expression oder ein veränderter Proteinspiegel beteiligt sein, die im Folgenden untersucht wurden (siehe ab 4.2.1.4.)

4.2.1.3. Bestimmung der sAPP β -Proteinspiegel

Als Spaltprodukte entstehen beim APP-Schnitt der β -Sekretase sAPP β und das membranständige β -CTF. β -CTF wird anschließend durch die γ -Sekretase geschnitten, sodass die β -CTF-Proteinspiegel sowohl von der Aktivität der β -, als auch der γ -Sekretase abhängig sind. sAPP β hingegen wird durch kein weiteres Prozessierungsenzym geschnitten und reflektiert somit, abgesehen von einer unspezifischen Degradation, die β -Sekretase-Aktivität. Folglich wurde zur Verifizierung der gesteigerten Aktivität von BACE1 eine Western-Blot-Analyse der sAPP β -Proteinspiegel aus Maushirnhomogenaten durchgeführt. sAPP β wurde mit Hilfe des Antikörpers *sAPP beta – Wild Type antibody* detektiert, der eine Reaktivität gegen ein C-terminales Epitop von sAPP β besitzt (CITRON et al., 1992).

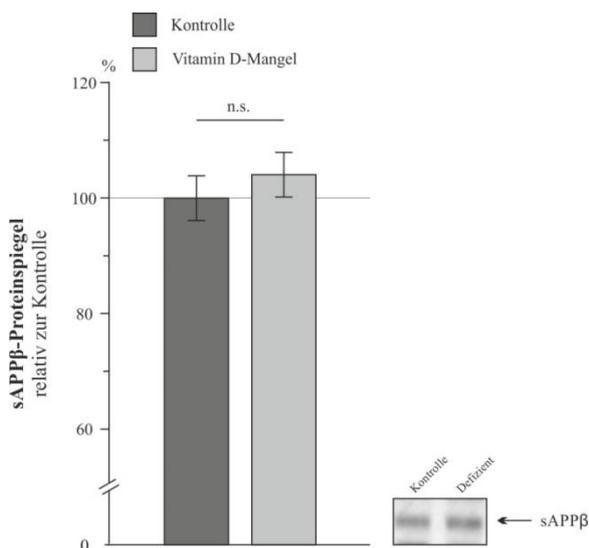


Abbildung 7 - sAPP β -Proteinspiegel der Mäuse mit Vitamin D-Mangel

Die Maushirnhomogenate wurden nachlysiert und die sAPP β -Proteinspiegel mittels Western-Blot-Analyse bestimmt. Die Abbildung zeigt die sAPP β -Proteinspiegel der Vitamin D-defizienten Mäuse relativ zur Kontrolle. Die Fehlerbalken stellen die mittlere Standardabweichung von acht unabhängigen Messungen dar.

Im Vergleich zu den Kontrolltieren zeigt sich in den Vitamin D-Mangel Mäusen ein nicht signifikanter Anstieg der sAPP β -Proteinspiegel (Abbildung 7). Mit 4,06% (\pm 3,87%, $p = 0,47$ n.s.) spiegelt er dennoch die mittlere Aktivitätssteigerung der β -Sekretase von 6 % wider und unterscheidet sich von dieser nicht signifikant ($p = 0,29$ n.s.). Beim Western-Blot ist eine durchschnittliche Messstandardabweichung von 5-10% zu erwarten. Somit wären zum Erreichen eines signifikanten Ergebnisses unter Anwendung eines zweiseitigen ungepaarten Student's t-test bei einer Aktivitätssteigerung der β -Sekretase um 6% rein rechnerisch 25

Proben notwendig (Fundamental's of Biostatistics, Rosner B.). Da diese Menge an Tieren nicht zur Verfügung stand, kann die Statistik hier nur begrenzt eine Aussage über die Irrtumswahrscheinlichkeit liefern.

4.2.1.4. Western-Blot-Analyse der BACE1-Proteinspiegel

Um einen potentiellen *indirekten Einfluss* von Vitamin D auf die BACE1-Aktivität zu untersuchen, wurden die BACE1-Proteinspiegel mittels Western-Blot-Analyse ermittelt. BACE1 wurde mit Hilfe der Antikörper *Anti-BACE (Ab-2) (485-501) [PC529 Merck Millipore]* bzw. *Anti-BACE1 antibody [ab2077 Abcam]* detektiert.

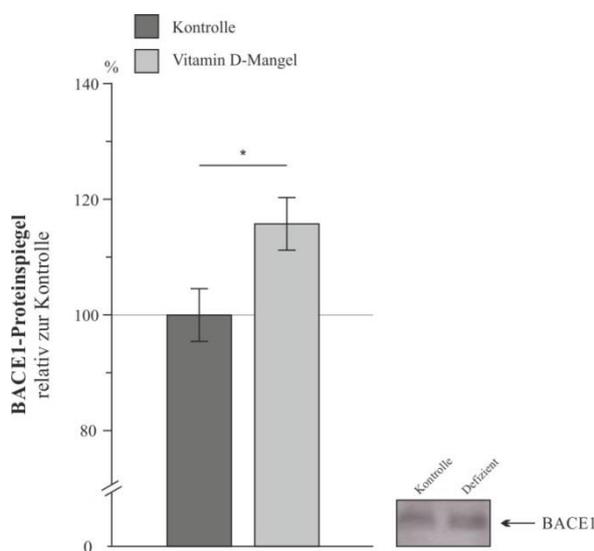


Abbildung 8 - BACE1-Proteinspiegel der Mäuse mit Vitamin D-Mangel (verändert nach GRIMM et al., 2013c und Dissertation Dr. Janine Mett, Universität des Saarlandes, 2017)

Mittels Western-Blot-Analyse wurden die BACE1-Proteinspiegel der Vitamin D-defizienten Tiere relativ zur Kontrolle bestimmt. Die Abbildung zeigt die BACE1-Proteinspiegel von je acht Mäusen. Die Fehlerbalken stellen die mittlere Standardabweichung dar.

Abbildung 8 zeigt, dass die BACE1-Proteinspiegel der Vitamin D-defizienten Tiere im Vergleich zu den Kontrollmäusen signifikant erhöht sind (16%; $\pm 4,56\%$; $p = 0,028^*$). Zusätzlich zeigt sich ein signifikanter Unterschied von 9,8% zwischen der β -Sekretase-Aktivität (106%; $\pm 1,43\%$) und der BACE1-Proteinmenge ($p = 0,009^{**}$).

Die bei dem Vitamin D-Mangel erhöhten BACE1-Proteinspiegel können u.a. zwei Ursachen haben: Entweder könnte eine gesteigerte BACE1 *de novo Synthese* durch eine erhöhte Transkription und Translation oder eine *verringerte BACE1-Proteindegradation* dieses Ergebnis erklären. Der Einfluss auf die Transkription wurde mittels RT-PCR untersucht. Die *BACE1-Proteindegradation* wurde im Folgenden nicht weiter untersucht, da diese klassischer

Weise mit Hilfe eines radioaktiven „*Pulse-Chase*“-*Experiments* untersucht werden würde. Dies stellt sich jedoch im *in vivo* System als schwierig dar.

4.2.1.5. Bestimmung der *Bace1*-Genexpression

Wie unter 4.2.1.4. bereits erwähnt, wurde die *Bace1*-Genexpression mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) untersucht (s. Kap. 3.8.). Als Fluoreszenz-Farbstoff wurde in der gesamten Arbeit *SYBR-Green* verwendet. Die Maushirnhemisphären wurden in Trizol homogenisiert, die RNS isoliert und diese anschließend in cDNS umgeschrieben. Als konstitutiv exprimiertes Gen (*engl.: housekeeping gene*) wurde β -Aktin verwendet. Die Auswertung erfolgte mittels $\Delta/\Delta Ct$ -Methode nach Livak und Schmittgen.

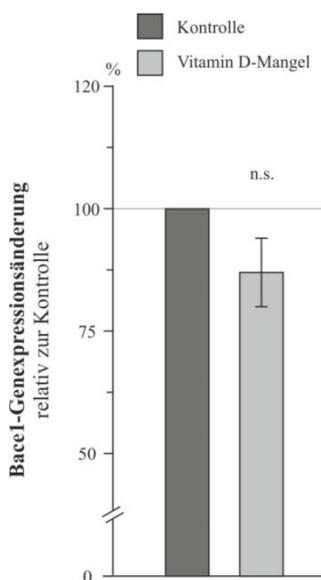


Abbildung 9 - *Bace1*-Genexpression der Mäuse mit Vitamin D-Mangel

Die *Bace1*-Genexpression wurde mittels RT-PCR untersucht. Die Abbildung zeigt die *Bace1*-Genexpression relativ zur Kontrolle. Der Fehlerbalken stellt die mittlere Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen dar.

Abbildung 9 zeigt, dass die Mäuse mit Vitamin D-Mangel eine reduzierte, jedoch nicht signifikante *Bace1*-Genexpression auf 87% ($\pm 7\%$, $p = 0,15$ n.s.) aufweisen.

Zusammenfassend führt eine Vitamin D-Mangelsituation, die über einen gewissen Zeitraum besteht, zu einer Aktivitätssteigerung der β -Sekretase (s. Kap. 4.2.1.1.). Dieser Effekt ist auf eine BACE1-Proteinspiegelerhöhung zurückzuführen (s. Kap. 4.2.1.4.), wobei die *Bace1*-Genexpression nicht signifikant verändert ist (s. Kap. 4.2.1.5.). Des Weiteren hat 25(OH)D3 einen *direkten Einfluss* auf die β -Sekretase-Aktivität (s. Kap. 4.2.1.2.).

4.2.1.6. Bestimmung der γ -Sekretase-Aktivität

Wie bereits oben beschrieben spaltet die γ -Sekretase das membranständige β -CTF innerhalb seiner Transmembrandomäne, wodurch A β und AICD gebildet werden.

Um eine Aktivitätsveränderung der γ -Sekretase unter leichten Vitamin D-Mangelbedingungen zu untersuchen, wurde wie unter 4.2.1.1. beschrieben vorgegangen und die Aktivität im Zeitraum von 1800-5400 Sekunden fluorimetrisch bestimmt.

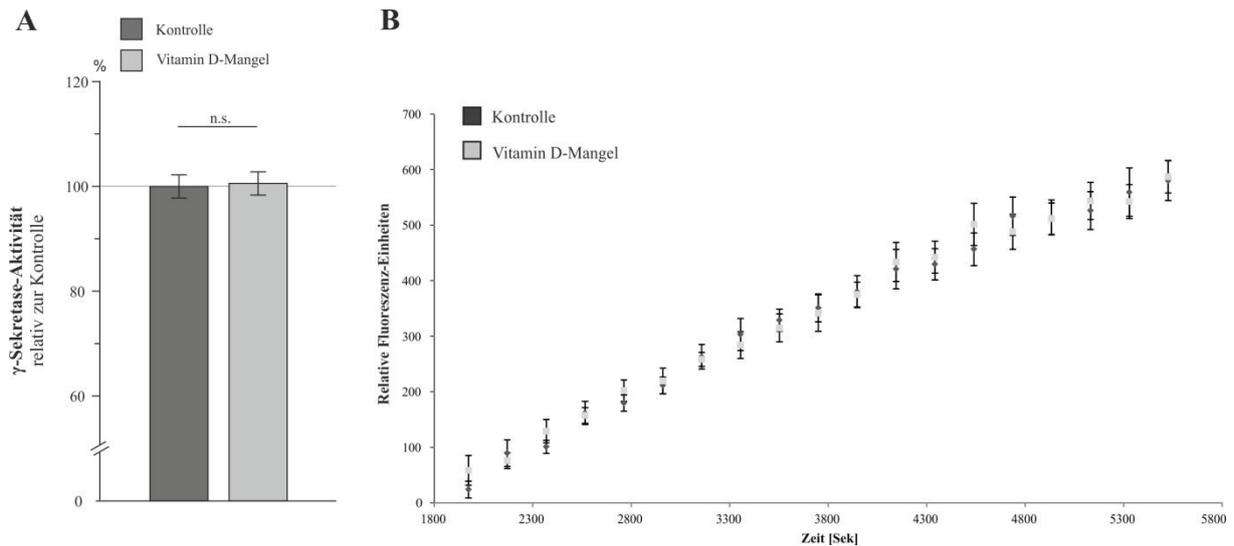


Abbildung 10 - γ -Sekretase-Aktivität der Mäuse mit Vitamin D-Mangel

Zur fluorimetrischen Bestimmung der γ -Sekretase-Aktivität wurden dieselben Membranpräparationen wie unter 4.2.1.1. verwendet. **A** – zeigt die γ -Sekretase-Aktivität der Vitamin D-defizienten Mäuse relativ zu den Kontrollen. **B** - zeigt die Kinetik der γ -Sekretase im Zeitraum von 1800-5400 Sekunden. Die Fehlerbalken stellen die mittlere Standardabweichung von 13 unabhängigen Messungen dar.

Abbildung 10 zeigt, dass im Gegensatz zur β -Sekretase keine signifikante Aktivitätssteigerung der γ -Sekretase ($0,96\% \pm 3,70\%$, $p = 0,86$ n.s.) relativ zur Kontrolle zu beobachten ist.

4.2.1.7. Western-Blot-Analyse der Nicastrin-Proteinspiegel

Zur Verifizierung der Ergebnisse aus 4.2.1.6. wurden die Nicastrin-Proteinspiegel aus den Maushirnen untersucht. Nicastrin stellt eine essentielle Untereinheit des γ -Sekretase-Komplexes dar. Im Gegensatz zu Presenilin (PS 1 oder 2) und dem Anterior Pharynx Defective 1 Homolog (APH1 a oder b), gibt es bei Nicastrin nur eine Isoform, welche an der Bildung des multimerischen Komplexes beteiligt ist. Aus diesem Grund wurden die Nicastrin-Proteinspiegel hier stellvertretend für die γ -Sekretase untersucht.

Aus Maushirnlysaten wurden mittels Western-Blot-Analyse die Nicastrin-Proteinspiegel der

Tiere mit Vitamin D-Mangel relativ zu den Kontrollen untersucht. Zur Proteindetektion wurde der Antikörper *Anti-Nicastrin antibody [N1660 Sigma Aldrich]* verwendet.

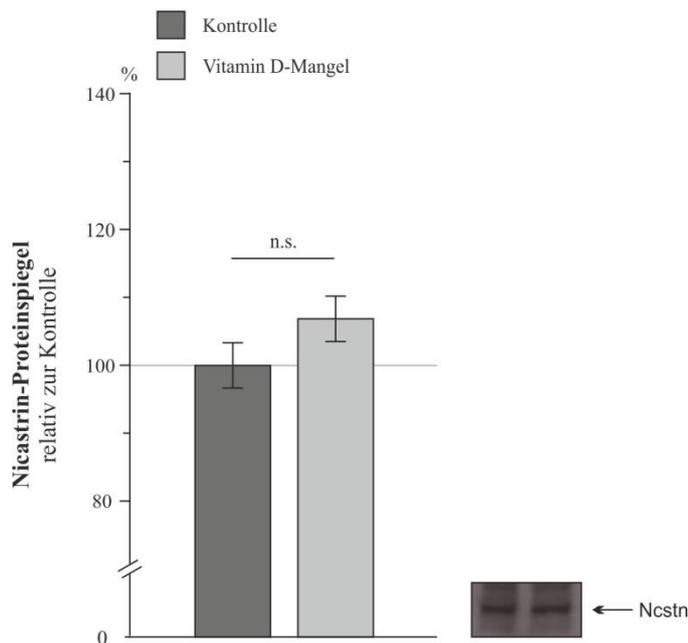


Abbildung 11 - Nicastrin-Proteinspiegel der Mäuse mit Vitamin D-Mangel

Nicastrin stellt eine essentielle Untereinheit des multimerischen γ -Sekretase-Komplexes dar. Die Abbildung zeigt den Nicastrin-Proteinspiegel der Vitamin D-defizienten Tiere relativ zur Kontrolle. Die Fehlerbalken stellen die mittlere Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen dar.

Abbildung 11 zeigt, dass es unter leichten Vitamin D-Mangelbedingungen zu keiner signifikanten Veränderung der Nicastrin-Proteinspiegel ($6,86\% \pm 3,34\%$, $p = 0,22$ n.s.) kommt. Aufgrund der bisherigen Ergebnisse sind Veränderungen im einstelligen Prozentbereich zu erwarten. Bei der verwendeten Stichprobenzahl ist kritisch anzumerken, dass diese bei gegebener Standardabweichung nicht ausreicht um ein signifikantes Ergebnis zu erhalten. Die Probenzahl wurde durch die Menge der defizienten Mäuse begrenzt, auf die kein Einfluss genommen werden konnte. Es ist daher nicht auszuschließen, dass es bei einem stärkeren Vitamin D-Mangel oder bei einer höheren Stichprobenzahl zu einer signifikanten Änderung der γ -Sekretase-Aktivität kommen würde.

4.2.1.8. Genexpressionsanalyse der γ -Sekretase-Untereinheiten

Da es sich bei dem γ -Sekretase-Komplex um einen multimerischen Komplex handelt und die Zusammensetzung variabel ist (s. Kap. 2.3.2.2.), wurde trotz fehlender γ -Sekretase-Aktivitäts- und der nicht signifikanten Nicastrin-Proteinspiegeländerung abschließend die Genexpression der unterschiedlichen Untereinheiten unter Vitamin D-Mangelbedingungen mittels Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion bestimmt. Hierdurch sollte geklärt werden, ob

einzelne Untereinheiten potentiell in ihrer Genexpression verändert sind bzw. ob gegebenenfalls Proteinspiegel, Expression und Aktivität einen ähnlichen, wenn auch nicht signifikanten, Trend aufweisen.

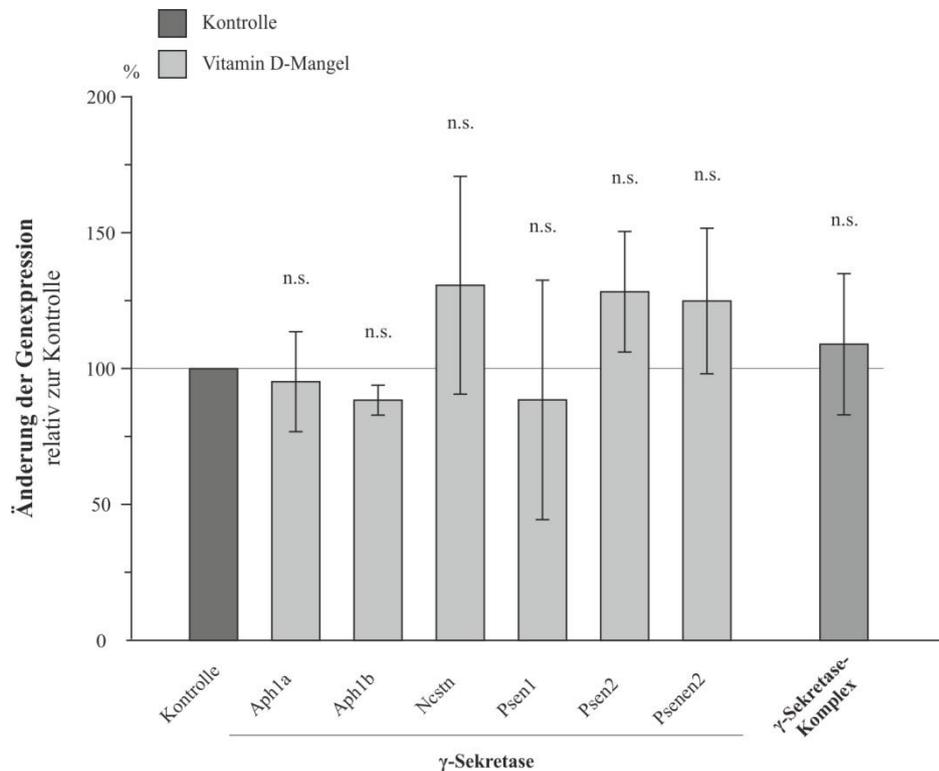


Abbildung 12 - Genexpressionsanalyse der γ -Sekretase-Untereinheiten der Mäuse mit Vitamin D-Mangel

Die γ -Sekretase ist ein multimerischer Enzymkomplex. Dieser setzt sich aus vier Untereinheiten zusammen: *Aph1a* oder *b* (Anterior Pharynx Defective 1 Homolog), *Psen1* oder *Psen2* (Presenilin 1 oder 2), *Psenen2* (Presenilin Enhancer 2), *Ncstn* (Nicastrin). Die Abbildung zeigt die Genexpressionsanalyse der verschiedenen Untereinheiten relativ zur Kontrolle. Die Fehlerbalken stellen die mittlere Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen dar. Der Balken „ γ -Sekretase-Komplex“ sowie dessen Fehlerbalken repräsentieren die gemittelten Werte aller Untereinheiten.

Abbildung 12 zeigt die Expression der verschiedenen Gene relativ zur Kontrolle: *Aph1a* ($95\% \pm 18\%$, $p = 0,81$ n.s.), *Aph1b* ($88\% \pm 6\%$; $p = 0,11$ n.s.), *Ncstn* ($131\% \pm 40\%$, $p = 0,49$ n.s.), *Psen1* ($89\% \pm 41\%$, $p = 0,79$ n.s.), *Psen2* ($128\% \pm 22\%$, $p = 0,27$ n.s.), *Psenen2* ($125\% \pm 27\%$, $p = 0,41$ n.s.). Auch hier zeigt sich weder eine signifikante Veränderung einer der Untereinheiten, noch des gesamten γ -Sekretase-Komplexes ($109\% \pm 26\%$, $p = 0,29$ n.s.) nach Verrechnung aller Untereinheiten. Die *Ncstn*-Genexpression unterscheidet sich nicht signifikant von den in Kap. 4.2.1.7. bestimmten Proteinspiegeln ($p = 0,59$ n.s.).

Zusammengefasst zeigt sich unter den hier gewählten experimentellen Bedingungen, sowohl eine leichte Erhöhung der γ -Sekretase-Aktivität (s. Kap. 4.2.1.6.), wie auch der Nicastrin-Proteinspiegel (s. Kap. 4.2.1.7.) und der Genexpression (s. Kap. 4.2.1.8.). Da keine weiteren

Vitamin defizienten Mäuse zur Verfügung standen, wurde durch Zellkulturexperimente, wie in Kapitel 4.4.2.3. beschrieben, ein potentieller Effekt von Vitamin D auf die γ -Sekretase überprüft.

4.2.2. Nicht-amyloidogene Prozessierung

Nach der Analyse der *amyloidogenen* APP-Prozessierung, wurde im Folgenden der Einfluss einer Vitamin D-Defizienz auf den *nicht-amyloidogenen* Prozessierungsweg untersucht. Dieser wird mit dem Schnitt der α -Sekretase innerhalb der A β -Domäne des APP-Moleküls initiiert und verhindert somit die Bildung des A β -Peptids. ADAM10 und ADAM17 gelten als Hauptvertreter der katalytischen Aktivität der α -Sekretase, wobei ADAM10 das dominante Enzym innerhalb des Gehirngewebes ist.

Im Folgenden wurde zunächst die α -Sekretase-Aktivität der Vitamin D-defizienten Tiere untersucht.

4.2.2.1. Bestimmung der α -Sekretase-Aktivität

Aus den Maushirnhomogenaten wurden, wie oben bereits beschrieben, PNFs erstellt und nach der Membranpräparation die α -Sekretase-Aktivität gemäß Kap. 3.9.9.4. fluorometrisch bestimmt.

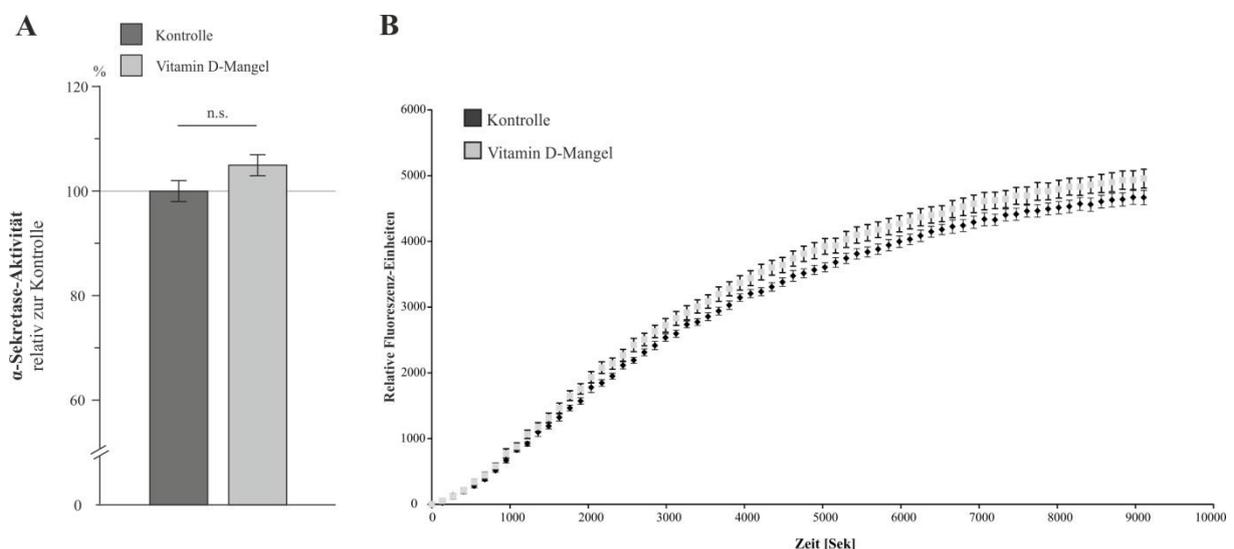


Abbildung 13 - α -Sekretase-Aktivität der Mäuse mit Vitamin D-Mangel

PNFs wurden erstellt, die Membranen präpariert und die α -Sekretase-Aktivität fluorometrisch bestimmt. **A** – zeigt die Aktivität der α -Sekretase relativ zur Kontrolle. **B** – zeigt die Kinetik im Zeitraum von 0-10000 Sekunden. Die Fehlerbalken stellen die mittlere Standardabweichung von 12 unabhängigen Messungen dar.

Abbildung 13 zeigt die leicht erhöhte, jedoch nicht signifikante Aktivitätssteigerung der α -Sekretase relativ zur Kontrolle ($4,96\% \pm 2,01\%$, $p = 0,06$ n.s.) sowie die Kinetik der α -Sekretase im Zeitraum von 0-10000 Sekunden.

4.2.2.2. Western-Blot-Analyse der ADAM10- und ADAM17-Proteinspiegel

Aufgrund der tendenziell erhöhten α -Sekretase-Aktivität und dem Erreichen eines nahezu signifikanten Niveaus, wurden die ADAM10- und ADAM17-Proteinspiegel aus den Maushirnen mittels Western-Blot-Analyse bestimmt. Zur Detektion der Proteine wurden die Antikörper *Anti-ADAM10 (735-749) [422751 Calbiochem]* und *Anti-ADAM17 antibody [ab39162 Abcam]* verwendet.

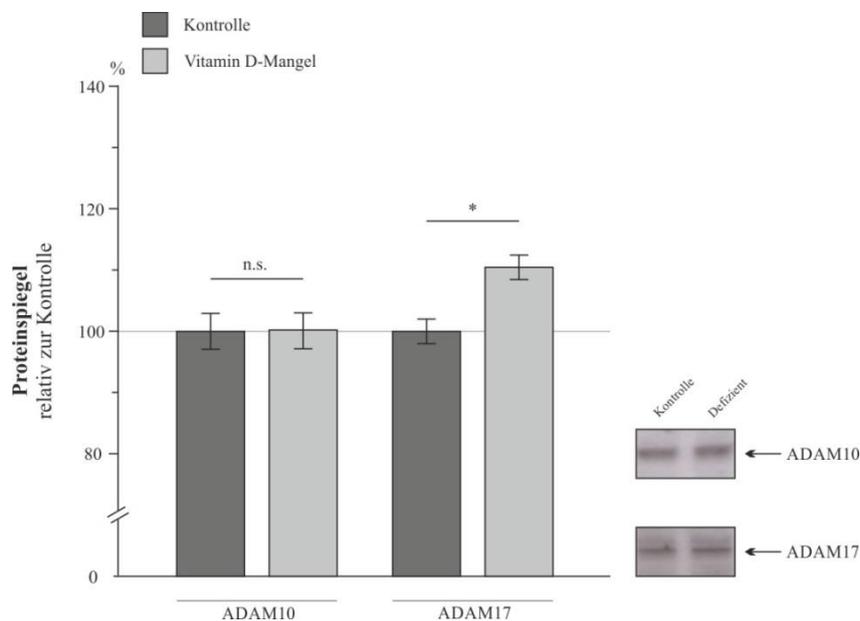


Abbildung 14 - ADAM10- und ADAM17-Proteinspiegel der Mäuse mit Vitamin D-Mangel

Die Hauptvertreter der α -Sekretase-Aktivität sind die beiden Disintegrin-Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17. Die Abbildung zeigt die Proteinspiegel der beiden Enzyme in Vitamin D-Mangel Mäusen relativ zu deren Kontrollen. Die Fehlerbalken stellen die mittlere Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen dar.

Abbildung 14 zeigt die ADAM10- und ADAM17-Proteinspiegel relativ zur Kontrolle: Während ADAM10 keine signifikante Veränderung aufweist ($0,22\% \pm 2,93\%$, $p = 0,96$ n.s.), sind die ADAM17-Proteinspiegel signifikant um $10,46\%$ ($\pm 2\%$, $p = 0,03^*$) gesteigert.

4.2.2.3. Bestimmung der Adam17-Genexpression

Zur Untersuchung einer veränderten *Adam17*-Genexpression unter leichten Vitamin D-Mangelbedingungen, die die gesteigerten Proteinspiegel erklären würde, wurde eine RT-PCR durchgeführt.

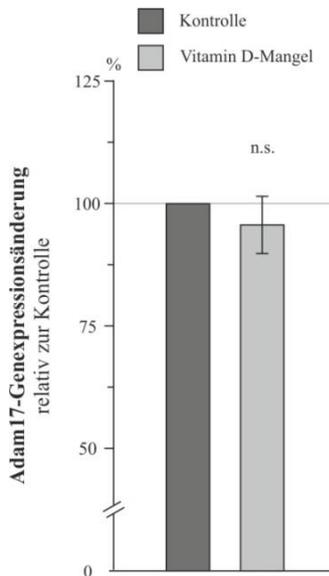


Abbildung 15 - Adam17-Genexpression der Mäuse mit Vitamin D-Mangel

Die *Adam17*-Genexpression wurde mittels RT-PCR überprüft. Die Abbildung zeigt die *Adam17*-Genexpression relativ zur Kontrolle. Der Fehlerbalken stellt die mittlere Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen dar.

Trotz der gesteigerten ADAM17-Proteinspiegel, zeigt sich hier keine signifikante Veränderung der Genexpression ($94\% \pm 8\%$, $p = 0,50$ n.s.).

Während bei der γ -Sekretase sowohl bei Aktivität, Proteinspiegel und Expression vergleichbare Ergebnisse erzielt werden konnten, zeigte sich bezüglich der α -Sekretase kein einheitlicher Trend. Da kein weiteres Gewebe aus Vitamin D-defizienten Mäusen zur Verfügung stand, wurde versucht im Zellkulturmodell den Einfluss von Vitamin D auf die α -Sekretase weiter zu eruieren.

4.3. Die A β -Degradation aus Vitamin D-defizienten Mäusen

Neben der A β *de novo*-Synthese durch den amyloidogenen APP-Prozessierungsweg, wird der zerebrale A β -Spiegel maßgeblich durch die *A β -Degradation* beeinflusst. Es wird angenommen, dass im Gehirn gesunder Menschen ca. 8% der löslichen A β -Spezies pro Stunde durch A β -degradierende Enzyme umgesetzt werden (BATEMAN et al., 2006). Verschiedene Proteasen werden als A β -Degradationsenzyme diskutiert, wie bereits in Kap.

2.3.3. dargelegt wurde. Im Folgenden wurde untersucht, ob neben der *de novo* Synthese die *A β -Degradation* in einer Vitamin D-Mangelsituation verändert ist.

4.3.1. Bestimmung der A β -Gesamtdegradation

* entnommen aus und modifiziert nach GRIMM *et al.*, 2017

Es wurde eine Änderung der A β -Gesamtdegradation unter Vitamin D-Mangelbedingungen mit und ohne zusätzliche 25(OH)D₃-Supplementierung untersucht. Hierzu wurden Maushirnhomogenate mit synthetischem A β ₄₀ inkubiert und das verbleibende A β anschließend mittels W02-Antikörper detektiert.

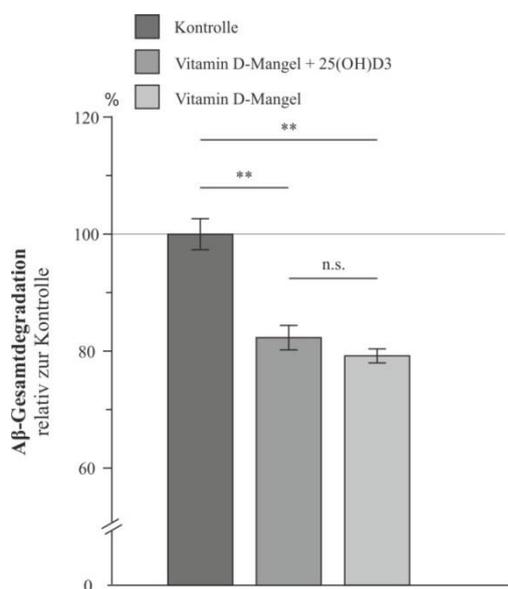


Abbildung 16 - A β -Gesamtdegradation der Mäuse mit Vitamin D-Mangel + 25(OH)D₃-Supplementierung (verändert nach GRIMM *et al.*, 2017)

Synthetisches A β ₄₀ wurde in einer Konzentration von 1 μ g/ml für eine Stunde mit Kontroll- und Vitamin D-Mangel-Maushirnhomogenaten inkubiert. Zusätzlich wurde zu den Vitamin D-defizienten Homogenaten 25(OH)D₃ gegeben, um einen möglichen *direkten Effekt* des Moleküls auf die Gesamtdegradation zu beurteilen. Die Abbildung zeigt die A β -Gesamtdegradation (Kehrwert der verbleibenden A β ₄₀-Menge) relativ zur Kontrolle. Die Fehlerbalken stellen die mittlere Standardabweichung von drei (Vitamin D-Mangel und Vitamin D-Mangel + 25(OH)D₃) bzw. vier (Kontrolle) unabhängigen Messungen dar.

Abbildung 16 zeigt eine signifikante A β -Gesamtdegradationsreduktion unter Vitamin D-Mangelbedingungen im Vergleich zu den Kontrollen auf 79,2% (\pm 1,2%, $p = 0,002^{**}$). Eine Supplementierung mit 25(OH)D₃ führt zu Steigerung der A β -Degradation im Vergleich zur unsupplementierten Mangelsituation, welche jedoch kein signifikantes Niveau erreicht (82,3% \pm 2,1%, $p = 0,23$ n.s.). Da homogenisiertes Gewebe mit Vitamin D supplementiert wurde, in dem keine Transkription und Translation stattfinden kann, ist zu vermuten, dass die durch die Vitamin D-Supplementierung verursachte Steigerung der A β -Degradation auf einen

direkten Effekt von 25(OH)D₃ auf die Degradationsenzyme zurückzuführen ist. Die Supplementierung bewirkte jedoch keine Steigerung der A β -Degradation auf das Niveau der Kontroll-Mäuse, sodass bei den Kontroll-Mäusen im Vergleich zu den defizienten Mäusen zusätzlich auch *indirekte Effekte* wie Expression oder veränderte Proteinspiegel beteiligt sein könnten, welche in den folgenden Kapiteln untersucht wurden.

4.3.2. Bestimmung der Neprilysin-Aktivität

Neprilysin gilt als zentrales A β -degradierendes Enzym im Gehirn (SHIROTANI et al., 2001). Um die Neprilysin-Aktivität zu untersuchen, wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Janine Mett eine Neprilysin-spezifische FRET-basierte Aktivitätsbestimmung entwickelt. Die Spezifität dieses Assays wurde durch einen vorangehenden NEP-ELISA erhöht (GRIMM et al., 2015).

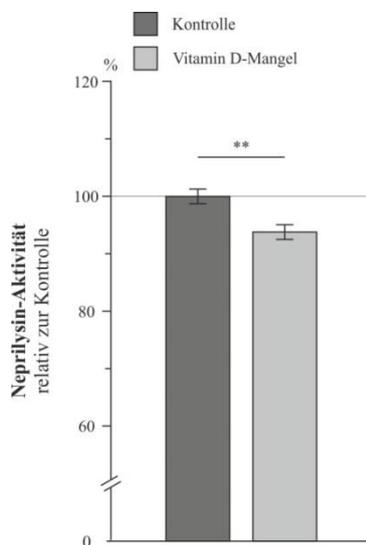


Abbildung 17 - Neprilysin-Aktivität der Mäuse mit Vitamin D-Mangel (verändert nach GRIMM et al., 2013c und Dissertation Dr. Janine Mett, Universität des Saarlandes, 2017)

Die Abbildung zeigt die Neprilysin-Aktivität relativ zur Kontrolle. Die Fehlerbalken stellen die mittlere Standardabweichung von zehn unabhängigen Messungen dar.

Abbildung 17 zeigt eine signifikante Aktivitätsreduktion von Neprilysin um 7% ($\pm 1,28\%$, $p = 0,003^{**}$) in den Mäusen mit Vitamin D-Mangel im Vergleich zu den Kontrolltieren. Aufgrund des Fehlens eines suffizienten Antikörpers zur Western-Blot-Analyse der NEP-Proteinspiegel, wurde im Folgenden direkt die NEP-Genexpression untersucht.

4.3.3. Bestimmung der Nep-Genexpression

Um die Ursache der nachgewiesenen Neprilysin-Aktivitätsminderung zu untersuchen, wurde die Neprilysin-Genexpression mittels RT-PCR bestimmt.

Abbildung 18 zeigt eine signifikante Reduktion der Neprilysin-Genexpression (83%; $\pm 5,24\%$, $p = 0,009^{**}$) relativ zur Kontrolle.

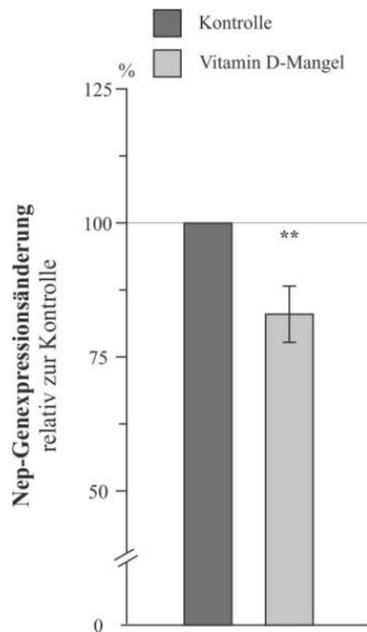


Abbildung 18 - Nep-Genexpression der Mäuse mit Vitamin D-Mangel (verändert nach GRIMM et al., 2013c)

Die Neprilysin-Genexpression wurde mittels RT-PCR untersucht. Die Abbildung zeigt die *Nep*-Genexpression relativ zur Kontrolle. Der Fehlerbalken stellt die mittlere Standardabweichung von sechs unabhängigen Messungen dar.

4.3.4. Bestimmung der IDE-Aktivität

Neben Neprilysin, kommt IDE eine wichtige Rolle bei der Degradation von A β im lebenden System zu (FARRIS et al., 2003). Zur Untersuchung einer Veränderung der IDE-Aktivität unter Vitamin D-Mangelbedingungen, wurde diese aus den Mäusen bestimmt. In Kooperation mit Dr. Janine Mett wurde eine FRET-basierte IDE-Aktivitätsmessung entwickelt. Die Spezifität des Assays wurde durch Zugabe verschiedener Inhibitoren erhöht (s. Kap. 3.9.11).

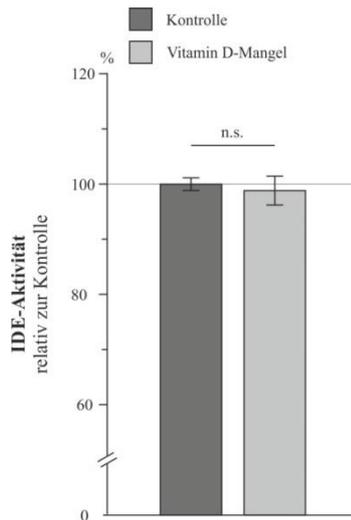


Abbildung 19 - IDE-Aktivität der Mäuse mit Vitamin D-Mangel

Die Enzymaktivität wurde fluorometrisch bestimmt. Die Abbildung zeigt die IDE-Aktivität relativ zur Kontrolle. Die Fehlerbalken stellen die mittlere Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen dar.

Abbildung 19 zeigt, dass IDE im Gegensatz zu Neprilysin keine signifikante Aktivitätsveränderung unter Vitamin D-Mangelbedingungen aufweist ($-1,46\% \pm 3,28\%$, $p = 0,7$ n.s.).

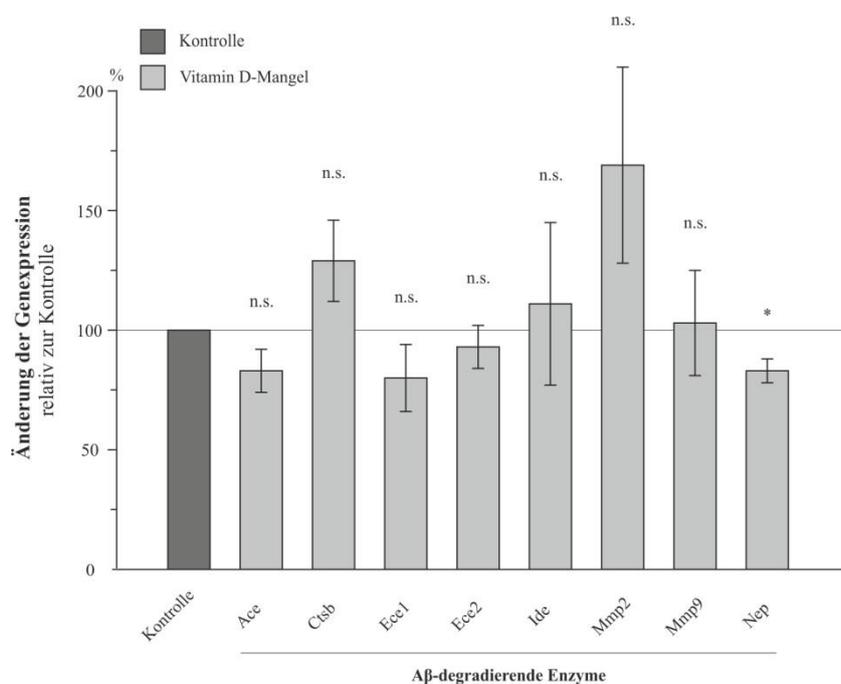
4.3.5. Genexpressionsanalyse der A β -degradierenden Enzyme

Um abschließend die Veränderung der Expression weiterer A β -degradierender Enzyme, inklusive IDE, unter Vitamin D-Mangelbedingungen zu untersuchen, wurde die Genexpression der unter 2.3.3. aufgeführten Proteasen per RT-PCR untersucht. Tabelle 19 fasst die Messergebnisse zusammen.

Tabelle 19 - Ergebnisse der Degradationsenzym-Genexpressionsanalyse aus Vitamin D-defizienten Mäusen

Die Tabelle zeigt den Mittelwert (MW), die mittlere Standardabweichung (StabWM), den t-Test sowie die Anzahl der Messungen (n-Zahl) der A β -degradierenden Enzyme: Ace (Angiotensin converting enzyme), Ctsb (Cathepsin B), ECE-1 und -2 (endothelin converting enzyme 1 und 2), IDE (insulin degrading enzyme), Mmp2 und 9 (Matrix metalloproteinases 2 und 9), Nep (Neprilysin), Plg (Plasminogen).

A β degradierendes-Enzym	MW [%]	StabWM [%]	t-Test	n-Zahl
<i>Ace</i>	83	9	0,12	3
<i>Ctsb</i>	129	17	0,17	3
<i>ECE-1</i>	80	14	0,18	6
<i>ECE-2</i>	93	9	0,49	6
<i>IDE</i>	111	34	0,76	3
<i>Mmp2</i>	169	41	0,16	3
<i>Mmp9</i>	103	22	0,89	3
<i>Nep</i>	83	5	0,01*	6

**Abbildung 20 - Expressionsanalyse der A β -degradierenden Enzyme aus Vitamin D-defizienten Mäusen**

Die Genexpressionsanalyse wurde mittels RT-PCR durchgeführt. Die Absolutwerte der Messungen sind Tabelle 19 zu entnehmen. Die Abbildung zeigt die Expression der einzelnen Enzyme. Die Fehlerbalken stellen die mittlere Standardabweichung der Messungen dar.

Wie Tabelle 19 und Abbildung 20 verdeutlichen, zeigt ausschließlich Neprilysin, wie bereits unter 4.3.3. beschrieben, eine signifikante Reduktion seiner Genexpression, wohingegen die Expression der restlichen Degradationsenzyme nicht signifikant verändert ist.

Damit lässt sich zusammenfassen, dass neben der APP-Prozessierung auch die A β -Degradation unter milden bis moderaten Vitamin D-Mangelbedingungen verändert ist. Unter

den hier gewählten Bedingungen zeigt jedoch ausschließlich Neprilysin eine signifikante Änderung seiner Aktivität und Genexpression.

4.4. Zellkultur – Inkubation von SH-SY5Y- und N2a-Zellen mit 25(OH)D3

Im Folgenden wurden SH-SY5Y- und N2a-Zellen wie in Kapitel 3.7.4. beschrieben kultiviert. Zur Simulation einer physiologischen Vitamin D-Substitution wurden die Zellen mit einer 25(OH)D3-Konzentration von 100 nmol/l inkubiert. Es wurde 25(OH)D3 verwendet, da dies der Vitamin D-Metabolit mit der längsten Halbwertszeit aufgrund seiner hohen Affinität zum DBP ist. Es konnte gezeigt werden, dass unter der gewählten Konzentration die Zytotoxizität unter 3% lag (GRIMM et al., 2017). Es ist bekannt, dass das verwendete FBS im Zellkulturmedium als Vitamin D-Quelle dient und abhängig von der verwendeten Charge unterschiedliche Konzentrationen der Vitamin D-Spezies vorliegen (Vitamin D, 25(OH)D3, 1,25(OH)2D3). Nelson *et al.* zeigten in diesem Zusammenhang beispielsweise, dass die 25(OH)D3-Serumkonzentration von Kälbern in Amerika abhängig von der Jahreszeit und geographischen Lage zwischen 10-50 ng/ml liegt (NELSON et al., 2016). Während im vorangegangenen Kapitel die Auswirkung einer Vitamin D-Defizienz untersucht wurde, sollte im Folgenden der Einfluss einer zusätzlichen Vitamin D-Supplementierung unter bereits physiologischer Vitamin D-Versorgung bestimmt werden. Die Zellen wurden auf zwei unterschiedliche Weisen inkubiert:

1. *Kurzzeitinkubation* – hier wurden SH-SY5Y- und N2a-Zellen für 24 h (8 + 16 h) mit 25(OH)D3 inkubiert und anschließend für die entsprechenden Versuche verwendet.
2. *Langzeitinkubation* – um die Einstellung einer Vitamin D- und A β -Homöostase zu ermöglichen, wurde wie folgt vorgegangen: Die Zellen wurden für einen Zeitraum von *mindestens vier Wochen* in 5% FBS haltigen Medium mit zusätzlich 100 nM 25(OH)D3 kultiviert. Die Kontrollzellen wurden für denselben Zeitraum mit der äquivalenten Menge an Ethanol als Lösungsmittelkontrolle kultiviert. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt, um eine suffiziente Versorgung mit Nährstoffen (inklusive Mikronährstoffen wie den verschiedenen Vitamin D-Spezies (s.o.)) und exogenem 25(OH)D3 sicherzustellen. Nach Erreichen der Konfluenz wurde ein Teil der Zellen entsprechend Kapitel 3.7.1. auf neue Schalen überführt. Es wurde sich für eine Reduktion des FBS-Gehalts auf 5% entschieden, um eine Vitamin D-Zufuhr über das FBS möglichst gering zu halten. Gleichzeitig besteht eine ausreichende Nährstoffzufuhr ohne erhöhten Zelluntergang.

Es wurde zunächst der Einfluss von 25(OH)D3 auf den A β -Gehalt in SH-SY5Y-Zellen nach Kurzzeitinkubation untersucht.

4.4.1. Bestimmung des A β -Gehalts aus SH-SY5Y-Zellen

* entnommen aus und modifiziert nach GRIMM *et al.*, 2017

Transfizierte SH-SY5Y-Zellen, welche das humane APP695 überexprimieren, wurden für 24 h mit Calcidiol inkubiert. Das produzierte und sezernierte A β wurde mittels W02-Antikörper im Medium detektiert.

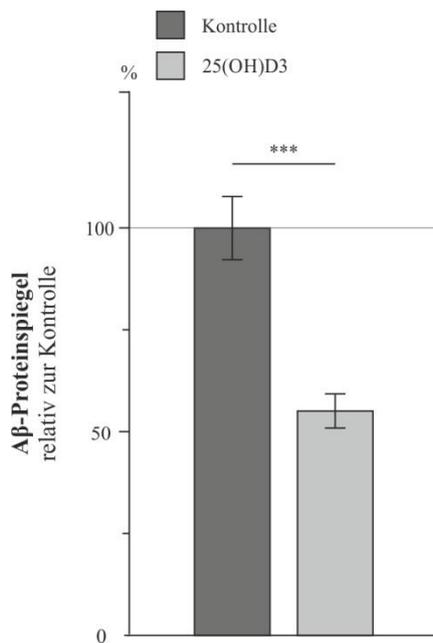


Abbildung 21 - A β -Proteinspiegel aus SH-SY5Y APP-Zellen nach 25(OH)D3-Inkubation (verändert nach GRIMM *et al.*, 2017)

SH-SY5Y APP-Neuroblastomzellen wurden für 8 + 16 h mit 100 nM Calcidiol inkubiert. Die sezernierte A β -Menge wurde mittels W02-Antikörper detektiert. Die Abbildung zeigt detektierte A β -Proteinspiegel relativ zur Kontrolle. Die Fehlerbalken stellen die mittlere Standardabweichung von 5 unabhängigen Messungen dar.

Abbildung 21 zeigt eine signifikante Reduktion der A β -Gesamtmenge auf 55,1% (\pm 4,2%, $p < 0,001^{***}$) im Vergleich zu den Kontrollzellen. Im Folgenden wurden nun in Analogie zum ersten Abschnitt der Arbeit der A β -Anabolismus und -Katabolismus untersucht.

4.4.2. Amyloidogene Prozessierung nach 25(OH)D3-Kurzzeitinkubation

4.4.2.1. Bestimmung der β -Sekretase-Aktivität

* Abb. 22A entnommen aus und modifiziert nach GRIMM *et al.*, 2017

Die β -Sekretase-Aktivität wurde aus lebenden Zellen und isolierten Membranen von SH-SY5Y-Zellen bestimmt. Zweiteres wurde zur Verifizierung des vermuteten direkten Effekts von 25(OH)D3 auf die β -Sekretase-Aktivität im Mausmodell (s. Kap. 4.2.1.2.) analysiert.

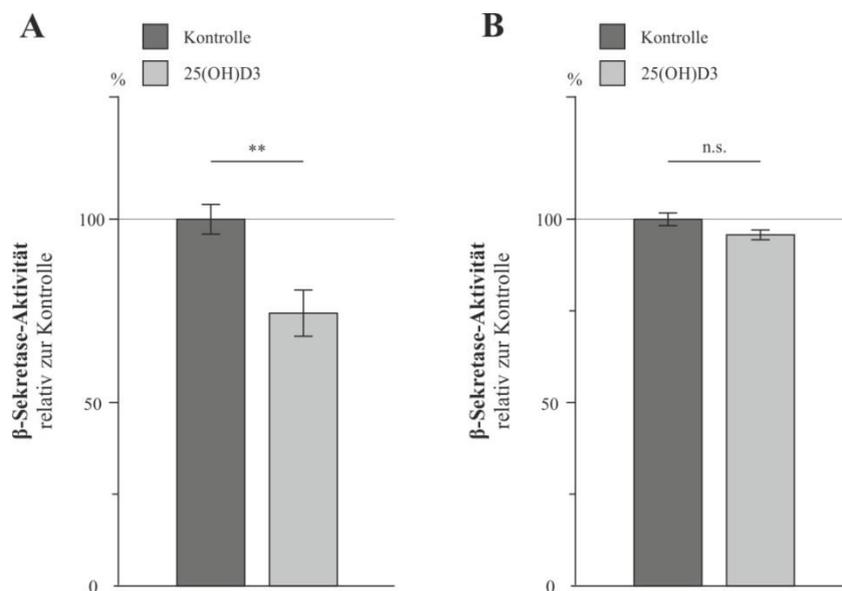


Abbildung 22 - β -Sekretase-Aktivität aus lebenden Zellen und PNFs nach 25(OH)D3-Inkubation (verändert nach GRIMM *et al.*, 2017)

A - Lebende SH-SY5Y WT-Zellen wurden für 24 h mit 100 nM Calcdiol inkubiert und anschließend die β -Sekretase-Aktivität im lebenden System bestimmt. **B** – PNFs wurden aus SH-SY5Y WT-Zellen erstellt und diese für 15 min mit 100 nM Calcdiol inkubiert. Anschließend erfolgte eine Membranpräparation. Die Abbildungen zeigen die jeweiligen Aktivitäten relativ zur Kontrolle. Die Fehlerbalken stellen die mittlere Standardabweichung von 5 (**A**) bzw. 7 (Kontrolle **B**)/18 (25(OH)D3 **B**) unabhängigen Messungen dar.

Abbildung 22A zeigt eine signifikante Aktivitätsreduktion der β -Sekretase auf 74,4% ($\pm 6,3\%$, $p = 0,009^{**}$) im Vergleich zu den Kontrollzellen im lebenden, metabolisch aktiven System. Die gemessene β -Sekretase-Aktivität auf den isolierten Membranen (Abbildung 22B) zeigt sich ebenfalls tendenziell auf 95,76% ($\pm 0,97\%$) reduziert, erreicht jedoch kein signifikantes Niveau ($p = 0,06$ n.s.).

4.4.2.2. Bestimmung der BACE1-Genexpression und –Proteinspiegel

* Abb. 23B entnommen aus und modifiziert nach GRIMM *et al.*, 2017

Die unter 4.4.2.1. beschriebene signifikante Aktivitätsreduktion der β -Sekretase lässt sich nicht alleine durch einen *direkten Effekt* von Calcidiol erklären, sodass weitere *indirekte Effekte*, wie eine Beeinflussung der Expression und Translation die Aktivität beeinflussen müssen. Daher wurden die *BACE1*-Genexpression und –Proteinspiegel untersucht.

Die *BACE1*-Genexpression ($80,8\% \pm 2,9\%$, $p = 0,003^{**}$; Abbildung 23A) und –Proteinspiegel ($54,1\% \pm 5,7\%$, $p = 0,004^{**}$; Abbildung 23B) zeigen sich jeweils signifikant reduziert. Zu beachten ist jedoch, dass sich die Genexpression signifikant von den Proteinspiegeln unterscheidet ($p = 0,014^*$). Eine potentielle Ursache könnte eine veränderte Proteinstabilität sein, die in Kap. 5.3.1. diskutiert wird.

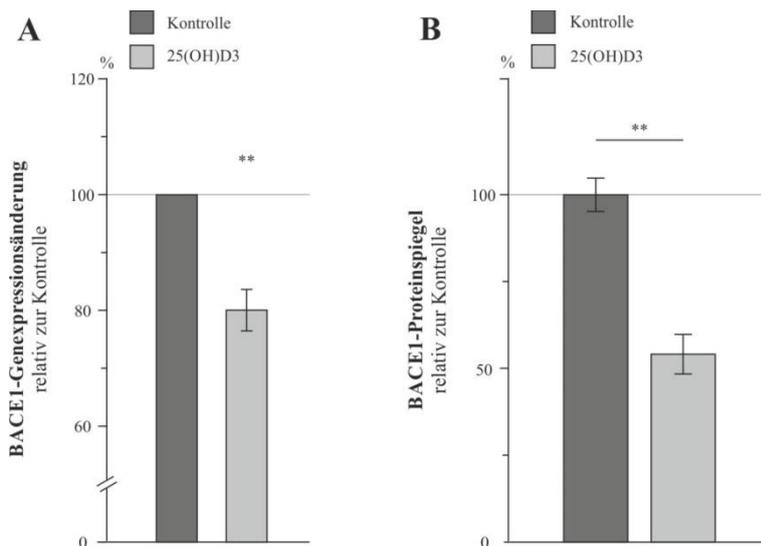


Abbildung 23 - BACE1-Genexpression und -Proteinspiegel aus SH-SY5Y WT-Zellen nach 25(OH)D3-Inkubation (verändert nach GRIMM *et al.*, 2017)

SH-SY5Y WT-Zellen wurden für 24 h mit 100 nM 25(OH)D3 inkubiert und anschließend die *BACE1*-Genexpression und -Proteinspiegel bestimmt. Die Abbildung zeigt diese relativ zur Kontrolle. Die Fehlerbalken stellen die mittlere Standardabweichung von jeweils drei unabhängigen Messungen dar.

4.4.2.3. Bestimmung der γ -Sekretase-Aktivität und Nicastrin-Expression

* Abb. 24A entnommen aus und modifiziert nach GRIMM *et al.*, 2017

Um die Beteiligung der γ -Sekretase an der signifikanten A β -Reduktion nach 25(OH)D₃-Inkubation zu beurteilen, wurde die γ -Sekretase-Aktivität auf lebenden Zellen sowie die Nicastrin-Expression untersucht.

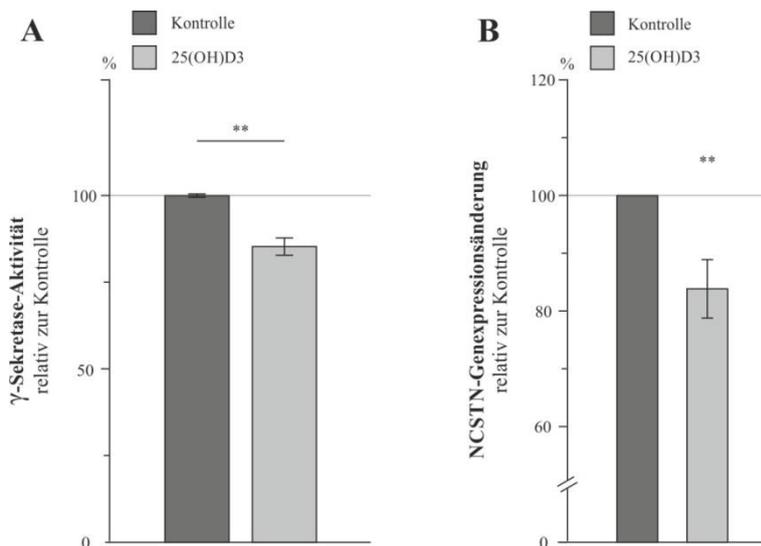


Abbildung 24 - γ -Sekretase-Aktivität und NCSTN-Genexpression aus SH-SY5Y WT-Zellen nach 25(OH)D₃-Inkubation (verändert nach GRIMM *et al.*, 2017)

SH-SY5Y WT-Zellen wurden für 24 h mit 100 nM 25(OH)D₃ inkubiert. Anschließend wurde die γ -Sekretase-Aktivität auf lebenden Zellen sowie die Nicastrin-Expression mittels RT-PCR bestimmt. Die Abbildung zeigt die Aktivität bzw. Expression relativ zur Kontrolle. Die Fehlerbalken stellen die mittlere Standardabweichung von fünf (A) bzw. drei (B) unabhängigen Messungen dar.

Die γ -Sekretase-Aktivität zeigt sich im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant reduziert ($85,3\% \pm 2,5\%$, $p < 0,001^{***}$). Interessanterweise ist die Nicastrin-Expression im selben Maße signifikant reduziert ($83,3\% \pm 4,1\%$, $p = 0,015^*$). Hierbei besteht, im Gegensatz zur β -Sekretase, zwischen der Aktivität und der Expression kein signifikanter Unterschied ($p = 0,70$ n.s.).

4.4.3. Nicht-amyloidogene Prozessierung nach 25(OH)D₃-Kurzzeitinkubation

* entnommen aus und modifiziert nach GRIMM *et al.*, 2017

Unter *Vitamin D-Mangelbedingungen* zeigte sich eine geringe, tendenzielle Steigerung der α -Sekretase-Aktivität (s. Kap. 4.2.2.1.), welche sich durch eine erhöhte ADAM17-Proteinmenge erklären ließ (s. Kap. 4.2.2.2.). Es zeigten sich jedoch gleichzeitig inverse Effekte bei der *Adam17*-Genexpression oder anderen an der α -Sekretase-Aktivität beteiligten

Enzymen wie ADAM10. Um den Einfluss einer *Vitamin D-Supplementierung* auf den nicht-amyloidogenen Prozessierungsweg zu untersuchen, wurde daher die Gesamt- α -Sekretase-Aktivität auf lebenden Zellen bestimmt, die ein Summensignal aller an der α -Sekretase beteiligten Enzyme darstellt.

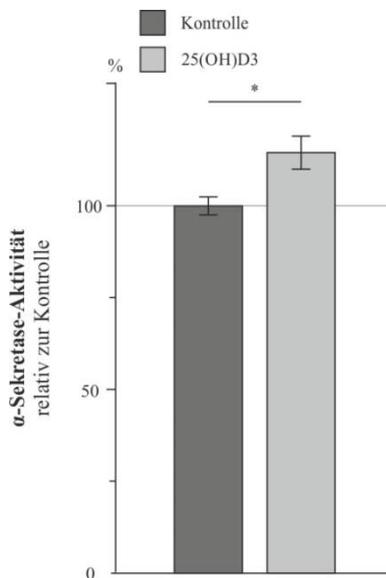


Abbildung 25 - α -Sekretase-Aktivität aus SH-SY5Y WT-Zellen nach 25(OH)D3-Inkubation (verändert nach GRIMM *et al.*, 2017)

SH-SY5Y WT-Zellen wurden für 24 h mit 100 nM 25(OH)D3 inkubiert und anschließend die α -Sekretase-Aktivität fluorimetrisch bestimmt. Die Abbildung zeigt die Aktivität relativ zur Kontrolle. Die Fehlerbalken stellen die mittlere Standardabweichung von sieben unabhängigen Messungen dar.

Abbildung 25 zeigt eine signifikante Aktivitätssteigerung auf 114,5% (\pm 4,5%, $p = 0,015^*$). Wie bereits oben erwähnt, tragen unterschiedliche Matrixmetalloproteasen zur α -Sekretase-Aktivität bei. Es wird in der Literatur diskutiert, dass ADAM10 im Gehirn das dominante Enzym darstellt. Dies ist jedoch Zelltyp- und Gewebe-abhängig. Da kein einheitlicher Effekt von Vitamin D auf die Matrixmetalloproteasen gefunden wurde, sollte sich hier ausschließlich auf das α -Sekretase-Summensignal beschränkt werden.

Es ist davon auszugehen, dass je nach Gewebe und Zelltyp die α -Sekretase-Zusammensetzung variiert, sodass eine abschließende Beurteilung des Effektes von Vitamin D auf die α -Sekretase nur eingeschränkt möglich erscheint.

4.4.4. A β -Gesamtdegradation auf N2a-Zellen nach 25(OH)D3-Kurzzeitinkubation

Die Messung der A β -Gesamtdegradation erfolgte entsprechend dem Kap. 3.9.8.. Hierbei wurde die A β -Degradation in Abhängigkeit der Inkubationsdauer der Zellen (10 h, 18 h, 4 Wochen (Langzeitinkubation – s. Kap. 4.4.5.2.)) mit 25(OH)D3 untersucht.

N2a-Zellen wurden entsprechend Kap. 3.9.8. behandelt und anschließend die verbleibende A β -Menge mittels Western-Blot-Analyse bestimmt.

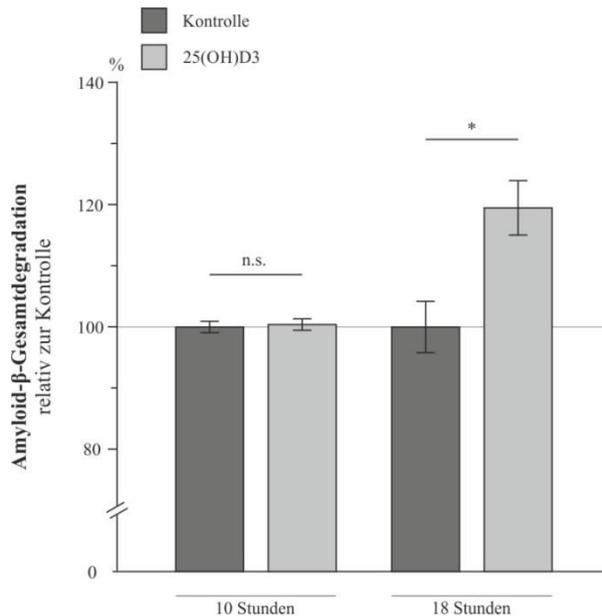


Abbildung 26 – A β -Gesamtdegradation nach 25(OH)D3-Kurzzeitinkubation (verändert nach GRIMM *et al.*, 2017)

Murine N2a-Zellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend für 10 bzw. 18 h mit 100 nM 25(OH)D3 inkubiert. Anschließend wurde für 6 h humanes A β_{40} auf die Zellen gegeben. Nach dieser Zeit wurde der verbleibende A β_{40} -Anteil mittels Western-Blot-Analyse bestimmt und die Gesamtdegradation durch Bildung des Kehrwerts ermittelt. Die Abbildung zeigt die Gesamtdegradation relativ zu den Kontrollen. Die Fehlerbalken stellen die mittlere Standardabweichung von jeweils vier unabhängigen Messungen dar.

Abbildung 26 zeigt, dass es nach 10 stündiger Inkubation der Zellen zu keiner signifikanten Veränderung der A β -Gesamtdegradation kommt (100,1% \pm 2,33%, $p = 0,98$ n.s.). Nach einer Inkubationsdauer von 18 h zeigt sich jedoch ein signifikanter Anstieg auf 119,57% (\pm 4,45%, $p = 0,03$ *).

Im Folgenden wurden die N2a-Zellen mit 25(OH)D3 langzeitinkubiert, um eine höhere Vergleichbarkeit mit dem *in vivo* Mausmodell zu erreichen („Langzeit-Mangelsituation“) und um Effekte auf die Genexpression und Proteinspiegel deutlicher zu gewichten. Um sicherzustellen, dass eine suffiziente Calcidiol-Aufnahme in die Zellen erfolgte, wurde nach erfolgter Inkubation der 25(OH)D3-Spiegel bestimmt.

4.4.5. A β -Katabolismus nach 25(OH)D₃-Langzeitinkubation

4.4.5.1. Bestimmung der zellulären 25(OH)D₃-Konzentration

Nach dreimaligem Waschen der Zellen (Entfernung der FBS-Rückstände und dem darin enthaltenen Vitamin D) und anschließendem Homogenisieren wurde die zelluläre 25(OH)D₃-Konzentration der N2a-Zellen mittels ELISA Kit (25-OH-VitaminD-ELISA, Euroimmun) in ng/ml bestimmt.

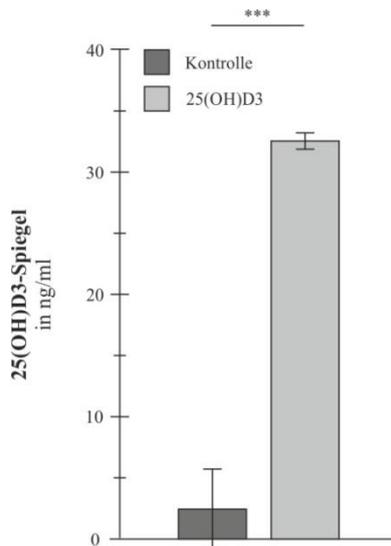


Abbildung 27 - 25(OH)D₃-Spiegel nach Langzeitinkubation der N2a-Zellen (verändert nach GRIMM et al., 2013c)

N2a-Zellen wurden für einen Zeitraum von vier Wochen mit 100 nM 25(OH)D₃ in einem 5%-FBS-haltigen Medium kultiviert. Die Kontrollzellen wurden für diesen Zeitraum mit der äquivalenten Menge an Ethanol behandelt. Nach Ende der Inkubationsphase wurden die Zellen homogenisiert und der 25(OH)D₃-Gehalt mittels ELISA Kit (25-OH-VitaminD-ELISA, Euroimmun) bestimmt. Die Abbildung zeigt die 25(OH)D₃-Spiegel in ng/ml. Die Fehlerbalken stellen die mittlere Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen dar.

Abbildung 27 zeigt die zellulären 25(OH)D₃-Spiegel nach vierwöchiger Inkubation: Während die Kontrollzellen einen niedrigen 25(OH)D₃-Gehalt von 2,45 ng/ml (\pm 3,28 ng/ml) aufweisen, zeigen die langzeitsupplementierten Zellen eine signifikante Erhöhung der zellulären 25(OH)D₃-Konzentration (32,56 ng/ml \pm 0,67 ng/ml, $p < 0,001^{***}$). 32,56 ng/ml entsprechen hierbei 81,4 nmol/l.

4.4.5.2. Bestimmung der A β -Gesamtdegradation auf N2a-Zellen

Wie in Kapitel 4.4.4. dargestellt führte eine 25(OH)D3-Kurzzeitinkubation über 10 h zu keiner signifikanten Änderung der A β -Gesamtdegradation, wohingegen eine 18 stündige Behandlung der Zellen einen signifikanten Anstieg zur Folge hatte. Dementsprechend scheint die Änderung der A β -Gesamtdegradation abhängig von der Inkubationsdauer/Wirkdauer von 25(OH)D3 zu sein. Um zu untersuchen, ob eine langfristige Erhöhung der 25(OH)D3-Konzentration zu einer weiteren Steigerung der A β -Gesamtdegradation führt, wurde diese aus den langzeitinkubierten N2a-Zellen bestimmt.

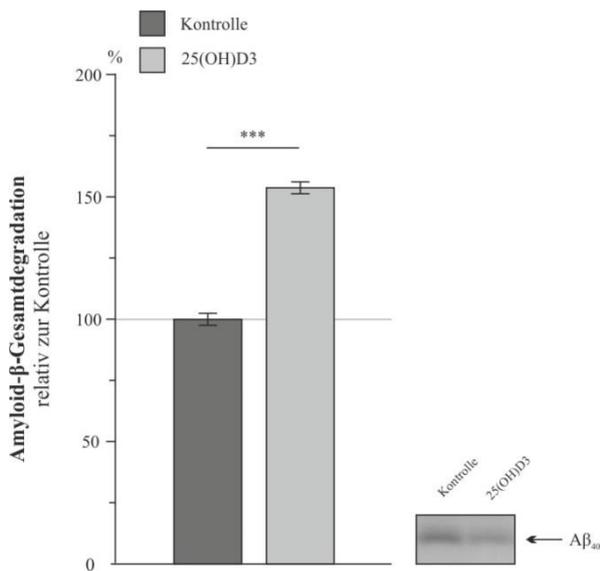


Abbildung 28 - A β -Gesamtdegradation nach 25(OH)D3-Langzeitinkubation (verändert nach GRIMM *et al.*, 2013c)

N2a-Zellen wurden für einen Zeitraum von vier Wochen in 5% FBS-haltigen Medium (± 100 nM 25(OH)D3) kultiviert. Nach diesem Zeitraum wurde für 6 h synthetisches humanes A β_{40} in das Zellkulturmedium gegeben und die verbleibenden A β -Proteinspiegel aus dem Kulturmedium anschließend mittels Western-Blot-Analyse bestimmt. Zur Detektion wurde der W02 Antikörper verwendet. Die Fehlerbalken stellen die mittlere Standardabweichung von zehn unabhängigen Messungen dar.

Abbildung 28 zeigt eine Reduktion des synthetischen A β_{40} auf 65,05% ($\pm 1,58\%$, $p < 0,001^{***}$) nach sechsständiger Degradation. Die berechnete A β -Gesamtdegradation erhöht sich entsprechend auf 154% ($\pm 2,44\%$, $p < 0,001^{***}$). Im Folgenden wurde der Effekt auf die an der A β -Degradation beteiligten Enzyme weiter untersucht.

4.4.5.3. Bestimmung der Neprilysin-Aktivität

In vivo konnte bereits gezeigt werden, dass die veränderte A β -Degradation hauptsächlich durch eine veränderte Neprilysin-Aktivität vermittelt wird (s. Kap. 4.3.2.). Hier sollte untersucht werden, ob ein ähnliches Ergebnis unter Zellkulturbedingungen erzielt werden kann. Die Bestimmung der NEP-Aktivität erfolgte gemäß Kap. 3.9.10..

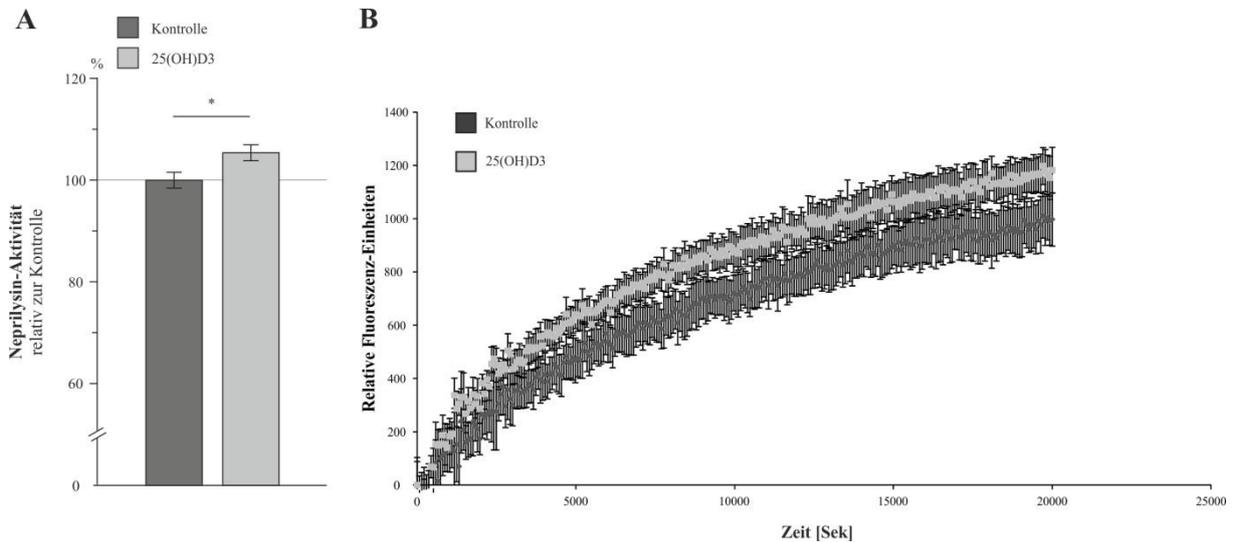


Abbildung 29 - Neprilysin-Aktivität aus langzeitinkubierten N2a-Zellen (verändert nach GRIMM et al., 2013c)

Die Neprilysin-Aktivität wurde *fluorometrisch* bestimmt, um die Beteiligung von Neprilysin an der beobachteten Gesamtdegradationssteigerung zu untersuchen. **A** – zeigt die Neprilysin-Aktivität der 25(OH)D3-langzeitinkubierten Zellen relativ zu den Kontrollzellen. **B** – zeigt die Enzymkinetik im Zeitraum von 0-20000 Sekunden. Die Fehlerbalken stellen die mittlere Standardabweichung von fünf unabhängigen Messungen dar.

Abbildung 29 zeigt eine signifikante Steigerung der Neprilysin-Aktivität um 9% ($\pm 2,6\%$, $p = 0,032^*$) nach Langzeit-25(OH)D3-Supplementierung. Im Vergleich zu der beobachteten Neprilysin-Aktivitätsreduktion in den Vitamin D-defizienten Mäusen ($-7\% \pm 1,28\%$), zeigte sich somit eine Aktivitätszunahme in ähnlichem Maße.

4.4.5.4. Bestimmung der Neprilysin-Genexpression

Im *in vivo* Modell konnte gezeigt werden, dass die NEP-Aktivitätsänderung durch eine veränderte Genexpression bedingt ist. Um zu analysieren, ob diese Expressionsänderungen auch bei langzeitinkubierten N2a-Zellen beobachtet werden können, wurden die *Nep*-Expression mittels RT-PCR überprüft.

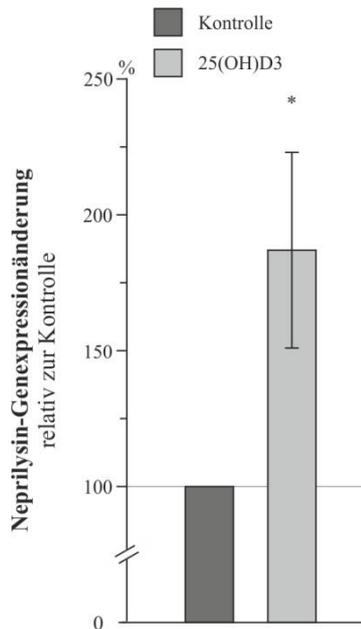


Abbildung 30 - *Nep*-Genexpression aus langzeitinkubierten N2a-Zellen (verändert nach GRIMM et al., 2013c)

Die Neprilysin-Genexpression wurde mittels RT-PCR aus langzeitinkubierten N2a-Zellen bestimmt. Die Abbildung zeigt die Neprilysin-Genexpression relativ zur Kontrolle. Der Fehlerbalken stellt die mittlere Standardabweichung von neun unabhängigen Messungen dar.

Wie in Abbildung 30 dargestellt, zeigt sich im Zellkulturversuch, in Übereinstimmung mit der beobachteten Neprilysin-Aktivitätssteigerung, eine signifikante Zunahme der Neprilysin-Genexpression ($187\% \pm 36\%$, $p = 0,03^*$). Es ist jedoch zu beachten, dass ein nahezu signifikanter Unterschied zwischen der *Nep*-Genexpressionssteigerung und der NEP-Aktivität besteht ($109,4\% \pm 2,57\%$) ($p = 0,07$). Auf diese Unterschiede wird genauer in der Diskussion eingegangen.

Zusammenfassend zeigt sich eine gesteigerte Neprilysin-Aktivität von 10 %, bei gleichzeitiger *Nep*-Genexpressionssteigerung. Es besteht jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen der beobachteten A β -Gesamtdegradationssteigerung ($153,74\%$

$\pm 2,44\%$) und der NEP-Aktivitätssteigerung ($109,4\% \pm 2,57\%$) ($p < 0,001^{***}$). Dies weist auf die potentielle Beteiligung weiterer Degradationsenzyme an der A β -Degradation hin.

4.4.5.5. Bestimmung der IDE-Proteinspiegel und –Genexpression

Wie in der Einleitung beschrieben, ist IDE, neben Nephrylin, eines der wichtigsten A β -degradierenden Enzyme. Daher wurden die IDE-Proteinspiegel und -Genexpression aus den langzeitinkubierten N2a-Zellen mittels Western-Blot-Analyse bzw. RT-PCR bestimmt.

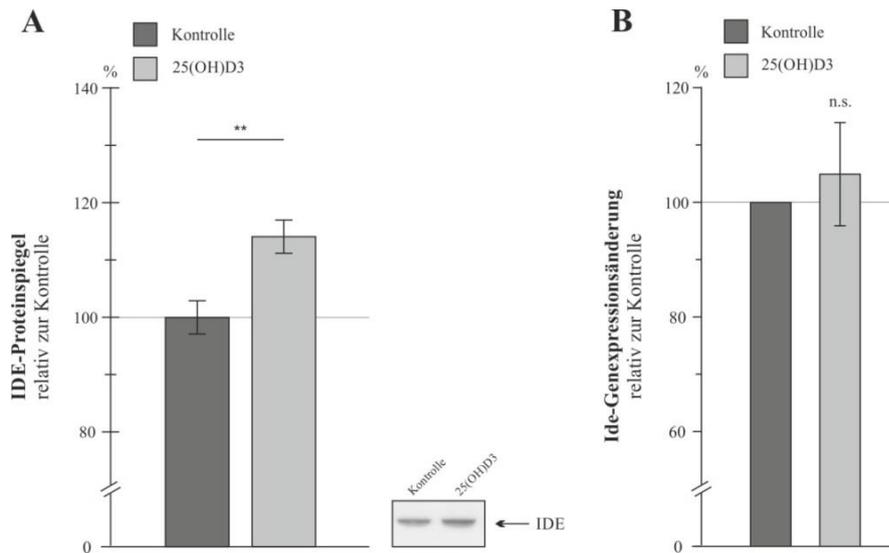


Abbildung 31 - IDE-Proteinspiegel und Ide-Expression aus langzeitinkubierten N2a-Zellen (verändert nach GRIMM et al., 2013c)

Die IDE-Proteinspiegel wurden mittels Western-Blot-Analyse, die Expression mittels RT-PCR untersucht. Zur Detektion des Proteins wurde der Antikörper *Anti-IDE/Insulysin Rabbit* verwendet. Die Abbildung zeigt die IDE-Proteinspiegel (A) bzw. -Expression (B) der langzeitinkubierten N2a-Zellen relativ zur Kontrolle. Die Fehlerbalken stellen die mittlere Standardabweichung von fünf unabhängigen Messungen dar.

Während unter Vitamin D-Mangelbedingungen *in vivo* weder die Aktivität, noch die *Ide*-Expression signifikant verändert waren, zeigt Abbildung 31 eine signifikante Proteinexpressionssteigerung der 25(OH)D3 supplementierten Zellen um 14% ($\pm 2,9\%$, $p = 0,009^{**}$) im Vergleich zu den Kontrollzellen. Die Genexpression zeigt sich tendenziell, jedoch nicht signifikant, erhöht ($105\% \pm 9\%$, $p = 0,57$ n.s.).

4.4.5.6. Genexpressionsanalyse der A β -Degradationsenzyme

In Analogie zum *in vivo* Modell wurde der Einfluss der vierwöchigen 25(OH)D₃-Supplementierung auf die Expression der A β -degradierenden Enzyme untersucht. Unter Vitamin D-Mangelbedingungen hatte sich lediglich eine signifikante Expressionsreduktion von Neprilysin gezeigt, die Gesamtexpression aller Degradationsenzyme war nicht signifikant verändert.

Die Expressionsanalyse wurde mittels RT-PCR durchgeführt. Tabelle 20 fasst die Ergebnisse zusammen:

Tabelle 20 - Ergebnisse der Degradationsenzym-Genexpressionsanalyse aus langzeitinkubierten N2a-Zellen (verändert nach GRIMM et al., 2013c)

Die Tabelle zeigt den Mittelwert (MW), die mittlere Standardabweichung (StabWM), den zweiseitigen Student's t-Test sowie die Anzahl der Messungen der verschiedenen A β -Degradationsenzyme: Ace (Angiotensin converting enzyme), Ctsb (Cathepsin B), ECE-1 und -2 (endothelin converting enzyme 1 und 2), Ide (insulin degrading enzyme), Mmp2 und 9 (Matrix metalloproteinases 2 und 9), Nep (Neprilysin), Plg (Plasminogen).

A β -Degradationsenzym	MW [%]	StabWM [%]	t-Test	n-Zahl
<i>Ace</i>	156	2	0,01*	9
<i>Ctsb</i>	129	0,8	0,005**	6
<i>Ece-1</i>	105	26	0,86	9
<i>Ece-2</i>	102	1	0,85	15
<i>Ide</i>	105	0,9	0,57	9
<i>Mmp2</i>	133	23	0,16	12
<i>Mmp9</i>	141	27	0,15	9
<i>Nep</i>	187	36	0,03*	9
<i>Plg</i>	171	25	0,009**	12

Während bei milder bis moderater Hypovitaminose D *in vivo* nur tendenzielle Veränderungen beobachtet werden konnten, führt eine längerfristige supraphysiologische 25(OH)D₃-Supplementierung unter den gewählten Zellkulturbedingungen zu einer signifikanten Expressionssteigerung mehrerer A β -Degradationsenzyme. Diese Ergebnisse schlüsseln die unter 4.4.5.2. beobachtete Gesamtdegradationssteigerung weiter auf und ermöglicht eine Aussage über die Vitamin D-abhängige Regulation der bekannten A β -degradierenden Enzyme unter den gewählten Bedingungen. Alle Ergebnisse sind nochmals in Abbildung 32 graphisch dargestellt.

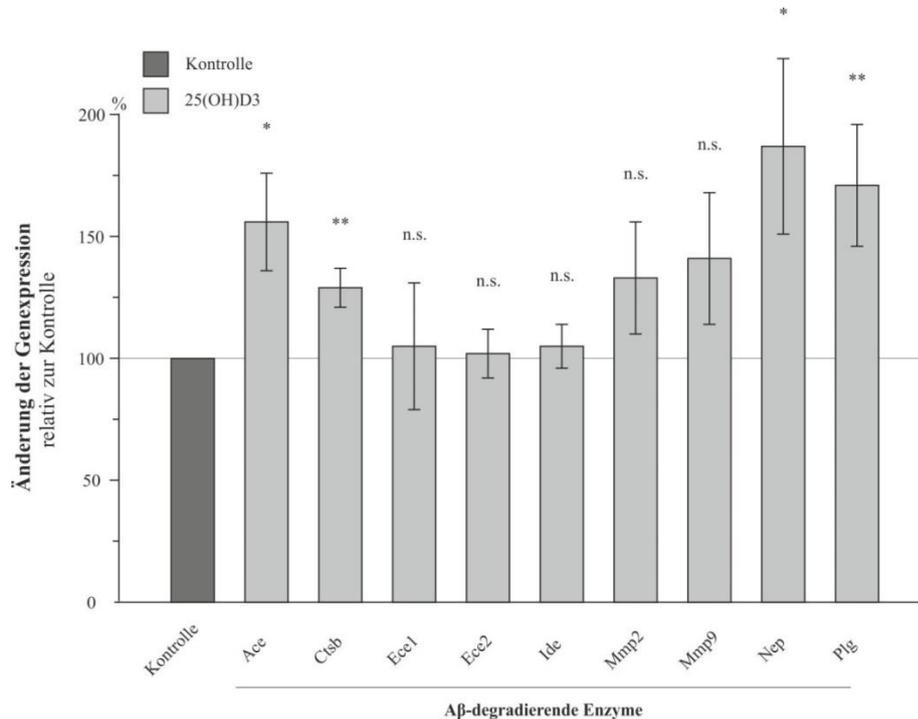


Abbildung 32 - Genexpressionsanalyse der A β -degradierenden Enzyme aus langzeitinkubierten N2a-Zellen (verändert nach GRIMM et al., 2013c)

Es wurde eine Expressionsanalyse mittels RT-PCR der bereits unter 4.3.5. untersuchten A β -Degradationsenzyme durchgeführt. Die Abbildung zeigt die Expression der einzelnen Enzyme relativ zur Kontrolle. Die entsprechenden Werte sind Tabelle 20 zu entnehmen. Die Fehlerbalken stellen die mittlere Standardabweichung der Messungen dar.

4.4.6. Bestimmung des A β -Gehalts aus langzeitinkubierten N2a-Zellen

Abschließend wurden die langzeitinkubierten N2a-Zellen mit humanem APP (*hAPP*) transient transfiziert, um die Auswirkung einer 25(OH)D₃-Supplementierung auf die A β -Homöostase zu untersuchen.

Der quantitative Nachweis von APP und A β wurde mittels Western-Blot-Analyse durchgeführt. Die APP-Proteinspiegel wurden zur Kontrolle der Transfektionseffizienz bestimmt, da die Vitamin D inkubierten Zellen prinzipiell geänderte Transfektionseigenschaften aufweisen könnten. Zur Anreicherung der A β -Peptide wurde eine Immunpräzipitation gemäß Kapitel 3.9.3. durchgeführt. Die Detektion der Proteine erfolgte mit dem Antikörper W02.

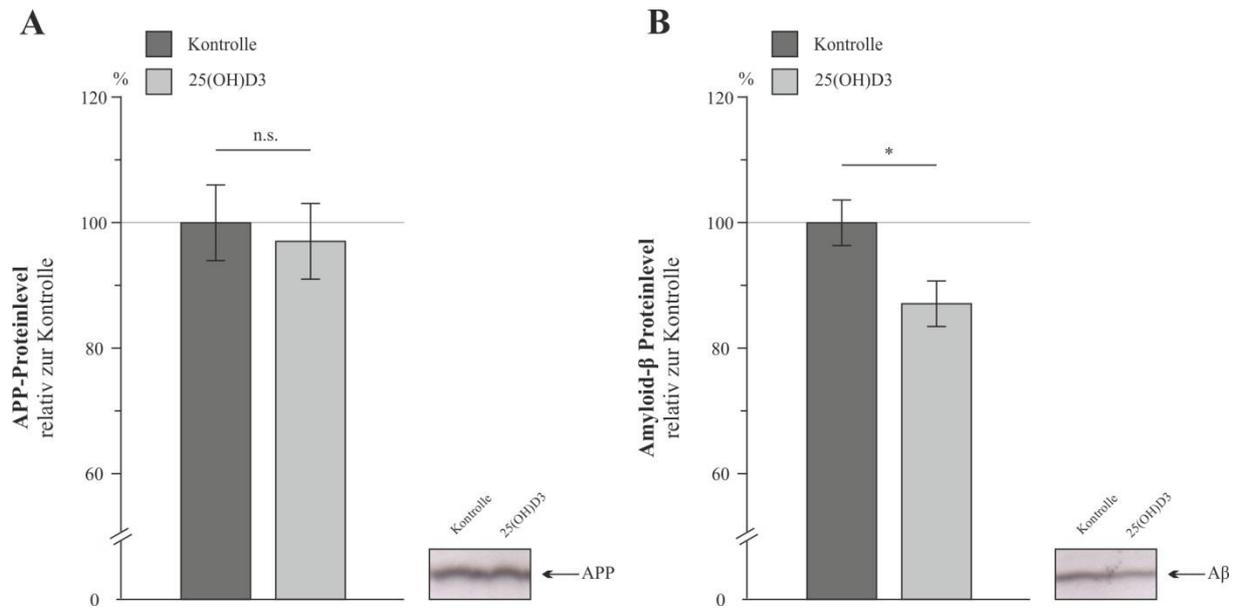


Abbildung 33 - APP- und A β -Proteinlevel nach transienter Transfektion aus langzeitinkubierten N2a-Zellen (verändert nach GRIMM *et al.*, 2013c und Dissertation Dr. Janine Mett, Universität des Saarlandes, 2017)

Die langzeitsupplementierten N2a-Zellen wurden mit humanem APP (*hAPP*) transient transfiziert, um den Einfluss der 25(OH)D3-Supplementierung auf die A β -Homöostase zu untersuchen. Der quantitative Proteinnachweis erfolgte mittels Western-Blot-Analyse. APP und A β wurden mittels W02 Antikörper detektiert. **A** – zeigt die APP-Proteinlevel zur Überprüfung der Transfektionseffizienz relativ zur Kontrolle. **B** – zeigt die A β -Proteinlevel der supplementierten Zellen relativ zur Kontrolle. Die Fehlerbalken stellen die mittlere Standardabweichung von fünf unabhängigen Messungen dar.

Abbildung 33 **A** zeigt die APP-Proteinlevel der transfizierten Zellen. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Transfektionseffizienz ($-2,96\% \pm 6,03\%$; $p = 0,74$ n.s.). Abbildung 33 **B** zeigt die resultierende A β -Proteinmenge. Durch die Supplementierung von 25(OH)D3 kommt es zu einer signifikanten Reduktion der A β -Peptide auf 87,10% ($\pm 3,63\%$; $p = 0,036^*$). Somit zeigt sich bei gleicher Transfektionseffizienz eine signifikante Reduktion des produzierten A β s. Es besteht ein signifikanter Unterschied zu den A β -Proteinleveln nach der A β -Gesamtdegradation ($65,05\% \pm 1,58\%$) (vgl. Kap. 4.4.5.2.) (Differenz: 22,05%, $p < 0,001^{***}$).

4.5. Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse

Tabelle 21 - Tabellarische Gegenüberstellung der Ergebnisse

Während im ersten Abschnitt der Arbeit der Einfluss einer milden bis moderaten Hypovitaminose D *in vivo* auf die A β -Homöostase untersucht wurde, wurde im zweiten Abschnitt eine supraphysiologische Supplementierung unter Zellkulturbedingungen *in vitro* erforscht. Die Tabelle stellt die jeweiligen Ergebnisse gegenüber – die Kontrollen (WT-Mäuse; SH-SY5Y/N2a-Zellen) wurden auf 100% normiert. In Klammern ist die jeweilige mittlere Standardabweichung angegeben. Wurde eine Versuch unter den jeweiligen Bedingungen nicht durchgeführt, ist dies in der Tabelle vermerkt (n.b. – nicht bestimmt).

	Vitamin D-Mangel (WT-Mäuse)	Kontrolle – normiert auf 100% (SH-SY5Y/N2a/ WT-Mäuse)	Vitamin D-Substitution (SH-SY5Y/N2a)
<i>Aβ₄₀- Proteinspiegel</i>	110% (\pm 1,4%), p = 0,006**	100	<i>Aβ-Gesamt- Proteinspiegel (SH-SY5Y):</i> 55,1% (\pm 4,2%), p < 0,001*** <i>Aβ-Gesamt- Proteinspiegel (N2a):</i> 87,1% (\pm 3,6 %), p = 0,036*
<i>Aβ₄₂- Proteinspiegel</i>	113% (\pm 2,2%), p = 0,014*	100	<i>SH-SY5Y (lebend):</i> 74,4% (\pm 6,3%), p = 0,009**
<i>β-Sekretase- Aktivität</i>	106% (\pm 1,44%), p=0,007**	100	n.b.
<i>sAPPβ- Proteinspiegel</i>	104% (\pm 3,9%), p = 0,47	100	n.b.
<i>BACE1- Proteinspiegel</i>	116% (\pm 4,6%), p = 0,009**	100	<i>SH-SY5Y:</i> 54,1% (\pm 5,7%), p = 0,004**
<i>BACE1- Genexpression</i>	87% (\pm 7%), p = 0,15 n.s.	100	<i>SH-SY5Y:</i> 80,8% (\pm 2,9%), p = 0,003**
<i>γ-Sekretase- Aktivität</i>	101% (\pm 3,7%), p = 0,86 n.s.	100	<i>SH-SY5Y (lebend):</i> 85,3% (\pm 2,5%), p < 0,001***
<i>Nicastrin- Proteinspiegel</i>	107% (\pm 3,3%), p = 0,22 n.s.	100	<i>SH-SY5Y:</i> 83,3% (\pm 4,1%), p = 0,015*
<i>γ-Sek.-Kompl. Genexpression</i>	101% (\pm 26%), p = 0,29 n.s.	100	n.b.
<i>α-Sekretase- Aktivität</i>	105% (\pm 2%), p = 0,06 n.s.	100	<i>SH-SY5Y (lebend):</i> 114,5% (\pm 4,5%), p = 0,015*

<i>ADAM10-Proteinspiegel</i>	100,2% (\pm 3%), p=0,96 n.s.	100	n.b.
<i>ADAM 17-Proteinspiegel</i>	110,5% (\pm 2%), p = 0,03*	100	n.b.
<i>ADAM17-Genexpression</i>	94% (\pm 8%), p = 0,50 n.s.	100	n.b.
<i>Aβ-Gesamt-Degradation</i>	79,2% (\pm 1,2%), p = 0,002**	100	<i>N2a (10 h):</i> 100,1% (\pm 2,3%), p = 0,98 n.s. <i>N2a (18 h):</i> 119,6% (\pm 4,5%), p = 0,03* <i>N2a (Langzeit):</i> 154% (\pm 2,44%), p < 0,001***
<i>Neprilysin-Aktivität</i>	93% (\pm 1,3%), p = 0,003**	100	109% (\pm 2,6%), p = 0,03*
<i>Neprilysin-Genexpression</i>	83% (\pm 5,24%), p = 0,013*	100	187% (\pm 36%), p = 0,03*
<i>IDE-Aktivität</i>	98,5% (\pm 3,3%), p = 0,7 n.s.	100	n.b.
<i>IDE-Proteinspiegel</i>	n.b.	100	114% (\pm 2,9%), p = 0,009**
<i>IDE-Genexpression</i>	111% (\pm 34%), p = 0,76 n.s.	100	105% (\pm 9%), p = 0,57 n.s.
<i>ACE-Genexpression</i>	83% (\pm 9%), p = 0,12 n.s.	100	156% (\pm 20%), p = 0,01*
<i>CTSB-Genexpression</i>	129% (\pm 17%), p = 0,17 n.s.	100	129% (\pm 8%), p = 0,005**
<i>ECE1-Genexpression</i>	80% (\pm 14%), p = 0,18 n.s.	100	105% (\pm 26%), p = 0,86 n.s.
<i>ECE2-Genexpression</i>	93% (\pm 9%) p = 0,5 n.s.	100	102% (\pm 10%), p = 0,85 n.s.
<i>MMP2-Genexpression</i>	169% (\pm 41%), p = 0,16 n.s.	100	133% (\pm 23%), p = 0,16 n.s.
<i>MMP9-Genexpression</i>	103% (\pm 22%), p = 0,89 n.s.	100	141% (\pm 27%), p = 0,15 n.s.
<i>PLG-Genexpression</i>	n.b.	100	171% (\pm 25%), p = 0,009**

5. Diskussion

5.1. Zerebraler Vitamin D-Mangel *in vivo*, supraphysiologische Vitamin D-Supplementierung *in vitro*

Wie bereits in der *Fragestellung der Arbeit* dargelegt, sollten in der hier vorliegenden Arbeit zwei verschiedene Bedingungen untersucht werden: *In vivo* sollte die A β -Homöostase unter milden bis moderaten Vitamin D-Mangelbedingungen analysiert werden, wohingegen *in vitro* der Einfluss einer supraphysiologischen Vitamin D-Supplementierung bestimmt werden sollte.

Calcdiol hat die längste Halbwertszeit der Vitamin D-Metaboliten und gilt im klinischen Alltag als Parameter für die Vitamin D-Versorgung eines Patienten (vgl. Kap. 2.6.) (DUSSO et al., 2005). Daher wurde ein kommerziell erhältliches ELISA-Kit verwendet (*25-OH-VitaminD-ELISA, Euroimmun*), um die 25(OH)D₃-Spiegel *in vivo* und *in vitro* zu bestimmen. Zusätzlich erfolgte die Inkubation der N2a-Zellen mit 25(OH)D₃ aus oben genannten Gründen.

Die Calcdiol-Gewebekonzentration ist abhängig von der Serumkonzentration. Zusätzlich zeigen fetthaltige Gewebe höhere Konzentrationen als fettarme, aufgrund der lipophilen Eigenschaften der Vitamin D-Metaboliten, die eine Secosteroid-Struktur aufweisen. Jedoch sind die Gewebekonzentrationen insgesamt signifikant niedriger als die Serumkonzentrationen (s.u.) (BURILD et al., 2016). Aus diesem Grund war es notwendig das 25(OH)D₃ aus den verwendeten Gehirnen zunächst mittels Lipidextraktion zu extrahieren und somit zu konzentrieren (s. Kap. 3.10.2.). Es wurde die lipidhaltige Phase verwendet und die Phase mit den polaren Nukleinsäuren, Zuckern und Proteinen verworfen, welche das Signal des verwendeten ELISAs durch Blockierung des Epitops gestört hätten. Gleichzeitig wurde durch die Extraktion das Vitamin D-bindende Protein, welches einen Großteil an Vitamin D bindet, denaturiert, sodass das zuvor gebundene Vitamin D ebenfalls in der lipophilen Phase nachgewiesen werden konnte. Aus Kostengründen wurde auf ein *Standardadditionsverfahren* zur exakten quantitativen Bestimmung des Vitamin D-Spiegels verzichtet und die Proben relativ zueinander betrachtet.

Zusammengefasst wurden durch die Lipidextraktion drei Effekte erzielt – eine Blockierung des Epitops wurde durch Herauslösen der polaren Stoffe (s.o.) reduziert, das gebundene Vitamin D freigesetzt und letztlich konzentriert.

Bei der Konzentrationsbestimmung *in vitro* war hingegen keine vorherige Lipidextraktion notwendig. Es wurde eine Calcdiol-Konzentration von 100 nM gewählt. Dies entspricht

einem hochnormalen Serumspiegel. Laut Literatur ist klinisch erst ab einer Serumkonzentration von 150 ng/ml (374 nM) mit einer Toxizität zu rechnen (HOLICK, 2007). Die gewählte Menge entspricht daher der Zielsetzung einer supraphysiologischen Vitamin D-Supplementierung *in vitro*. Durch die vorherige Behandlung der Zellen (vgl. Kap. 3.10.1) wurde der Anteil an 25(OH)D₃ bestimmt, welcher in die Zellen aufgenommen wurde. Dieser lag bei ca. 80% der Konzentration des supplementierten Wachstumsmediums (81,4 nM vs. 100 nM). Im Vergleich zu den Kontrollzellen (2,45 ng/ml \pm 6,13 nM) war somit die Konzentration um ca. 1300% erhöht. Hierbei ist von besonderer Wichtigkeit, dass trotz der 13-fachen Erhöhung auch bei der Langzeitinkubation die ermittelte Zytotoxizität unter 3% lag (GRIMM et al., 2017). Neben der unveränderten Zytotoxizität konnten bei den behandelten Zellen keine Veränderungen in der Morphologie oder im Wachstumsverhalten beobachtet werden.

Das Ziel des Fütterungsversuches war es eine Mangelsituation zu generieren, wie sie typischerweise in unserer (westlichen) Gesellschaft vorliegt und gerade bei älteren Menschen zu beobachten ist. Es wurden Wildtyp-Mäuse verwendet, da lediglich < 5% der Alzheimer-Fälle familiär bedingt und somit auf Mutationen im APP oder Presenilin zurückzuführen sind (BEKRIS et al., 2010). Calcidiol-Spiegel > 30 ng/ml (75 nmol/l) gelten nach internationalen Empfehlungen als optimal, während Spiegel zwischen 21– 29 ng/ml (52,5 nmol/l – 72,5 nmol/l) bereits als *insuffizient/leichte Mangelsituation* angesehen werden (HOLICK, 2007; HOLICK et al., 2011; ROSEN, 2011). Llewellyn *et al.* zeigten, dass rund 40% der untersuchten Probanden mit einem Alter \geq 65 Jahre eine leichte Vitamin D-Mangelsituation aufweisen (LLEWELLYN et al., 2011). Auch Klenk *et al.* beschrieben in einer Untersuchung aus Deutschland, dass in Abhängigkeit der Jahreszeit eine Vitamin D-*insuffiziente* Versorgung bei 19,2% (März) – 63,4% (August) der Probanden (\geq 65 Jahre) bestand (KLENK et al., 2013). Buell *et al.* berichteten, dass Patienten mit Demenzerkrankungen im Vergleich zu Nicht-Demenzpatienten eine im Mittel rund 15% niedrigere (16,8 ng/ml vs. 20 ng/ml) 25(OH)D₃-Serumkonzentration aufweisen (BUELL et al., 2010). Um eine optimale Vitamin D-Versorgung zu erreichen, sehen aktuelle Empfehlungen für Patienten, die gefährdet sind einen Vitamin D-Mangel zu entwickeln, eine tägliche Substitution von 1500-2000 I.E. als *suffizient* an (HOLICK et al., 2011). Wie bereits in Kap. 4.1.1., dargestellt entsprach die Fütterung/Supplementierung der Kontrolltiere (Vitamin D-reiches Futter) weitestgehend der humanen Situation. Die Bestimmung der Vitamin D-Serumkonzentration der Kontrollmäuse durch die AG Bals spiegelte dies ebenfalls wieder, da die Tiere im Durchschnitt Serumkonzentrationen von > 27 ng/ml aufwiesen. Eine

Reduktion der zerebralen Calcidiol-Konzentration um 23% in den Vitamin D-Mangelmäusen entspricht somit der oben dargestellten leicht-moderaten Mangelsituation. Hierdurch konnte die zweite Fragestellung der Arbeit, ob eine leichte Vitamin D-Defizienz zur Alzheimer-Demenz beitragen kann, genauer untersucht werden. Zu beachten ist jedoch, dass hiermit nur eine Aussage über das Gehirn-Gewebe getroffen werden konnte. Es ist denkbar, dass sich die Reduktion im Gehirn geringgradiger darstellt, als in anderen Geweben, da bereits ältere Studien belegen, dass Vitamin D und seine Metaboliten v.a. im Fettgewebe und somit vermutlich auch in anderen Geweben mit hohem Fettgehalt, wie dem Gehirn, akkumulieren und gespeichert werden können (MAWER et al., 1972; ROSENSTREICH et al., 1971; RUNGBY et al., 1993; RUNGBY et al., 1990). Zusätzlich scheinen Gewebe mit Hilfe des VDRs Vitamin D-Metaboliten anreichern zu können (CHRISTAKOS et al., 2010; DUSSO et al., 2005; KAMEL, KOLINSKI, 2012). Dies muss jedoch in weiteren Studien verifiziert werden.

Durch die Vitamin D-Supplementierung *in vitro* sollte geklärt werden, welchen Einfluss eine zusätzliche Vitamin D-Gabe bei bereits bestehender physiologischer Vitamin D-Versorgung hat. Während die Kurzzeitinkubation einen „Vitamin D (25(OH)D)-Impuls“ darstellte, sollte durch die Langzeitinkubation eine Situation geschaffen werden, in der sich zwischen den einzelnen Vitamin D-Metaboliten (aktiv/inaktiv) ein Gleichgewicht einstellt, welches auf die Zellen wirkt. Es ist bekannt, dass neuronale Zellen die hierzu notwendigen Enzyme (CYP27A1, CYP27B1, CYP24A1) und den VDR exprimieren (CELLI et al., 1999; LANDEL et al., 2017; ZHANG et al., 2017). Zusätzlich sollte die Langzeitinkubation eine längerfristige Supplementierung, entsprechend der humanen Situation, imitieren. Wie bereits unter 4.4. dargelegt, muss das verwendete Kälberserum (FBS) als Vitamin D-Quelle im Zellkultursystem beachtet werden. Dies spiegelt sich in dem Nachweis von 25(OH)D₃ in den Kontrollzellen wider. Bezieht man die nachgewiesenen 25(OH)D₃-Konzentrationen auf die eingesetzte Proteinkonzentration (~ 1154 µg/ml) ergibt sich eine Gewebekonzentration von 2,1 µg 25(OH)D₃/kg vs. 28 µg 25(OH)D₃/kg in den inkubierten Zellen. Burild *et al.* zeigten in diesem Zusammenhang in einer Studie an Schweinen, dass bei einem optimalen 25(OH)D₃-Serumspiegel (Mittel 27,2 ng/ml), die Gewebekonzentration (Muskulatur, Fettgewebe, Lebergewebe) in Abhängigkeit des jeweiligen Fettgehaltes zwischen 1,07 – 4,52 µg 25(OH)D₃/kg lag (BURILD et al., 2016). Somit wird bestätigt, dass die Kontrollzellen alleine durch das FBS suffizient/optimal mit 25(OH)D₃ versorgt waren, während die inkubierten Zellen eine 10-15 fach höhere, supraphysiologische Gewebekonzentration

aufwiesen. Da das FBS aus einem lebenden Organismus gewonnen wird sollten alle Metaboliten, inklusive dem aktiven Calcitriol, zusätzlich enthalten sein.

5.2. Der Einfluss von Vitamin D auf die A β -Pathologie

5.2.1. Ein Vitamin D-Mangel *in vivo* führt zu einer zerebralen A β -Erhöhung

Wie bereits im vorangegangenen Abschnitt erwähnt, wird ein Vitamin D-Mangel mit einer erhöhten Alzheimer-Inzidenz assoziiert (AFZAL et al., 2013; BUELL et al., 2010; LITTLEJOHNS et al., 2014). Ein typisches Merkmal der Alzheimer-Pathologie sind die extrazellulären amyloiden Plaques, welche zum größten Teil aus aggregiertem A β bestehen (GLENNER, WONG, 1984; MASTERS et al., 1985).

In der vorliegenden Arbeit führte die 23%ige Reduktion des zerebralen 25(OH)D3 Gehalts zu einem signifikanten Anstieg von A β ₄₀ um 10% bzw. von A β ₄₂ um 12%, während das A β ₄₀/A β ₄₂-Verhältnis unverändert war. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass in früheren Arbeiten gezeigt werden konnte, dass bereits ein geringer A β ₄₂-Anstieg zu einem früheren Erkrankungsalter führt (DUERING et al., 2005).

Ähnliche Ergebnisse wurden bereits von Yu *et al.* beschrieben. Dort führte eine Vitamin D-Supplementierung zu reduzierten A β -Spiegeln in APP/PS1 transgenen Mäusen. Im Vergleich zu den Kontrollmäusen zeigten die Vitamin D-supplementierten Mäuse eine 25(OH)D3-Plasmakonzentrationserhöhung um 75% (21,98 ng/ml vs. 38.53 ng/ml). A β ₄₀ (48%ige Reduktion) und A β ₄₂ (46%ige Reduktion) waren in den Vitamin D-supplementierten Tieren signifikant reduziert, wohingegen auch hier das A β ₄₀/A β ₄₂-Verhältnis unverändert war. Wird von einem linearen Zusammenhang ausgegangen, führte der Anstieg des 25(OH)D3-Spiegel um 1% zu einer 0,7%igen Reduktion der A β -Menge (YU et al., 2011). In Übereinstimmung mit diesen Daten, kam es in der vorliegenden Arbeit zu einem durchschnittlichen A β -Anstieg von 0,5% pro Prozentpunkt 25(OH)D3-Reduktion.

Briones und Darwish beschrieben ebenfalls einen Einfluss von 1,25(OH)₂D3 auf die A β -Pathologie. Männliche *Wildtyp F344 Ratten* mit einem Alter von 6 Monaten (*junge Population*) bzw. 20 Monaten (*alte Population*) erhielten über einen Zeitraum von 21 Tagen subkutane Injektionen mit 1,25(OH)₂D3. Durch diesen Versuchsaufbau konnten sie zusätzlich altersspezifische Aussagen über die Auswirkung einer Vitamin D-Supplementierung treffen. Interessanterweise kam es bei den jungen Ratten zu keiner signifikanten Änderung des 1,25(OH)₂D3-Plasmaspiegels, wohingegen er bei den alten Ratten signifikant erhöht war. Entsprechend kam es zu keiner signifikanten Änderung der untersuchten A β -Oligomere im

Hippocampus der jungen Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren. Im Gegensatz dazu zeigten die alten im Vergleich zu den jungen Tieren eine signifikant höhere Anzahl an A β -Oligomeren (35% höher in alten Kontroll- und 18% höher in alten 1,25(OH)₂D₃-supplementierten Ratten), wobei die 1,25(OH)₂D₃-supplementierten, alten Tiere signifikant weniger A β -Oligomer aufwiesen (BRIONES, DARWISH, 2012). Folglich scheint eine Vitamin D-Supplementierung v.a. im Alter eine wichtige Rolle einzunehmen. Unter zusätzlichem Einbezug der hier dargelegten Daten, sollte bereits ein leichtgradiger Mangel ausgeglichen werden, da dieser schon Auswirkungen auf den Erkrankungsbeginn haben könnte.

5.2.2. Eine Vitamin D-Supplementierung *in vitro* führt zu einer A β -Reduktion

Während *in vivo* die A β -Pathologie unter Vitamin D-Mangelbedingungen untersucht wurde, sollte *in vitro* der Einfluss einer supraphysiologischen Supplementierung auf die A β -Produktion beurteilt werden. Es wurde zwischen einer Kurzzeit- und einer Langzeitinkubation unterschieden. Wie bereits in dem Kapitel 5.1. beschrieben, wiesen die langzeitsupplementierten N2a-Zellen eine 13-fach höhere 25(OH)D₃-Konzentration im Vergleich zu den Kontrollzellen auf. Da es sich bei den SH-SY5Y-Zellen ebenfalls um eine Neuroblastom-Zelllinie handelt, ist von einer ähnlichen Aufnahme an Calcidiol auszugehen. Bezüglich der nachgewiesenen A β -Reduktion unterschieden sich die Kurzzeit- und Langzeitinkubation um ca. das Vierfache (45% vs. 13%), was jedoch vermutlich auf die unterschiedlichen Zelltypen (humane SH-SY5Y-Zellen vs. murine N2a-Zellen) und die unterschiedliche Behandlung der Zellen (stabil vs. transient transfiziert) zurückzuführen ist. Gezen-Ak *et al.* untersuchten in einer aktuellen Studie u.a. den Einfluss von Vitamin D auf die A β -Homöostase *in vitro*. Es wurden kortikale Primärneurone von Ratten verwendet und diese mit zwei verschiedenen Konzentrationen an Calcitriol inkubiert (10 nM und 100 nM). Die A β ₄₂-Konzentrationen wurden intrazellulär mittels Immunfluoreszenz und extrazellulär mittels ELISA bestimmt. Es wurden zwei Zeitpunkte untersucht – eine 24 stündige und eine 48 stündige Inkubation der Zellen. Passend zu den hier dargelegten Daten zeigten sich sowohl die intrazellulären als auch die extrazellulären A β ₄₂-Spiegel reduziert. Interessanterweise zeigte sich eine stärkere intra- und extrazelluläre A β ₄₂-Reduktion nach 24 stündiger Inkubation mit der niedrigeren Konzentration. Nach 48 h waren die A β ₄₂-Spiegel für beide Konzentrationen weiterhin reduziert im Vergleich zu den Kontrollzellen, glichen sich jedoch auf einem Niveau an (GEZEN-AK *et al.*, 2017). Auch hier ist von einer supraphysiologischen Supplementierung auszugehen, da die Primärneurone für mindestens 7 Tage vor Beginn der

Experimente kultiviert wurden. Die Beobachtung, dass die geringere Calcitriol-Konzentration eine stärkere A β ₄₂-Reduktion nach 24 h bewirkte und diese nach 48 h nicht überschritten wurde, lässt vermuten, dass bei suffizienter Versorgung eine zusätzliche Supplementierung zwar eine A β -Reduktion bewirken kann, jedoch eine Sättigungskurve besteht. Da es sich bei dieser Untersuchung lediglich um *in vitro* Untersuchungen handelt, sollte diese Hypothese *in vivo* überprüft werden. Hieraus könnten wichtige Schlussfolgerungen zur Risiko-Nutzen-Abwägung (Nebenwirkungen vs. A β -Reduktion) bei einer Supplementierung unter suffizienter Versorgung gezogen werden.

5.3. Beeinflussung der amyloidogenen APP-Prozessierung durch Vitamin D

5.3.1. Ein Vitamin D-Mangel *in vivo* führt zu einer Steigerung der β -Sekretase-Aktivität

Um die Ursache der erhöhten A β -Proteinspiegel zu untersuchen, wurde in Kap. 4.2.1.1. die β -Sekretase-Aktivität aus den Vitamin D-defizienten Maushirnen bestimmt. Es zeigte sich eine signifikante Steigerung der Aktivität um ca. 6% (s. Kap. 4.2.1.1.), bei gleichzeitiger ca. 16%iger BACE1-Proteinspiegelerhöhung (s. Kap. 4.2.1.4.). Die BACE1-Aktivitätsmessung wurde in einem zweiten Kollektiv wiederholt, da sich der Effekt relativ schwach darstellt. Auch hier zeigte sich eine signifikante BACE1-Aktivitätssteigerung um ca. 8%. Zusätzlich wurden die erstellten PNFs vor der Messung mit 25(OH)D₃ inkubiert. Da durch diesen Versuchsaufbau keine Beeinflussung der Enzymaktivität durch Transkriptions- und Translationsvorgänge erfolgte, konnte hierdurch eine Aussage über den *direkten* Einfluss von Calcidiol auf BACE1 getroffen werden (s. Kap. 4.2.1.2.). Es zeigte sich eine im Vergleich zur un-supplementierten Situation (108,4%) eine signifikant reduzierte BACE1-Aktivität auf 104,9%, sodass vermutet werden kann, dass Calcidiol direkt mit BACE1 interagiert. Calcidiol hat als Secosteroid eine große strukturelle Ähnlichkeit zu Cholesterin (s. Abbildung 1), welches direkt mit BACE1 interagieren kann (KALVODOVA et al., 2005). Eine abschließende Aussage bezüglich der sAPP β -Proteinspiegelsteigerung, als Ausdruck der gesteigerten Sekretaseaktivität, konnte aufgrund eines zu geringen Stichprobenumfangs und bestehenden Effekten im einstelligen Prozentbereich nicht nachgewiesen werden (s. Kap. 4.2.1.3.). Es bestand lediglich eine tendenzielle Steigerung der sAPP β -Proteinspiegel um 4,06% ohne signifikanten Unterschied zur β -Sekretaseaktivitätssteigerung. Interessanterweise zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der β -Sekretase-Aktivitätssteigerung und den bestimmten BACE1-Proteinspiegeln (6% Sekretase-Aktivitätssteigerung vs. 16% Proteinspiegelsteigerung) ($p = 0,009^{**}$). Diese Beobachtung könnte auf eine gesteigerte *de novo* Synthese oder eine verminderte BACE1-Degradation zurückzuführen sein, mit

gleichzeitiger Akkumulation von inaktiven BACE1-Molekülen in der Zelle. Eine gesteigerte *de novo* Synthese erscheint jedoch in diesem Zusammenhang unwahrscheinlicher, da in Kapitel 4.2.1.5. gezeigt werden konnte, dass die *Bace1*-Genexpression unverändert bzw. sogar tendenziell reduziert war. Die Reduktion der Bace1-mRNS-Menge könnte Ausdruck einer möglichen Gegenregulation auf Gen-Ebene auf die gesteigerten BACE1-Proteinspiegel darstellen. Eine Änderung der *Translation* unter Vitamin D-defizienten Bedingungen wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, sodass letztlich keine endgültige Beurteilung der BACE1 *de novo* Synthese möglich ist.

Wie bereits oben erwähnt, lässt sich jedoch die hier beobachtete BACE1-Proteinspiegelerhöhung potentiell durch eine geänderte BACE1-Degradation unter Vitamin D-Mangelbedingungen erklären. BACE1 kann lysosomal und proteasomal abgebaut werden (KOH et al., 2005; QING et al., 2004). Während bei der Regulation der lysosomalen Degradation vor allem GGA3 eine wichtige Rolle spielt (KANG et al., 2010; KOH et al., 2005; TESCO et al., 2007), ist die proteasomale BACE1-Degradation von der *Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 (UCHL1)* abhängig (ZHANG et al., 2012). Vor allem das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) wird in Zusammenhang mit dem Vitamin D-Metabolismus gebracht. Entsprechend werden zahlreiche Gene des UPS durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ reguliert (ALVAREZ-DÍAZ et al., 2010). Eine Untersuchung von Muskelzellen zeigte, dass zahlreiche Gene, die im Proteinkatabolismus beteiligt sind, unter Vitamin D-defizienten Bedingungen herunterreguliert sind. Dabei gehören die am stärksten betroffenen Gene zum UPS (MAX et al., 2013). Im Gegensatz dazu scheint die lysosomale Aktivität unter Vitamin D-Mangelbedingungen nicht verändert zu sein (BHAT et al., 2013). Bemerkenswerterweise besteht ein möglicher Zusammenhang zwischen einem dysfunktionalen UPS und der Alzheimer-Erkrankung (DE VRIJ et al., 2001; KELLER et al., 2000; VAN LEEUWEN et al., 1998). Folglich könnte eine Vitamin D-Defizienz bei Alzheimer-Patienten die proteasomalen Dysfunktion zusätzlich verstärken.

Auch weitere Arbeitsgruppen beschrieben eine BACE1-Proteinänderung unter Vitamin D-Mangelbedingungen. Yu *et al.* beobachteten neben einer signifikanten Reduktion der $\text{A}\beta_{40}$ - und $\text{A}\beta_{42}$ -Proteinspiegel, eine signifikante Reduktion der β -CTF-Proteinspiegel in den Vitamin D-supplementierten Mäusen im Vergleich zu den Kontroll- und Vitamin D-defizienten Tieren. Zusätzlich zeigten die supplementierten Tiere einen signifikanten sAPP α -Anstieg. Da die α - und die β -Sekretase um das APP-Substrat konkurrieren, schlussfolgerten die Autoren, dass ihre Beobachtungen auf eine mögliche β -Sekretaseaktivitätssteigerung unter Vitamin D-Mangelbedingungen zurückzuführen sei (YU et al., 2011). Auch Briones und

Darwish zeigten in ihrer Studie, dass es unter Vitamin D-Mangelbedingungen zu einer signifikanten Erhöhung der BACE1-Proteinspiegel im Hippocampus kommt (BRIONES, DARWISH, 2012). Diese wurde nur in der alten Rattenpopulation beobachtet, wohingegen die sechs Monate alten Tiere keine Änderung der BACE1-Proteinspiegel nach 1,25(OH)₂D₃-Supplementierung aufwiesen. Verschiedene Studien zeigen, dass sowohl die BACE1-mRNS, als auch der -Proteingehalt und die -Aktivität im Gehirn von Alzheimer-Patienten erhöht sind (FAGHIHI et al., 2008; FUKUMOTO et al., 2002; LI et al., 2004), sodass sich ein Ausgleich einer Hypovitaminose D bei diesen Patienten aufgrund der dargelegten Ergebnisse als sinnvoll darstellt.

5.3.2. Eine Vitamin D-Supplementierung *in vitro* führt zur Reduktion der β -Sekretase-Aktivität

Während sich *in vivo* lediglich geringe Effekte auf die β -Sekretase unter milden-moderaten Mangelbedingungen zeigten, führte eine Supplementierung *in vitro* zu einer hochsignifikanten 26%igen Reduktion der β -Sekretase-Aktivität auf lebenden SH-SY5Y-Zellen. Nach Inkubation von PNFs aus SH-SY5Y-Zellen zeigte sich in Übereinstimmung mit dem unter 4.2.1.2. beschriebenen *direkten* Effekt von Calcidiol auf die β -Sekretase eine tendenzielle Reduktion der Aktivität um 4,24%. Als zusätzliche Erklärung der dokumentierten Aktivitätsreduktion wurde eine signifikante Reduktion der *BACE1*-Genexpression auf 81% ($p = 0,003^{**}$) und -Proteinspiegel auf 54% ($p = 0,004^{**}$) im Vergleich zu den Kontrollzellen nachgewiesen. Hierbei unterschieden sich die Genexpression und Proteinspiegel signifikant voneinander, was erneut auf eine geänderte BACE1-Proteinstabilität hindeuten könnte. Es ist möglich, dass BACE1, wie im vorangegangenen Kapitel bereits ausführlich diskutiert, vermehrt Vitamin D-abhängig im UPS degradiert wird. Dies muss jedoch in weiteren experimentellen Ansätzen überprüft werden.

Bezüglich der beschriebenen *BACE1*-Genexpressionsreduktion konnten in einer aktuellen Zellkulturuntersuchung ähnliche Effekte nachgewiesen werden. Gezen-Ak *et al.* behandelten kortikale Primärneurone von Ratten mit u.a. *VDR* siRNS, was eine *VDR*-Expressionsreduktion bedingte. Dies führte in den untersuchten Zellen zu einer signifikanten Erhöhung der *BACE1*-Genexpression und -Proteinmenge. Umgekehrt resultierte eine Inkubation der Zellen mit Calcitriol über 48 h in eine signifikante *BACE1*-mRNS-Reduktion im Vergleich zu den Kontrollzellen (GEZEN-AK et al., 2017). Folglich kann die *BACE1*-Expression über den *VDR* reguliert werden. Die *BACE1*-Promotorregion enthält zahlreiche Bindedomänen für verschiedene Transkriptionsfaktoren (CHRISTENSEN et al., 2004), wobei

u.a. NF- κ B an diese binden und die Genexpression regulieren kann (BOURNE et al., 2007; BUGGIA-PREVOT et al., 2008). A β_{42} kann u.a. über diesen Weg die *BACE1*-Expression induzieren (BUGGIA-PREVOT et al., 2008). Calcitriol ist ebenfalls in der Lage den NF- κ B-Signalweg zu beeinflussen. Es wurde beschrieben, dass 1,25(OH) $_2$ D $_3$ die Expression von I κ B- α , dem Inhibitor von NF- κ B, steigert und gleichzeitig dessen Phosphorylierung vermindert, was zu einer reduzierten proteasomalen Degradation des Inhibitors führt. Zusätzlich verringert Vitamin D die Translokation von NF- κ B in den Kern (CHAGAS et al., 2012). Daher könnte die erfolgte Calcidiol-Supplementierung zu einer Hemmung des NF- κ B-Signalwegs führen und folglich eine Reduktion der *BACE1 de novo* Synthese bedingen.

5.3.3. Ein moderater Vitamin D-Mangel *in vivo* führt zu tendenziellen Veränderungen des γ -Sekretase-Komplexes

Da eine Änderung der β -Sekretase-Aktivität unter milden-moderaten Vitamin D-Mangelbedingungen nachgewiesen werden konnte, wurde ab Kapitel 4.2.1.6. die γ -Sekretase, als weiteres essentielles Enzym des amyloidogenen Prozessierungsweges, analysiert. Zur Untersuchung einer γ -Sekretase Proteinspiegeländerung, wurde stellvertretend der Nicastrin-Proteingehalt aus den Mausgehirnen bestimmt. Nicastrin stellt eine essentielle Untereinheit des multimerischen Enzymkomplexes dar und ist u.a. für dessen Maturation verantwortlich (CHÁVEZ-GUTIÉRREZ et al., 2008). Außerdem hat Nicastrin, im Vergleich zu den anderen Untereinheiten, nur eine Isoform, was die Aussage über das Vorliegen aktiver γ -Komplexe erleichtert.

Im Gegensatz zur β -Sekretase, zeigten sich für die γ -Sekretase keine signifikanten Unterschiede zwischen den Vitamin D-defizienten Tieren und den Kontrollmäusen. Dennoch waren die Nicastrin-Proteinspiegel (vgl. Kap. 4.2.1.7.) sowie die mRNA-Expression einzelner Untereinheiten des multimerischen Komplexes tendenziell geändert (vgl. Kap. 4.2.1.8.): Während die γ -Sekretase-Aktivität keine Änderung zwischen beiden Gruppen aufwies (0,96%, n.s.), waren die Nicastrin-Proteinspiegel in den Vitamin D-defizienten Tieren um ca. tendenziell 7% erhöht. Auch die Nicastrin-Genexpression zeigte eine tendenzielle Steigerung und unterschied sich nicht signifikant von den bestimmten Proteinspiegeln. Folglich könnte die Proteinspiegelsteigerung auf eine vermehrte Transkription zurückzuführen sein. Auch eine verminderte Degradation über das UPS, wie unter 5.3.1. diskutiert, ist denkbar, da Nicastrin ebenfalls über diesen Weg abgebaut wird (HE et al., 2007). Die Expression von *Presenilin 2* und dem *Presenilin Enhancer* war ebenfalls tendenziell erhöht. Nach Verrechnung aller Untereinheiten zeigte sich zusätzlich eine 9%ige, jedoch nicht signifikante,

Expressionssteigerung des gesamten γ -Sekretase-Komplexes (s. Kap. 4.2.1.8.). Die eingeschränkte Anzahl an *in vivo* Proben lässt jedoch keine abschließende Beurteilung der tatsächlichen Expressionsänderung der γ -Sekretase-Untereinheiten unter leichten-moderaten Vitamin D-Mangelbedingungen zu.

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass bei moderater Vitamin D-Defizienz tendenziell die Expression der γ -Sekretase-Komponenten sowie die Nicastrin-Proteinspiegel erhöht sind. Gleichzeitig zeigt sich jedoch keine Veränderung der γ -Sekretase-Aktivität. Die Aktivitätsbestimmung basiert auf der proteolytischen Spaltung eines Peptids, wodurch die n- und c-terminal verknüpften Fluorophor- und Quencher-Moleküle räumlich voneinander getrennt werden. Hierdurch kommt es bei der Spaltung zur Fluoreszenz. Da das verwendete Peptid nicht nur durch die γ -Sekretase, sondern ebenfalls durch andere Proteasen degradiert werden kann, ist mit einer gewissen Unspezifität zu rechnen. Experimentell wurde versucht diese durch Membranpräparation und durch das Einsetzen verschiedener Proteaseinhibitoren zu reduzieren. Es ist dennoch mit einer Unspezifität der Aktivitätsbestimmung von 10-20% zu rechnen. Insbesondere bei der, aufgrund der Expressions- und Proteinspiegel-Analyse zur erwartenden, Aktivitätssteigerung im einstelligen Prozentbereich, kann dies dazu führen, dass Veränderungen nicht detektierbar waren. Es gilt zu klären, ob sich die tendenziellen Expressionsunterschiede mit zunehmender Vitamin D-Mangelsituation verstärken würden. Dies ist von besonderem Interesse, da Untersuchungen umgekehrt einen möglichen Einfluss der γ -Sekretase auf den Vitamin D-Metabolismus nahelegen: Es wurde beschrieben, dass Megalin durch die γ -Sekretase geschnitten wird (ZOU et al., 2004). Megalin (auch *Low Density Lipoprotein receptor-related Protein 2 – LRP2*) gehört zur LDL-Rezeptor Superfamilie und ist wichtig für die endozytotische Aufnahme von 25(OH)D₃ in die Zelle (NYKJAER et al., 1999; SAITO et al., 1994). Die Megalin-Expression wird durch Vitamin D reguliert und durch 1,25(OH)₂D₃ gesteigert (LIU et al., 1998). Im ZNS befindet sich Megalin vor allem im Plexus choroideus (ZHENG et al., 1994) sowie in Oligodendrozyten des Rückenmarks (WICHER et al., 2006). In Neuronen und Gliazellen wurde das Protein hingegen nicht nachgewiesen (CHUN et al., 1999; KOUNNAS et al.). Folglich könnte Megalin eine wichtige Rolle beim Transport von 25(OH)D₃ über die Blut-Hirn-Schranke spielen. Zusätzlich transportiert Megalin A β aus dem Liquor in die Blutzirkulation (ALVIRABOTERO, CARRO, 2010). Zusammengefasst könnte dies bedeuten, dass die Megalin-Expression unter Vitamin D-Mangelbedingungen reduziert ist, was zu einem verminderten Transport von 25(OH)D₃ in den Liquor und von A β in die Blutzirkulation führen könnte. Dies würde zu einer Verschlechterung der Vitamin D-Versorgung des Gehirnparenchyms und

zu einem verminderten A β -Abtransport führen. Eine mögliche Steigerung der γ -Sekretase-Aktivität unter Vitamin D-defizienten Bedingungen könnte diesen Zustand noch weiter verschlechtern. Diese Hypothese muss jedoch in Folge-Studien weiter untersucht werden.

5.3.4. Eine Vitamin D-Supplementierung *in vitro* führt zur signifikanten Reduktion der γ -Sekretase-Aktivität

Aufgrund der nicht eindeutigen Datenlage bei den Vitamin D-defizienten Mäusen, wurde der Einfluss von Calcidiol auf die γ -Sekretase-Aktivität in lebenden SH-SY5Y-Zellen untersucht. Dies erfolgte in Analogie zur *in vitro* β -Sekretase-Aktivitätsmessung, d.h. es wurden Neuroblastomzellen für 24 h (8 + 16 h) mit einer supraphysiologischen Konzentration von 100 nM 25(OH)D₃ inkubiert. Es zeigte sich eine signifikante Aktivitätsreduktion der γ -Sekretase auf 85% im Vergleich zu den Kontrollzellen ($p < 0,001$ ***). Zusätzlich wurde die Nicastrin-Expression bestimmt. Diese zeigte sich im selben Maße auf 83% signifikant reduziert (vgl. Kap. 4.4.2.3.). Hierbei bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der Aktivität- und der Expressionsänderung, sodass vermutet werden kann, dass die Aktivitätsreduktion auf die dokumentierte Expressionsreduktion zurückzuführen sein könnte. Interessanterweise zeigten Gezen-Ak *et al.* in der bereits oben beschriebenen Studie in Übereinstimmung mit den hier dargelegten Daten, dass eine Inkubation von kortikalen Primärneuronen mit Calcitriol über 48 h zu einer signifikanten Reduktion der Nicastrin-Expression führte. Dies dokumentierten die Autoren sowohl für eine eingesetzte Konzentration von 10 nM, als auch für 100 nM. Des Weiteren untersuchten die Autoren den Einfluss von 1,25(OH)₂D₃ auf die Presenilin 1- und 2-Expression. Hier ergaben sich keine eindeutigen Ergebnisse – Die *PS1*-Expression zeigte zeit- (12 – 24 – 48 h) und konzentrationsabhängige (10 nM und 100 nM) Schwankungen. Nach einem Zeitraum von 48 h war sie im Vergleich zu den Kontrollzellen tendenziell (10 nM) bzw. sogar signifikant erhöht (100 nM). Die *PS2*-Expression unterschied sich nach dem entsprechenden Zeitraum hingegen nicht signifikant von der Kontrolle. Die Behandlung der Zellen mit *VDR* siRNS führte passend zu einer gesteigerten Nicastrin-Expression und zu einer signifikanten Erhöhung der Nicastrin-Proteinspiegel. Bemerkenswerterweise führte dieses Vorgehen auch zu einer signifikanten Steigerung der *PS1*- und *PS2*-mRNS-Spiegel und –Proteinmenge, im Gegensatz zu den inhomogenen Ergebnissen nach erfolgter Supplementierung. Diese Daten decken sich mit den tendenziellen Expressionsänderungen, welche im Mausmodell nachgewiesen wurden (s.o.) (GEZEN-AK *et al.*, 2017). Dies stützt die Vermutung, dass in einer Vitamin D-Mangelsituation durchaus die γ -Sekretase mitbetroffen ist und die fehlende

Signifikanz auf die oben dargelegten Versuchsbedingungen zurückzuführen war. Des Weiteren lassen die Daten von Gezen-Ak *et al.* annehmen, dass der Ausgleich einer Mangelsituation in Bezug auf die Expressions- und Proteinspiegeländerungen der γ -Sekretase-Untereinheiten (Nicastrin, Presenilin 1 und 2) wesentlich wichtiger erscheint, als eine zusätzliche Supplementierung, da sich hier lediglich eine Änderung der Nicastrin-Expression und -Proteinmenge zeigte. Diese Beobachtung muss jedoch weiter verifiziert werden.

5.4. Beeinflussung der nicht-amyloidogenen APP-Prozessierung durch Vitamin D

In Kapitel 4.2.2. wurde die Auswirkung der Vitamin D-Mangelsituation *in vivo* auf den nicht-amyloidogenen Prozessierungsweg untersucht. Es zeigte sich eine tendenzielle Steigerung der α -Sekretase-Aktivität um ca. 5% ($p = 0,06$ n.s.). Ein Erreichen des Signifikanzniveaus wäre eventuell durch eine Erhöhung des Stichprobenumfangs möglich gewesen, jedoch stand lediglich die angegebene Anzahl an Mäusen zur Verfügung. Des Weiteren ist in Analogie zur γ -Sekretase-Aktivitätsbestimmung die Unspezifität der Methode zu beachten (s. Kap. 5.3.3.). Die tendenzielle Steigerung der α -Sekretase wurde auf eine signifikante ADAM17-Proteinspiegelerhöhung zurückgeführt (10,46%, $p = 0,03^*$), wohingegen die ADAM10-Proteinmenge in den Vitamin D-defizienten Tieren nicht erhöht war (0,22%; $p = 0,96$ n.s.) (vgl. Kap 4.2.2.2.). Eine gleichzeitige *Adam17*-Expressionssteigerung, welche die erhöhten Proteinspiegel erklärt hätte, wurde in Kap. 4.2.2.3. nicht nachgewiesen, sodass von einem proteinstabilisierenden Effekt auszugehen ist, welcher später detaillierter diskutiert wird. Obwohl in der vorliegenden Arbeit keine signifikante Änderung der ADAM10-Proteinspiegel und der *Adam17*-Genexpression *in vivo* nachgewiesen werden konnte, ist jedoch ein möglicher Einfluss des Vitamin D-Metabolismus auf die Expressionsregulation der beiden Metalloproteinasen denkbar:

Tippmann *et al.* untersuchten den Einfluss verschiedener Retinoid X Receptor (RXR)-Liganden auf die *ADAM10*-Genexpression. Sie zeigten, dass diese durch Retinoid Acid Receptor(RAR)/Retinoid X Receptor(RXR)-Heterodimere nach Stimulation mit Retinolsäure gesteigert werden konnte. Der VDR bildet ebenfalls Heterodimere mit dem RXR (DUSSO *et al.*, 2005). Entsprechend zeigten die Autoren, dass eine Aktivierung des VDRs mit Calcitriol zu einer erhöhten *ADAM10*-Promotoraktivität, jedoch zu keiner signifikanten Änderung der sAPP α -, sAPP β - und ADAM10-Proteinspiegel führte (TIPPMANN *et al.*, 2009). Es ist jedoch zu beachten, dass Tippmann *et al.* supraphysiologische 1,25(OH) $_2$ D $_3$ -Konzentrationen verwendeten. Während die physiologische Serum-*Calcitriol*-Konzentration zwischen

30-70 pg/ml (entspricht 70-170 pM) liegt (BELL et al., 1985; PARIKH et al., 2004), wurden die Zellen in der Studie mit 25 nM 1,25(OH)₂D₃ behandelt. Folglich ist es schwierig eine definitive Aussage über eine Vitamin D-abhängigen *ADAM10*-Expressionsregulation unter *in vivo* Bedingungen zu treffen. In der vorliegenden Arbeit wurden daher Neuroblastom-Zelllinien mit einer (supra-)physiologischen *Calcidiol*-Konzentration von 100 nM für 24 h inkubiert. Wie beschrieben, tragen unterschiedliche Matrixmetalloproteasen zur α -Sekretase-Aktivität bei. Es wurde daher beschlossen die Gesamtaktivität der α -Sekretase zu bestimmen. In Übereinstimmung mit Gezen-Ak *et al.*, welche eine signifikante Steigerung der *ADAM10*-Expression nach 48 stündiger Inkubation von kortikalen Primärneuronen mit 10 nM Calcitriol beschrieben (GEZEN-AK et al., 2017), dokumentierten wir einen signifikanten Anstieg der Gesamtaktivität der α -Sekretase auf ca. 115% ($p = 0,015^*$) *in vitro*. In diesem Zusammenhang ist hervorzuheben, dass die beobachtete Aktivitätssteigerung nicht nur auf eine mögliche Erhöhung der *ADAM10*-Expression, sondern auch auf eine Vitamin D-abhängige Verlagerung von *ADAM10* aus dem Zytosol an die Plasmamembran bedingt sein könnte, wie in einer neueren Studie von Yang *et al.* beschrieben wurde (YANG et al., 2016). Dies würde eine bessere Zugänglichkeit des Enzyms zum Substrat bedingen.

Die *ADAM17*-Expression kann ebenfalls durch den Vitamin D-Metabolismus reguliert werden (DUSSO et al., 2010). Die *TACE*-Promotorregion enthält keine *Vitamin D-Response Elements (VDREs)*, jedoch verschiedene *CCAAT enhancer-binding protein β (C/EBP β)* Bindedomänen. C/EBP β ist ein Transkriptionsaktivator und gehört zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren, die in der Regulation von Zellwachstum, Differenzierung und Inflammation beteiligt sind (HANSON, 1998; RAMJI, FOKA, 2002). Interessanterweise führt Calcitriol zu einer Steigerung der C/EBP β -mRNS-Spiegel (DHAWAN et al., 2005). Somit könnte Vitamin D über diesen Weg Einfluss auf die *TACE*-Expression haben, was jedoch in weiteren Studien verifiziert werden sollte.

Da in der vorliegenden Arbeit unter den gewählten Versuchsbedingungen einer nur moderaten Vitamin D-Defizienz kein Einfluss auf die *ADAM17*-Expression nachgewiesen wurde, ist die beschriebene *ADAM17*-Proteinspiegelerhöhung vermutlich auf eine Translations-steigerung oder eine Proteinstabilisierung zurückzuführen. Beide Möglichkeiten wurden im Folgenden aufgrund von fehlendem Material nicht genauer untersucht. In Anbetracht der diesbezüglichen Literatur erscheint jedoch eine Proteinstabilisierung naheliegender. Dusso *et al.* diskutierten eine mögliche Vitamin D-abhängige *ADAM17*-Proteinstabilisierung über Beeinflussung des epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor- (*engl.: epidermal growth factor receptor (EGFR)*) und des Angiotensin II (AngII)-Signalwegs (DUSSO et al., 2010). Der *EGFR*, ein

transmembranes Glykoprotein, ist an der Regulation des Zellwachstums beteiligt (CARPENTER, 1987; HILL, TREISMAN, 1995). EGFR erhöht die ADAM17-Proteinspiegel durch Verlängerung der Halbwertszeit des Proteins, ohne die Genexpression zu beeinflussen (SANTIAGO-JOSEFAT et al., 2007). Calcitriol hingegen bedingt eine Veränderung der EGFR-Lokalisation und führt zu einer Inhibition des EGFR-Signalwegs (CORDERO et al., 2002).

Ang II ist ein Haupteffektor des Renin-Angiotensin-Aldosteronsystems. Es führt zu einer Induktion von TACE (LAUTRETTE et al., 2005), wohingegen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zu einer Reduktion der ATII-Typ 1-Rezeptoren führt (DONG et al., 2012).

Aus der oben genannten Literatur ist daher zu folgern, dass ein Vitamin D-Mangel eine TACE-Stabilisierung durch eine verminderte Inhibition des EGFR-Signalweges bzw. durch eine Erhöhung der ATII-Rezeptoren bedingt. Dies muss jedoch in weiteren Studien analysiert werden, da die vorliegenden Daten hauptsächlich aus Untersuchungen der renalen TACE-Expression stammen und somit nicht ohne weiteres auf die zerebrale Expression zu übertragen sind.

Unter Beachtung, dass *ADAM17* im Gehirn nicht nur in Endothelien sondern v.a. auch in Gliazellen exprimiert wird (GODDARD et al., 2001; KÄRKKÄINEN et al., 2000), stellt sich die Frage, welche Auswirkung eine ADAM17-Proteinspiegelerhöhung haben könnte?

ADAM17 ist für die Aktivierung von $\text{TNF}\alpha$ durch den Schnitt des inaktiven membrangebundenen $\text{TNF}\alpha$ -Vorläufers verantwortlich (BLACK et al., 1997; MOSS et al., 1997). Entsprechend führt eine TACE-Inhibition zu einer signifikanten Reduktion der LPS-induzierten $\text{TNF}\alpha$ -Produktion (HORIUCHI et al., 2007; ZHANG et al., 2004). Die pro-inflammatorischen Eigenschaften von $\text{TNF}\alpha$ werden vorwiegend über den $\text{TNF}\alpha$ Rezeptor Typ I und zu einem geringeren Maße über den $\text{TNF}\alpha$ Rezeptor Typ II vermittelt. Interessanterweise werden beide Rezeptoren durch ADAM17 geschnitten (REDDY et al., 2000; SOLOMON et al., 1999). Dies führt zu einer verminderten zellulären Antwort auf $\text{TNF}\alpha$ und bedingt zusätzlich die Bildung eines löslichen $\text{TNF}\alpha$ -Antagonisten (PORTEU, NATHAN, 1990). Somit kann TACE auch zu einer Abschwächung der Inflamationsreaktion beitragen.

Zusätzlich hat ADAM17 Einfluss auf den Signalweg von IL-6, welches ebenfalls ein pro-inflammatorisches Zytokin darstellt. Verschiedene Studien zeigten, dass TACE in der Lage ist den IL-6-Rezeptor zu schneiden (ALTHOFF et al., 2000; MATTHEWS et al., 2003). Der dadurch freigesetzte Rezeptor bindet IL-6 und löst eine Signalkaskade aus, die in einen möglichen Zusammenhang mit chronischen Inflamationsreaktionen gebracht wurde (ROSE-

JOHN et al., 2006). Entsprechend wurde eine Beteiligung von TACE bei chronisch entzündlichen ZNS-Erkrankungen, wie der Multiplen Sklerose, beschrieben (KIESEIER et al., 2003).

TNF- α und IL-6 sind u.a. im Alzheimer-Gehirn erhöht (DICKSON et al., 1993; WOOD et al., 1993), sodass eine Vitamin D-Mangelsituation mit daraus resultierender TACE-Proteinspiegelerhöhung zu einer Verstärkung pro-inflammatorischer Vorgänge, wie sie bei der Alzheimer-Krankheit beschrieben wurde (HENEKA et al., 2015), führen könnte. Passend dazu zeigen verschiedene Studien eine inverse Korrelation zwischen dem Vitamin D-Serumstatus und unterschiedlichen Inflammationsmarkern (DOBNIG et al., 2008; JABLONSKI et al., 2011), was u.a. durch veränderte TACE-Spiegel erklärt werden könnte. Folglich sollte auch unter diesen Gesichtspunkten ein Mangel ausgeglichen werden, um ein Gleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Prozessen zu schaffen. Diese Forderung wird u.a. durch Beobachtungen von Yu *et al.* und Briones und Darwish gestützt. Yu *et al.* zeigten, dass die TNF α -Spiegel in den Vitamin D-defizienten und Kontrolltieren im Vergleich zu den Vitamin D-supplementierten Mäusen signifikant gesteigert waren. Zusätzlich war in den erstgenannten Gruppen die Anzahl der aktivierten Astrozyten signifikant erhöht (YU et al., 2011). Auch Briones und Darwish fanden einen signifikanten Anstieg an pro-inflammatorischem IL-1 β mRNA- und Proteinspiegeln in den Gehirnen der alten Ratten, wobei die 1,25(OH) $_2$ D $_3$ -Supplementierung zu einer signifikanten Reduktion führte. Zusätzlich konnte durch die Supplementierung ein signifikanter Anstieg des anti-inflammatorisch wirksamen IL-10 erzielt werden (BRIONES, DARWISH, 2012). Ein potentieller Einfluss auf die Inflammation, wie oben diskutiert, konnte auch in neueren experimentellen Ansätzen unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden. SH-SY5Y-Zellen zeigten nach Calcidiol-Inkubation eine tendenzielle Reduktion des proinflammatorischen IL-1 β (GRIMM et al., 2017).

5.5. Beeinflussung der A β -Degradation durch Vitamin D

5.5.1. Ein Vitamin D-Mangel *in vivo* führt zu einer Reduktion der A β -Gesamtdegradation

Neben der A β -Produktion wird der zerebrale A β -Gehalt maßgeblich durch die A β -Degradation beeinflusst. Ein Verschieben des Gleichgewichts zwischen Synthese und Abbau kann zur A β -Pathologie führen und folglich das Risiko an der sporadischen Form der Alzheimer-Krankheit zu erkranken erhöhen (BATEMAN et al., 2006; MAWUENYEGA et al., 2010). Entsprechend stellt die Beeinflussung der A β -Degradation, neben der APP-

Prozessierung, ein interessantes therapeutisches Ziel für die Prävention und Behandlung der Alzheimer-Krankheit dar.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer Hypovitaminose D *in vivo* (s. Kap. 4.3.) und einer supraphysiologischen Vitamin D-Supplementierung *in vitro* (s. Kap. 4.4.4.) auf die A β -Degradation untersucht. *In vitro* wurde zusätzlich zwischen einer Kurzzeit- und einer Langzeitsupplementierung unterschieden.

Es zeigte sich, dass bei Vitamin D-defizienten Mäusen die A β -Gesamtdegradation im Vergleich zu den Kontrollen signifikant um ca. 21% ($p = 0,002^{**}$) reduziert war. Nach Zugabe von 25(OH)D₃ zu den Homogenaten der Vitamin D-defizienten Tiere konnte ein tendenzieller, jedoch nicht signifikanter Anstieg der A β -Gesamtdegradation beobachtet werden (s. Kap. 4.3.1.). Da Calcidiol zu Homogenaten und somit metabolisch inaktiven Proben hinzugegeben wurde, konnte 25(OH)D₃ die A β -Degradation nicht über eine Erhöhung der Translation und Transkription beeinflussen. Der beobachtete Effekt könnte daher auf eine direkte Interaktion von Calcidiol mit den A β -degradierenden Enzymen zurückzuführen sein. Da nach der Zugabe von Calcidiol die A β -Degradation nur partiell anstieg und ein signifikanter Unterschied zu den Kontroll-Mäusen bestand, ist davon auszugehen, dass dies auf weitere *indirekte*, Vitamin D-abhängige Effekte, wie Beeinflussung der Transkription, Translation und/oder Proteinsortierung etc., zurückzuführen ist. Es ist kritisch anzumerken, dass im Homogenat zahlreiche Proteasen durch den Aufschluss der Zellen freigesetzt wurden, welche die Unspezifität der A β -Degradationsbestimmung beeinflussen. Es wurde daher im Folgenden der Einfluss auf die einzelnen an der A β -Degradation beteiligten Enzyme untersucht (s. ab Kap. 5.5.3.).

5.5.2. Eine Vitamin D-Supplementierung *in vitro* führt zu einer zeitabhängigen Steigerung der A β -Gesamtdegradation

Im zweiten Abschnitt der hier vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer supraphysiologischen Vitamin D-Supplementierung auf die A β -Gesamtdegradation unter Zellkulturbedingungen untersucht. Hierfür wurden murine Neuroblastom-Zellen (N2a-Zellen) verwendet. Der Wechsel des Zellkultursystems von SH-SY5Y-Zellen auf N2a-Zellen war notwendig, um den Einfluss der endogenen A β -Produktion bei Messung der A β -Degradation zu exkludieren. Das murine A β unterscheidet sich vom humanen in drei Aminosäuren im n-terminalen Bereich des Peptids (YAMADA et al., 1987). Diese befinden sich im Epitop, an das der verwendete W02-Antikörper bindet. Durch die Supplementierung der murinen Zellen mit humanem A β und Verwendung des W02-Antikörpers, konnte somit die A β -Degradation

unabhängig von der A β -Neusynthese untersucht werden.

Nach kurzer Inkubation von 10-12 h zeigte sich keine Veränderung der A β -Gesamtdegradation (s. Kap. 4.4.4.). Basierend auf den *in vivo* Ergebnissen wurde ein potentieller Einfluss von Vitamin D auf die Genexpression und somit Proteinspiegel der A β -degradierenden Enzyme vermutet. Eine verlängerte Inkubationsdauer ermöglicht die Einstellung der Homöostase der Proteinspiegel unter Vitamin D-Supplementierung. Es wurde daher untersucht, ob nach einer Inkubation über 16 h bzw. nach Langzeitinkubation von vier Wochen eine erhöhte A β -Degradation festzustellen ist. Während nach 10-12 h kein Effekt auf die A β -Gesamtdegradation festgestellt werden konnte, zeigte sich nach 16 h zeitabhängig eine signifikante Erhöhung auf ca. 120% ($p = 0,03^*$) (s. Kap. 4.4.4.) bzw. nach vier Wochen eine hochsignifikante Steigerung auf 154% ($p < 0,001^{***}$) (s. Kap. 4.4.5.2.). Da sich nach vierwöchiger Langzeitinkubation der stärkste Effekt auf die A β -Gesamtdegradation zeigte, wurden alle folgenden Untersuchungen aus den langzeitinkubierten N2a-Zellen durchgeführt. Die beobachtete zeitabhängige Veränderung der A β -Gesamtdegradation kann durch den Vitamin D-Metabolismus selbst und durch zelluläre Vorgänge erklärt werden. Calcidiol kann selbst an den VDR binden, jedoch deutlich schwächer als Calcitriol (DUSSO et al., 2005), folglich sollte für eine optimale Aktivierung des VDR-Signalwegs zunächst eine Umwandlung in das biologisch aktive Calcitriol erfolgen. Über Calcitriol und den VDR erfolgt dann die Beeinflussung der Transkription und Translation der A β -Degradationsenzyme sowie die räumliche Umverteilung innerhalb der Zellkompartimente oder die Sezernierung nach extrazellulär. Diese Abläufe bedürfen einer gewissen Zeit. Schnelle, nicht-genomische Vitamin D-Effekte, die innerhalb von Minuten auftreten, sowie eine direkte Interaktion zwischen den Degradationsenzymen und 25(OH)D₃ scheinen unter den gewählten experimentellen Bedingungen eine untergeordnete Rolle zu spielen.

5.5.3. Ein Vitamin D-Mangel *in vivo* führt zu einer Reduktion der Neprilysin-Aktivität und -Expression

Neprilysin wird als eines der wichtigsten A β -Degradationsenzyme im Gehirn angesehen (SHIROTANI et al., 2001). In Kapitel 4.3.2. konnte gezeigt werden, dass die Neprilysin-Aktivität unter moderaten Vitamin D-Mangelbedingungen im Vergleich zu den Kontrolltieren um rund 6% reduziert war. Die Aktivitätsreduktion konnte auf eine verminderte *Nep*-Genexpression zurückgeführt werden (s. Kap. 4.3.3.). Im direkten Vergleich zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der verminderten Aktivität (~ 6%) und der NEP-mRNS-Reduktion (~ 20%) ($p = 0,013^*$). Dies lässt vermuten, dass unter Vitamin D-defizienten

Bedingungen neben der *Nep*-Genexpression potentiell auch die NEP-Reifung oder -Degradation verändert sein könnte.

Briones und Darwish zeigten in ihrer Studie, dass die Neprilysin-Expression sowohl in der Kontroll- als auch in der Vitamin D-Gruppe der alten Ratten im Vergleich zu den jungen Ratten signifikant reduziert war. Eine Calcitriol-Supplementierung der alten Ratten führte hingegen zu einer signifikanten 15%igen Neprilysin-Proteinspiegelsteigerung (BRIONES, DARWISH, 2012). Die Tiere wiesen im Vergleich zu den alten Kontrollratten einen 32% höheren Calcitriol-Spiegel auf. Ausgehend von einem linearen Zusammenhang, würde sich rechnerisch pro Prozentpunkt Calcitriol-Steigerung die NEP-Aktivität um 0,45% erhöhen. Vergleichbar dazu führte in der vorliegenden Arbeit eine 23%ige 25(OH)D₃-Reduktion zu einer 6%igen NEP-Aktivitätsminderung, was einer 0,3%igen Neprilysin-Aktivitätsabnahme pro Prozentpunkt 25(OH)D₃-Reduktion entspräche.

Auch weitere Autoren beschrieben die von Briones und Darwish beobachtete altersabhängige Neprilysin-Reduktion (CACCAMO et al., 2005; IWATA et al., 2002; RUSSO et al., 2005). Iwata *et al.* fanden, dass die NEP-Aktivität gerade im Hippocampus von Mäusen mit zunehmendem Alter abnimmt. Entsprechend zeigten 132 Wochen alte Tiere eine 20%ige Reduktion im Vergleich zu 10 Wochen alten Wildtyp-Mäusen (IWATA et al., 2002). Russo *et al.* berichteten zusätzlich, dass auch im menschlichen Kortex die NEP-mRNS-Spiegel mit zunehmendem Alter abnehmen (RUSSO et al., 2005). Des Weiteren wurde in mehreren Studien eine *NEP*-Expressionsabnahme bei Alzheimer-Patienten beschrieben und dies vor allem in Hirnregionen, die besonders von der A β -Pathologie betroffen sind (AKIYAMA et al., 2001; RUSSO et al., 2005; WANG et al., 2003; WANG et al., 2005; YASOJIMA et al., 2001).

Da gerade alte Menschen und Alzheimer-Patienten häufig einen Vitamin D-Mangel aufweisen, könnte diese Defizienz eine weitere Reduktion der Neprilysin-Spiegel bedingen. Dies könnte das Gleichgewicht zwischen Produktion und Degradation (weiter) negativ beeinflussen und zu einer zunehmenden A β -Akkumulation führen. Somit erscheint erneut das Ausgleichen einer Vitamin D-Mangelsituation sinnvoll.

5.5.4. Eine Vitamin D-Supplementierung *in vitro* führt zu einer Steigerung der Neprilysin-Aktivität und -Expression

Passend zu den Daten aus dem *in vivo* Mausmodell kam es nach 25(OH)D₃-Langzeitsupplementierung *in vitro* zu einer signifikanten 9,4%igen Steigerung der Neprilysin-Aktivität. Zusätzlich zeigte sich eine signifikante Steigerung der *Nep*-Genexpression auf

187%, wobei hier lediglich ein tendenzieller, jedoch kein signifikanter Unterschied bestand ($p = 0,07$). Dennoch ist zu diskutieren, warum sich die deutliche Expressionssteigerung um ca. 90% nicht in der gesteigerten Neprilysin-Aktivität (ca. 9%) widerspiegelt? Diese Beobachtung lässt sich potentiell durch die Methode der Neprilysin-Aktivitätsbestimmung erklären: Durch Inkubation von *Zellhomogenaten* auf 96-Loch-Platten, welche zuvor mit Neprilysin-spezifischem Antikörper beschichtet wurden, wurde nur der Neprilysin-Anteil gebunden, welcher sich in der Zelle befand. Es ist jedoch bekannt, dass Neprilysin nach extrazellulär sezerniert werden kann, wo es ebenfalls A β degradiert (YAMAMOTO et al., 2017). Dieser Anteil konnte durch die in dieser Arbeit verwendete Methode nicht detektiert werden. Folglich gibt die *Nep*-Genexpression einen Hinweis auf die Änderung der Neprilysin-Gesamtmenge, während die Aktivitätsbestimmung lediglich eine Aussage über den zellulären und metabolisch aktiven Neprilysin-Anteil zulässt. Eine endgültige Aussage über den Einfluss von Neprilysin auf die beobachtete A β -Gesamtdegradationsänderung ist daher nicht möglich und sollte in weiteren Studien untersucht werden.

Bereits ältere Studien zeigen, dass die Neprilysin-Expression und -Aktivität Vitamin D-abhängig reguliert werden kann (BENAYAHU et al., 1995; HOWELL et al., 1993; INDIG et al., 1990). Eine *in vitro* Stimulation von Zellen mit physiologischen Calcitriol-Konzentrationen (1-10 nM) über einen Zeitraum von 24-72 h führte in den Studien zu einer signifikanten Steigerung der NEP-Expression und -Aktivität. In allen Untersuchungen wurden jedoch ausschließlich (humane) osteoblastäre und bindegewebige (fibroblastäre, endotheliale, fibroendotheliale) Zelllinien verwendet. Dementsprechend verdeutlicht die hier vorliegende Arbeit, dass Vitamin D nicht nur in diesen Zelllinien, sondern auch in *neuronalen* Zellen Einfluss auf die Neprilysin-Expression hat. Zusätzlich zeigen die Ergebnisse, dass ein Vitamin D-Mangel, im Gegensatz zur Vitamin D-Supplementierung, zu einer reduzierten NEP-Expression und -Aktivität führt (s. Kap. 5.5.3.). Bemerkenswerterweise berichteten Howell *et al.*, dass die Neprilysin-Expression in osteoblastären Zellen dosisabhängig (0,01-1 μ M) anstieg (HOWELL et al., 1993). Dies lässt vermuten, dass die NEP-Expression und -Aktivität auch mit zunehmendem Vitamin D-Mangel kontinuierlich abnehmen könnte. Diese Hypothese muss jedoch in weiteren Studien untersucht werden.

5.5.5. Ein Vitamin D-Mangel *in vivo* führt zu keiner signifikanten Veränderung der IDE-Aktivität und -Expression

Das Insulin-degradierende Enzym (IDE) spielt neben Neprilysin ebenfalls eine wichtige Rolle bei der A β -Degradation. Dies wird u.a. durch Studien von Farris *et al.* und Miller *et al.*

gestützt, welche zeigten, dass ein IDE-Knockout im Mausmodell zu einer signifikanten > 50%igen Reduktion der A β -Degradation und folglich zu einem 1,6- bzw. 1,4-fachen Anstieg der A β ₄₀ bzw. A β ₄₂-Spiegel führte (FARRIS et al., 2003; MILLER et al., 2003). Zusätzlich wurde IDE im menschlichen Liquor nachgewiesen, was seine *in vivo* Relevanz unterstreicht (QIU et al., 1998).

In Kapitel 4.3.4. wurde die IDE-Aktivität in den Gehirnen der Vitamin D-defizienten Tiere untersucht. Es zeigte sich keine signifikante Veränderung der Aktivität im Vergleich zu den Kontrolltieren. Auch die *Ide*-Genexpression war unter leichten Vitamin D-Mangelbedingungen nicht signifikant verändert (s. Kap. 4.3.5.). Die IDE-Aktivität wurde aus Gehirnhomogenaten der Versuchstiere untersucht. Es wurde daher ein IDE-Summensignal gemessen, da nach dem Aufschluss nicht zwischen den einzelnen Zellkompartimenten unterschieden werden konnte. Folglich ist eine mögliche IDE-Umverteilung unter Vitamin D-Mangelbedingungen sowie eine Sezernierung nach extrazellulär nicht beurteilbar. Dies soll in Kapitel 5.5.6. genauer diskutiert werden.

5.5.6. Eine Vitamin D-Supplementierung *in vitro* führt zu einer Erhöhung der IDE-Proteinspiegel ohne signifikante Beeinflussung der Genexpression

Nach 25(OH)D₃-Lanzeitsupplementierung *in vitro* kam es zu einer signifikanten IDE-Proteinspiegelerhöhung um rund 14% ($p = 0,009^{**}$), während die *Ide*-Expression nicht signifikant verändert war (105%; $p = 0,57$). Es bestand jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen der beobachteten Proteinspiegelerhöhung und der Expressionssteigerung ($p = 0,25$ n.s.) (s. Kap. 4.4.5.5.), sodass eine Beteiligung der Expressionsänderung an den IDE-Proteinspiegelerhöhungen nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann. Es lässt sich vermuten, dass die erhöhten IDE-Proteinspiegel auf eine mögliche Stabilisierung oder einen veränderten intrazellulären Transport des Proteins nach Vitamin D-Supplementierung zurückzuführen sein könnten. Dies muss jedoch in weiteren Studien untersucht werden.

Da eine *Ide*-Expressionssteigerung nicht ausgeschlossen werden kann, könnten die veränderten IDE-Proteinspiegel *in vitro* eventuell durch eine Vitamin D-abhängige Beeinflussung der Notch-Signalproteine HES-1 und Hey-1 erklärt werden. Leal *et al.* berichteten, dass diese Proteine an den *IDE*-Promotor binden und dessen Transkription und Aktivität unterdrücken (LEAL et al., 2012). Interessanterweise beschrieben Matsue *et al.* eine Suppression des Signalmoleküls HES-1 durch Calcitriol (MATSUE et al., 1997). Es ist bekannt, dass die zerebrale IDE-Expression und/oder Aktivität bei Patienten mit sporadischer Alzheimer-Form erniedrigt ist (CACCAMO et al., 2005; COOK et al., 2003; LEAL et al.,

2012), wohingegen Notch1 überexprimiert wird (BEREZOVSKA et al., 1998). Folglich könnte eine Vitamin D-Supplementierung gerade bei diesen Patienten positiven Einfluss auf die IDE-Spiegel und somit auf den A β -Abbau haben.

Hervorzuheben ist, dass der Versuchsaufbau beider Untersuchungen (*in vivo* und *in vitro*) keine endgültige Beurteilung einer Beteiligung des Vitamin D-Stoffwechsels an der IDE-abhängigen A β -Degradation zulässt:

Die höchste IDE-Aktivität wird vorwiegend im Zytosol der Zelle gefunden, während diese auch in anderen subzellulären Kompartimenten, wie der Plasmamembran, den Endosomen oder den Peroxisomen nachgewiesen werden kann (DUCKWORTH et al., 1998). Des Weiteren konnten u.a. Qui *et al.* zeigen, dass IDE von Mikrogliazellen und Neuronen nach extrazellulär sezerniert wird (QIU et al., 1998; QIU et al., 1997). Da A β ebenfalls nach extrazellulär abgegeben wird, kommen vor allem den membrangebunden und nach extrazellulär sezernierten IDE-Isoformen eine Hauptfunktion in der A β -Degradation zu (BULLOJ et al., 2008; VEKRELLIS et al., 2000), wobei die Letzteren durch unseren Versuchsaufbau nicht detektiert werden konnten.

Auch die signifikante IDE-Proteinspiegelerhöhung nach Vitamin D-Supplementierung ist kritisch zu betrachten, da aufgrund der Western-Blot-Analyse aus Zelllysaten nur das zellulär lokalisierte IDE beurteilt werden konnte. Daher könnte die beobachtete Steigerung zum einen, wie oben bereits erwähnt, Ausdruck einer IDE-Stabilisierung oder zum anderen einer verminderten Protein-Sezernierung sein, was zu einer zellulären Akkumulation führen würde. In diesem Fall stände weniger extrazelluläres IDE für eine Beteiligung an der A β -Degradation zur Verfügung. Jedoch scheint auch intrazelluläres IDE u.a. bei der mitochondrialen A β -Degradation eine Rolle zu spielen (LEAL et al., 2013; LEISSRING et al., 2004). Folglich sollten auch hier Studien folgen, die diese Fragen genauer untersuchen.

Abschließend zur veränderten A β -Degradation unter Vitamin D-Mangelbedingungen bzw. nach 25(OH)D₃-Langzeitinkubation bleibt der Einfluss von weiteren A β -degradierenden Enzymen zu diskutieren. Neben den oben beschriebenen, als dominant geltenden A β -Degradationsenzymen Neprilysin und IDE, werden auch ECE-1 und -2, ACE, Cathepsin B, MMP-2 und -9 sowie Plasminogen ebenfalls A β -degradierende Eigenschaften zugeschrieben. Die Ergebnisse eines potentiellen Einflusses dieser Enzyme bei veränderten Vitamin D-Spiegeln auf die A β -Degradation *in vivo* und *in vitro* soll in den folgenden Kapiteln zusammenfassend diskutiert werden.

5.5.7. Ein Vitamin D-Mangel *in vivo* führt zu einer tendenziellen Reduktion der ECE-1- und ECE-2-Expression. Eine Supplementierung *in vitro* führt zu einer tendenziellen Steigerung

Neben Neprilysin und IDE konnte auch für die Endothelin konvertierenden Enzyme (*engl.: endothelin-converting enzymes*), ECE-1 und -2, ein Einfluss auf die A β -Degradation *in vivo* nachgewiesen werden (ECKMAN et al., 2006; ECKMAN et al., 2003). ECE-1 ist die dominante Form im Gehirn (MINERS et al., 2008a) und weist selbst vier verschiedene Isoformen auf (ECE-1a, 1b, 1c und 1d). Während ECE-1a und -1c vorwiegend an der Zelloberfläche exprimiert werden, befinden sich ECE-1b und -1d, wie auch ECE-2, hauptsächlich intrazellulär (MULLER et al., 2003; PACHECO-QUINTO, ECKMAN, 2013; SCHWEIZER et al., 1997). Entsprechend zeigten Pacheco-Quinto und Eckman, dass ECE-1 und ECE-2, aufgrund ihrer zellulären Lokalisation, Einfluss auf unterschiedliche A β -Ablagerungen (intra-, extrazellulär) haben (PACHECO-QUINTO, ECKMAN, 2013).

In der vorliegenden Arbeit fanden sich in den Vitamin D-defizienten Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren eine nicht signifikante *Ece-1*- (80%) und *Ece-2*-Expressionsreduktion (93%), während die Gesamt-*Ece*-Expression tendenziell reduziert war (87%; $p = 0,18$) (s. Kap. 4.3.5.). *In vitro* führte die 25(OH)D₃-Langzeitsupplementierung zu einer leichten, tendenziellen *Ece-1*- (105%), *Ece-2*- (102%) und *Ece*-Gesamtexpressionsänderung (103%). Mehrere Studien zeigen, dass die *ECE*-Expression, wie auch die zelluläre Lokalisation durch Proteinkinasen beeinflusst werden kann (KURUPPU, SMITH, 2012; ORZECOWSKI et al., 1998; ORZECOWSKI et al., 2001; UCHIDA et al., 1997). Uchida *et al.* berichteten beispielsweise, dass eine Stimulation der Proteinkinase C (PKC) zu einer signifikanten Steigerung der ECE-1 und -2-mRNS- und -Proteinspiegel führte (UCHIDA et al., 1997). Zusätzlich beschrieben weitere Autoren eine signifikante ECE-Enzymaktivitätssteigerung an der Zelloberfläche und im Zellmedium nach Phosphorylierung des Enzyms durch die PKC (KURUPPU et al., 2010; SMITH et al., 2006). Vitamin D ist in der Lage über schnelle, nicht VDR-vermittelten Signalwege verschiedene Proteinkinase-abhängige Signalwege zu beeinflussen (CENTENO et al., 2011; FLEET, 2004; TUNSOPHON, NEMERE, 2010). *In vitro* und *in vivo* konnte gezeigt werden, dass eine Calcitriol-Supplementierung u.a. zu einer Aktivierung des PKC-Signalwegs führt (CENTENO et al., 2011; ZANATTA et al., 2011a; ZANATTA et al., 2011b).

Entsprechend könnten die hier beschriebenen tendenziellen *Ece*-Expressionsänderungen *in vivo* und *in vitro* Ausdruck einer verminderten bzw. verstärkten PKC-Aktivierung sein. Auch weitere beschriebene Faktoren, wie eine TNF α -abhängige *ECE-2*-Expressionsbeeinflussung,

könnten hier eine zusätzliche Rolle spielen (CULPAN et al., 2011), gerade unter Beachtung der hier beschriebene ADAM17/TACE-Proteinspiegelerhöhung (s. Kap. 4.2.2.2.). Jedoch wurde eine mögliche Vitamin D-abhängige, Proteinkinase-vermittelte zelluläre ECE-Lokalisationsänderung nicht untersucht. Entsprechend könnte die ECE-Lokalisation an der Zelloberfläche und im Zellmedium durch Vitamin D geändert werden, was zu einer veränderten extrazellulären A β -Degradation führen könnte. Diese Hypothese muss jedoch genauer untersucht werden.

5.5.8. Ein Vitamin D-Mangel *in vivo* führt zu einer tendenziellen Reduktion der ACE-Expression. Eine Supplementierung *in vitro* führt zu einer signifikanten Steigerung

Das Angiotensin-konvertierende Enzym (ACE) ist ein integrales Membranprotein mit einem extrazellulär lokalisierten katalytischen Zentrum. Eines der ACE-Hauptfunktionen ist die Regulation des Blutdrucks durch die Umwandlung von Angiotensin I in Angiotensin II (COATES, 2003). *In vitro* ist ACE in der Lage A β ₄₀ proteolytisch zu spalten und A β ₄₂ in die weniger toxische A β ₄₀-Spezies umzuwandeln (HU et al., 2001; ZOU et al., 2007). Die Funktionsweise von ACE als A β -degradierende Protease wird jedoch kontrovers diskutiert (FERRINGTON et al., 2011; FERRINGTON et al., 2012; HEMMING et al., 2007). Hemming *et al.* fanden keinen Einfluss von Captopril, einem potenten ACE-Inhibitor, der sowohl die menschliche, als auch die Blut-Hirnschranke von Nagern passieren kann (BROWN, VAUGHAN, 1998), auf die löslichen und unlöslichen A β -Spiegel sowie Plaque-Ablagerungen im Gehirn dreifach transgener Mäuse (PS1_{M146V}, APP_{Swe}, tauP301L) (HEMMING et al., 2007).

In der vorliegenden Untersuchung kam es in den Gehirnen der Vitamin D-defizienten Mäuse zu einer tendenziellen, jedoch nicht signifikanten, 83%igen Reduktion ($p = 0,12$ n.s.) der zerebralen *Ace*-Expression (s. Kap. 4.3.5.). Umgekehrt führte die Vitamin D-Langzeit-supplementierung *in vitro* zu einer signifikanten 156%igen Steigerung der *Ace*-Expression (s. Kap. 4.4.5.6.). Folglich lässt sich vermuten, dass die ACE-Expression Vitamin D-abhängig reguliert sein könnte.

In diesem Kontext zeigten Hagiwara *et al.*, dass eine Vitamin D-, 25(OH)D₃- oder 1,25(OH)D₃-Supplementierung von kultivierten Endothelzellen zu einer dosisabhängigen Verringerung der ACE-Aktivität führte. Diese Aktivitätsreduktion wurde auf eine geringere ACE-Gesamtmenge zurückgeführt (HAGIWARA et al., 1988). Somit erscheint eine Supplementierung von *endothelialen* Zellen, im Gegensatz zu den hier dargestellten Ergebnissen, zu einer Reduktion der ACE-Expression zu führen, was einen möglichen

Zelltyp-abhängigen Effekt nahelegt. Bemerkenswerterweise verwendeten Hagiwara *et al.*, im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit, nicht-physiologische Vitamin D-Konzentrationen (33 μM), was Rückschlüsse auf die *in vivo* Relevanz erschwert. Daher sollte die Vitamin D-abhängige Regulation der ACE-Expression und -Aktivität in weiteren Studien, unter Berücksichtigung möglicher gewebespezifischer Unterschiede, weiter untersucht werden.

5.5.9. Ein Vitamin D-Mangel *in vivo* führt zu einer tendenziellen Steigerung der Cathepsin B-Expression. Eine Supplementierung *in vitro* führt zu einer signifikanten Steigerung

Cathepsin B (CatB) spielt bei zahlreichen Krankheiten, wie beispielsweise Krebs und Metastasierung, inflammatorischen Lungenerkrankungen oder rheumatoiden Erkrankungen eine Rolle (REISER *et al.*, 2010). Zusätzlich scheint CatB einen Einfluss auf die Alzheimer-Pathologie zu haben. Jedoch ist die bisherige Studienlage inhomogen. Mueller-Steiner *et al.* zeigten, dass CatB zu einer A β -Reduktion, insbesondere von A β_{42} , führt. *In vivo* führte eine CatB-Defizienz entsprechend zu einer A β_{42} -Akkumulation und zu einer verstärkten Plaque-Bildung (MUELLER-STEINER *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu zeigten die Ergebnisse anderer Autoren eher pro-amyloidogene Eigenschaften. Das lysosomale Enzym wird als mögliche β -Sekretase diskutiert und entsprechend führte eine CatB-Inhibition sowie -Knockout *in vivo* zur Reduktion der zerebralen A β -Spiegel und zu einer verbesserten Gedächtnisleistung (HOOK *et al.*, 2012).

Wie in Kapitel 4.3.5. dargestellt, war die *CatB*-Expression unter Vitamin D-Mangelbedingungen *in vivo* tendenziell gesteigert (129%, $p = 0,17$). Auch die Vitamin D-Supplementierung *in vitro* führte zu einer *CatB*-Expressionssteigerung (129%), wobei hier ein signifikantes Niveau erreicht wurde ($p = 0,005^{**}$) (vgl. Kap. 4.4.5.6.).

Ältere *in vitro* und *in vivo* Studien belegen eine mögliche Regulation der *CatB*-Expression und -Aktivität durch Vitamin D. Simboli-Campbell *et al.* sowie Mathiasen *et al.* inkubierten MCF-7 Brustkrebszellen mit Calcitriol und fanden eine zeit- und dosisabhängige *CatB*-Expressions- und -Proteinspiegelsteigerung (MATHIASSEN *et al.*, 2001; SIMBOLI-CAMPBELL *et al.*, 1996; SIMBOLI-CAMPBELL *et al.*, 1997). Ähnliche Ergebnisse wurden nach Calcitriol-Supplementierung von humanen promyelozytären Leukämiezellen (HL-60) beschrieben. Bemerkenswerterweise kam es dabei im Vergleich zu den anderen untersuchten Substanzen zu einem verzögerten Wirkungseintritt, was eine mögliche indirekte Regulation der *CatB*-Expression durch Vitamin D vermuten lässt (BERQUIN *et al.*, 1999). Diese Beobachtung unterstützt zusätzlich die in Kapitel 5.5.2. diskutierte zeitabhängige Änderung

der A β -Gesamtdegradation *in vitro*. Passend zu diesen Ergebnissen beobachteten Nemere *et al.* *in vivo* eine CatB-Aktivitätssteigerung von duodenalen Zellen Vitamin D-defizienter Hühner nach Calcitriol- Injektion (NEMERE, NORMAN, 1987). Zu beachten gilt jedoch, dass alle *in vitro* Untersuchungen mit supraphysiologischen Calcitriol-Konzentrationen (zwischen 10-100 nM) durchgeführt wurden.

Zusammenfassend unterstützen diese Studien die in dieser Arbeit nachgewiesene 25(OH)D₃-abhängige Expressionssteigerung *in vitro*. Zwei wichtige Unterschiede sind jedoch, dass die hier dargelegten Daten eine Vitamin D-abhängige CatB-Regulation im *neuronalen* Gewebe zeigen und dies bei *physiologischen Konzentrationen*. Die gleichzeitige tendenzielle Expressionserhöhung bei einer Hypovitaminose D *in vivo* steht jedoch im Gegensatz zu diesen Ergebnissen. Eine mögliche Erklärung stellen sekundäre, Vitamin D-Mangel bedingte Veränderungen, wie beispielsweise eine gesteigerte Neuroinflammation dar (s. Kap. 5.4.), da die *CatB*-Expression u.a. durch pro- und anti-inflammatorische Zytokine reguliert werden kann (ALVAREZ *et al.*, 2002; DOI *et al.*, 2008). Es müssen jedoch weitere Studien folgen, um einerseits die Rolle von CatB bei der Alzheimer-Krankheit abschließend zu klären und andererseits ein *in vivo* Relevanz der Daten genauer zu untersuchen.

5.5.10. Ein Vitamin D-Mangel *in vivo* führt zu einer tendenziellen Steigerung der MMP-2 und MMP-9-Expression. Eine Supplementierung *in vitro* führt zu einer signifikanten Steigerung

Die Matrix-Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 werden, im Vergleich zu den anderen MMP-Familienmitgliedern, am stärksten im Gehirn exprimiert. Dort werden sie von Neuronen und Astrozyten über einen Golgi-abhängigen Transportweg nach extrazellulär sezerniert und sind in der Lage A β zu degradieren (BACKSTROM *et al.*, 1996; ROHER *et al.*, 1994; SBAI *et al.*, 2008; SBAI *et al.*, 2010; YIN *et al.*, 2006). A β selbst ist ein potenter Stimulator der *MMP-2*- und *MMP-9*-Expression (DEB, GOTTSCHALL, 1996). Zusätzlich kann die Expression durch verschiedene inflammatorische Zytokine, wie beispielsweise TNF α , induziert werden (BEN-HUR *et al.*, 2006; MUIR *et al.*, 2002; PAGENSTECHER *et al.*, 1998). Die *MMP*-Expressionsregulation läuft dabei über den MAP-Kinase (MAPK)- (*engl.: mitogen-activated protein*) und den NF- κ B-Signalweg (CLARK *et al.*, 2008; HE, 1996; VINCENTI, BRINCKERHOFF, 2007). Interessanterweise hat Vitamin D ebenfalls Einfluss auf beide Signalwege (FLEET, 2004; SUN *et al.*, 2006; WU *et al.*, 2010a; WU *et al.*, 2010b), was eine mögliche *MMP*-Expressionsregulation durch den Vitamin D-Metabolismus vermuten lässt.

In der vorliegenden Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die *Mmp-2*-Expression im Gehirn der Vitamin D-defizienten Mäuse im Vergleich zu den Kontrolltieren tendenziell gesteigert war (169%; $p = 0,16$), während die MMP-9-mRNS-Spiegel keine Veränderung aufwiesen (103%; $p = 0,89$) (s. Kap. 4.3.5.). Die Gesamt-*Mmp*-Expressionsänderung war, entsprechend der *Mmp-2*-Expressionsteigerung, ebenfalls tendenziell erhöht (136%; $p = 0,39$). Nach 25(OH)D₃-Langzeitsupplementierung *in vitro* zeigte sich hingegen eine tendenzielle Steigerung beider Metalloproteasen (*Mmp-2*: 133%; $p = 0,16$; *Mmp-9*: 141% $p = 0,15$). Die Gesamt-*Mmp*-Expression war signifikant gesteigert (137%; $p = 0,01^*$). Entsprechend der vermuteten Vitamin-D-abhängigen Expressionsregulation und den hier dargelegten Daten, konnten bereits zahlreiche Studien den Einfluss von Calcitriol auf die MMP-2 und -9-Expression *in vitro* und *in vivo* nachweisen. Die meisten Studien verwendeten Tumorzelllinien, da den MMPs u.a. eine wichtige Rolle bei der Tumordinvasion und Metastasierung zugeschrieben wird (HADLER-OLSEN et al., 2013; MOOK et al., 2004). Koli *et al.* beschrieben eine signifikante MMP-9-Aktivitätsreduktion nach Calcitriol-Inkubation von MDA-MB-231 Brustkrebszellen (KOLI, KESKI-OJA, 2000). Ähnliches wurde von Bao *et al.* nach Inkubation einer Prostatakrebszelllinie beobachtet (BAO et al., 2006). Halder *et al.* konnten zusätzlich eine Calcitriol-abhängige Reduktion der MMP-2-Expression und -Proteinspiegel in Leiomyomzellen nachweisen (HALDER et al., 2013). *In vivo* Untersuchungen fanden unterstützend einen signifikanten MMP-2 und -9-Aktivitätsanstieg in der Lunge und im Herzen von VDR-knockout Mäusen, was die Autoren auf eine mögliche NF- κ B Aktivierung zurückführten (RAHMAN et al., 2007; SUNDAR et al., 2011).

Untersuchungen anderer Autoren ergaben hingegen gegensätzliche Ergebnisse. Demnach führte eine Calcitriol-Inkubation osteoblastärer bzw. endothelialer Zelllinien zu einer signifikanten MMP-2-Aktivitätssteigerung, während es in den endothelialen Zellen nach VDR-Inhibition zu einer reduzierten Aktivität kam (GRUNDMANN et al., 2012; LUO, LIAO, 2003). In einer neueren Studie beobachteten Won *et al.* zusätzlich eine MMP-9-Expressionssteigerung nach Calcitriol-Inkubation von zerebralen endothelialen Zellen (WON et al., 2015).

Folglich könnte die Vitamin-D-abhängige MMP-Expressionsregulation zelltyp-abhängig sein. Bei Interpretation der Studien muss zusätzlich beachtet werden, dass Tumorzellen im Vergleich zum entsprechenden nicht-tumorösen Gewebe eine verstärkte MMP-Expression aufweisen (HADLER-OLSEN et al., 2013), sodass eine Vitamin D-Supplementierung bei diesen Zellen unterschiedlichen Einfluss haben könnte. Da bisher keine Studien existieren, die

Einblick in die neuronale, Vitamin D-abhängige *MMP*-Expressionsregulation geben, sollten die vorliegenden *in vitro* Daten durch weitere Untersuchungen verifiziert werden.

Die tendenzielle *MMP-2*-Expressionssteigerung unter Vitamin D-Mangelbedingungen steht auf den ersten Blick im Widerspruch zu den *in vitro* Ergebnissen, lässt sich jedoch möglicherweise auf die in Kapitel 4.1.3. nachgewiesene A β -Erhöhung zurückführen. Auch eine Expressionssteigerung durch erhöhte TNF α -Spiegel ist denkbar (s. Kap. 4.2.2.2.). Dahingegen war die *MMP-9*-Expression unverändert, obwohl diese, wie oben beschrieben, ebenfalls durch A β und gesteigerte Inflammation induziert werden kann. Eine potentielle Erklärung wäre, dass bereits geringere Veränderungen, wie sie in dieser Arbeit gefunden wurden, zu einer Induktion der *MMP-2*-Expression führen, während die *MMP-9*-Expression erst durch höhere A β - und Zytokin-Spiegel stimuliert wird.

5.5.11. Eine Vitamin D-Supplementierung *in vitro* führt zu einer signifikanten Steigerung der Plasminogen-Expression

Plasminogen ist die inaktive Vorstufe der thrombolytischen Serinprotease Plasmin. Plasminogen kann durch die *Urokinase* (engl.: *urokinase-type plasminogen activator, uPA*) und durch den *gewebespezifischen Plasminogenaktivator* (engl.: *tissue plasminogen activator, t-PA*) aktiviert werden. Die Aktivität dieser Enzyme kann wiederum durch verschiedene Mitglieder der Serinprotease-Inhibitor-Familie (Serp) gehemmt werden. Zu diesen gehören u.a. der *Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1* (PAI-1) und *Neuroserpin* (NS). Alle Mitglieder des Plasmin-Systems werden im Gehirn exprimiert.

Plasmin ist sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* in der Lage A β zu degradieren (JACOBSEN et al., 2008; LEDESMA et al., 2000). Insbesondere kann es extrazelluläres, phosphoryliertes A β abbauen. Es wird diskutiert, dass dieses eine Tendenz aufweist toxische Oligomere und Fibrillen zu bilden. Die IDE- und ACE-abhängige A β -Degradation hingegen wird durch die Phosphorylierung inhibiert, sodass Plasmin womöglich hier eine besondere Rolle zukommt (KUMAR et al., 2011; KUMAR et al., 2012).

In dieser Arbeit wurde ausschließlich die Plasminogen-Expression nach Vitamin D-Langzeitsupplementierung *in vitro* dargestellt (s. Kap. 4.4.5.6.). Es kam zu einer signifikanten Expressionssteigerung in den N2a-Zellen um ca. 70% ($p = 0,009^{**}$). *In vivo* konnte die Bestimmung aufgrund von fehlendem Probenmaterial nicht reproduziert werden, sodass eine abschließende Beurteilung hier nur eingeschränkt möglich ist.

Der Einfluss des Vitamin D-Metabolismus auf das Plasmin-System wurde in der Literatur vorwiegend bei verschiedenen Tumorerkrankungen untersucht. Koli *et al.* zeigten, dass eine

Behandlung von Brustkrebszellen mit Calcitriol zu einer dosisabhängigen, verminderten Sekretion an uPA und tPA führte. Zusätzlich kam es zu einer PAI-1-Erhöhung, was letztlich in einer 60%igen Plasmin-Aktivitätsreduktion resultierte (KOLI, KESKI-OJA, 2000). Bereits in einer früheren Studie beschrieben Koli *et al.* eine Vitamin D-abhängige Reduktion der Plasminogen-Aktivator (PA)-Aktivität in Keratinozyten und Fibroblasten (KOLI, KESKI-OJA, 1996). Bao *et al.* fanden hingegen keine signifikante Änderung der PA-Aktivität in Prostatakrebszellen nach 1,25(OH)₂D₃-Inkubation (BAO *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu diesen Studien beobachteten Merchiers *et al.* in Osteosarkomzellen eine Calcitriol-abhängige Stimulation der tPA-Genexpression, wobei bereits 1 nM 1,25(OH)₂D₃ zu einer dreifachen Expressionssteigerung führte. In diesem Zusammenhang zeigten die Autoren, dass der humane tPA-Enhancer zwei VDRE enthält (MERCHIERIS *et al.*, 1999). Auch bei Hamilton *et al.* kam es nach Calcitriol-Inkubation von osteoblastären Zellen zu einer signifikanten PA-Aktivitätssteigerung (HAMILTON *et al.*, 1985). Lu *et al.* beschrieben zusätzlich eine Calcitriol-abhängige uPA-Aktivitätssteigerung an der Zelloberfläche von monozytären Zellen, während es zu keiner PAI-Beeinflussung kam (LU *et al.*, 1988).

Zusammengefasst ist somit die Studienlage bezüglich der Vitamin D-abhängigen Regulation des Plasmin-Systems sehr heterogen, was vermutlich auf die jeweils verwendeten Zelllinien zurückzuführen sein könnte. Gerade bei verschiedenen Krebserkrankungen kommt es zu einer Dysregulation des Plasmin-Systems, was zu einer Beeinflussung des Tumorwachstums, der Tumordinvasion und Metastasierung führt (KWAAN, MCMAHON, 2009). Entsprechend zeigte beispielsweise die von Koli *et al.* verwendete Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 eine besonders starke uPA-, uPA-Rezeptor- und PAI-1-Expression (HOLST-HANSEN *et al.*, 1996; KOLI, KESKI-OJA, 2000), sodass Calcitriol hier womöglich zur Wiederherstellung des Gleichgewichts zwischen verschiedenen Plasmin-System-Mitgliedern beiträgt. Bemerkenswerterweise wurde auch im Gehirn von Alzheimer-Patienten eine Dysregulation des Plasmin-Systems beschrieben (BARKER *et al.*, 2010). Ledesma *et al.* beobachteten beispielsweise eine signifikante Plasmin-Aktivitätsreduktion im Gehirn von Alzheimer-Patienten (LEDESMA *et al.*, 2000). Fabbro und Seeds zeigten zusätzlich eine signifikante tPA-Aktivitätsreduktion im frontalen Kortex von Alzheimer-Patienten, aufgrund erhöhter Neuroserpin-Spiegel (FABBRO, SEEDS, 2009). Auch erhöhte PAI-1 Proteinspiegel wurden in diesem Kontext nachgewiesen (LIU *et al.*, 2011). Folglich würden alle diese Veränderungen zu einer Reduktion der Plasmin-Aktivität führen, sodass eine Vitamin D-Supplementierung mit konsekutiver Plasminogen-Expressionssteigerung (vgl. oben) auch hier zu einem Wiederherstellen des Gleichgewichts beitragen könnte. Eine

positive Beeinflussung des Verhältnisses zwischen zerebralen Plasminogenaktivatoren und Plasminogenaktivatorinhibitoren ist in Bezug auf die oben dargelegte Literatur ebenfalls denkbar. Interessanterweise sind uPA und Plasmin in der Lage pro-MMP-9 zu MMP-9 zu aktivieren (BARAMOVA et al., 1997; DECLERCK, LAUG, 1996; MURPHY et al., 1992). Dies alles könnte in Zusammenschau zu einer Reduktion der A β -Last führen (FABBRO et al., 2011; JACOBSEN et al., 2008; LIU et al., 2011), was jedoch in weiteren Studien untersucht werden muss.

5.6. Ausblick

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Vitamin D das Gleichgewicht zwischen A β -Anabolismus und -Katabolismus beeinflussen kann und folglich auf die A β -Pathologie wirkt. Die möglichen zugrunde liegenden Mechanismen wurden hier systematisch dargestellt. Jedoch zeigten sich gerade im *in vivo* Modell zum Teil nur tendenzielle Veränderungen, welche kein signifikantes Niveau erreichten. Dies mag zum einen auf die biologische Varianz und bessere Kompensationsmechanismen *in vivo*, zum anderen jedoch auch auf die eingeschränkte Anzahl der zu Verfügung gestandenen Tiere zurückzuführen sein. Des Weiteren waren die beobachteten Effekte im *in vivo* Modell nur sehr gering ausgeprägt. Entsprechend sollten weitere Studien mit einer höheren Stichprobenanzahl und unterschiedlich ausgeprägtem Vitamin D-Mangel folgen. Hieraus könnten dann weitere Informationen über die in der Diskussion vermuteten Sachverhalte geliefert werden. Zusätzlich könnte eine Aussage darüber getroffen werden, ob bei einer zunehmenden Defizienz die beschriebenen Veränderungen ebenfalls progredient sind. In diesem Zusammenhang sollte auch untersucht werden, inwiefern sich der „Gehirn-eigene“ Vitamin D-Metabolismus unter diesen Bedingungen verändert. Interessanterweise zeigten Dursun *et al.* in einer aktuellen Studie, dass der VDR eine Ko-Lokalisation mit Proteinen der APP-Prozessierung aufweist (APP, ADAM10, Nicastrin). Änderungen der VDR-Expression, welche selbst durch Vitamin D reguliert wird, könnten direkten Einfluss auf die nicht-amyloidogene und amyloidogene Prozessierung haben (DURSUN, GEZEN-AK, 2017). Zusätzlich sollten *in vivo* Untersuchungen die hier dargelegte Hypothese, basierend auf den Ergebnissen der *in vitro* Inkubation, überprüfen, ob eine Erhöhung der Serum 25(OH)D₃-Spiegel in einen *hochnormalen* Bereich ebenfalls einen positiven Einfluss auf die A β -Homöostase hat. Gerade hier muss jedoch die Gefahr einer Hypervitaminose D beachtet werden, welche durch eine verstärkte enterale Calcium-Absorption und Calcium-Resorption aus dem Knochen zur Hypercalciämie mit daraus resultierenden Symptomen wie Übelkeit, Erbrechen, qualitativen und quantitativen Bewusstseinsstörungen bis hin zum Tod führt. Daher scheint auch die Untersuchung von *Vitamin D-Analoga* in Bezug auf die Beeinflussung der A β -Homöostase interessant, da diese zum Teil geringere kalziämische Wirkungen aufweisen (MAZZAFERRO *et al.*, 2014). In diesem Zusammenhang konnten wir in einer aktuellen Studie zeigen, dass Vitamin D₃- und D₂-Analoga im Vergleich zu Calcidiol ähnliche, zum Teil stärkere Effekte auf den A β -Anabolismus und -Katabolismus aufweisen (GRIMM *et al.*, 2017). Diese Ergebnisse sollten weiter im *in vivo* Modell verifiziert werden, unter Beachtung der oben aufgeführten Nebenwirkungen, um die Relevanz zu unterstreichen.

Es ist bekannt, dass Vitamin D Inflammationsreaktionen beeinflussen kann (s. Kap. 2.6.), welche auch als pathologischer Aspekt der Alzheimer-Krankheit diskutiert werden. Es konnten erhöhte Spiegel an pro-inflammatorischen Zytokinen, wie IL-1 β , IL-6 und TNF α , in Alzheimer-Gehirnen nachgewiesen werden (DICKSON et al., 1993; WOOD et al., 1993). Im hier verwendeten *in vivo* Modell konnte unter moderaten Vitamin D-Mangelbedingungen ein erhöhter ADAM17/TACE-Proteinspiegel nachgewiesen werden, was in Kapitel 5.4. als Ausdruck einer erhöhten Inflammationsreaktion diskutiert wurde. Passend dazu zeigten wir in der bereits oben dargelegten aktuellen Studie, dass eine Inkubation von SH-SY5Y-Zellen mit (supra-)physiologischen Calcdiol-Konzentration zu einer tendenziellen Reduktion von IL-1 β führte (GRIMM et al., 2017). Es gilt weiter zu klären, ob in Analogie zur A β -Pathologie ein *hochnormaler* Vitamin D-Status *in vivo* stärker vor Inflammationsreaktionen schützt, als eine bereits normale, suffiziente Versorgung.

Ein wichtiges Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist, dass die A β -Degradation durch Vitamin D reguliert wird. Hier vor allem die dominanten A β -Degradationsenzyme Nephilysin und IDE. Weitere Degradationsenzyme wurden lediglich mittels Expressionsanalyse beurteilt, zeigten jedoch ebenfalls tendenzielle oder sogar signifikante Veränderungen in einer Vitamin D-Mangelsituation bzw. nach Vitamin D-Supplementierung. Diese Ergebnisse sollten durch Bestimmung der Proteinspiegel und/oder der Enzymaktivitäten in weiteren Studien verifiziert werden. Wie bereits in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben, scheint die A β -Degradation nicht nur durch eine Änderung der Expression und Proteinspiegel der A β -Degradationsenzyme beeinflusst zu werden, sondern auch durch deren zelluläre Lokalisation (intrazellulär – membrangebunden – extrazellulär). Wie beispielsweise in Kapitel 4.4.5.4. dargelegt, zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der beobachteten Nephilysin-Expression und -Aktivität nach Vitamin D-Inkubation. Dies deutet neben einer Vitamin D-abhängigen Beeinflussung der Expression auch auf eine Vitamin D-abhängige Lokalisationsänderung hin, wie in Kapitel 5.5.4. diskutiert. Da auch weitere A β -Degradationsenzyme, wie IDE oder ECE-1 und -2, durch eine zelluläre Lokalisationsänderung Einfluss auf unterschiedliche A β -Pools aufweisen, sollte eine mögliche Vitamin D-Abhängigkeit in weiteren Studien genauer untersucht werden.

Abbildung 34 fasst die hier dargelegten und diskutierten Ergebnisse noch einmal graphisch zusammen.

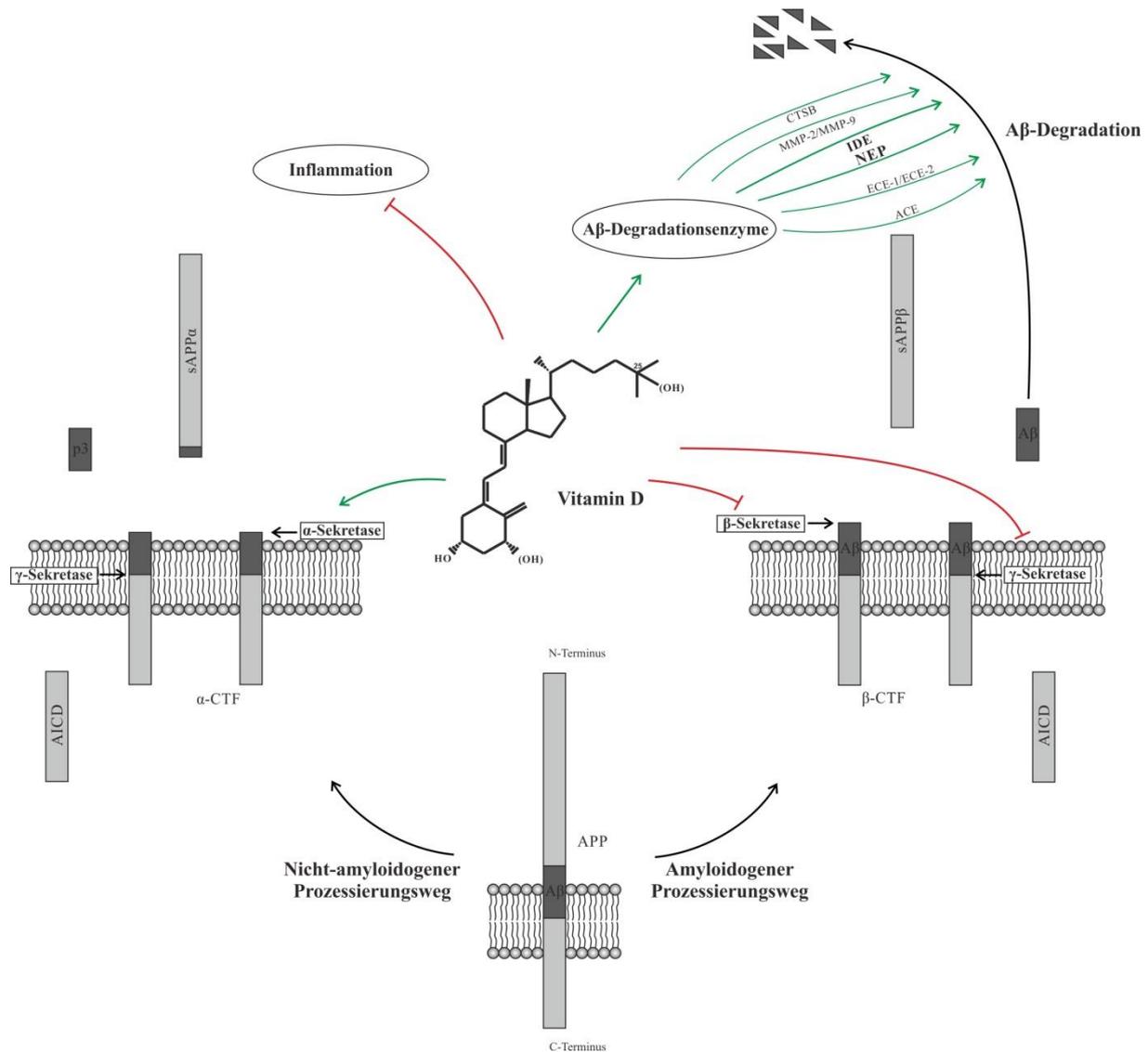


Abbildung 34 – Einfluss von Vitamin D auf die APP-Prozessierung und Aβ-Degradation (verändert nach GRIMM et. al, 2017)

Vitamin D beeinflusst das Gleichgewicht zwischen *amyloidogener* und *nicht-amyloidogener* Prozessierung – es reduziert die Aktivität der β- und γ-Sekretase und stimuliert gleichzeitig die α-Sekretase. Die Reduktion der **β-Sekretase**-Aktivität ist zum Teil auf einen *direkten Effekt* von Vitamin D zurückzuführen. Zusätzlich beeinflusst es die BACE1-Genexpression, -Proteinspiegel und vermutlich die -Proteinstabilität. Die **γ-Sekretase**-Aktivitätsreduktion ist bedingt durch eine verminderte Nicastrin-Expression. Die **α-Sekretase**-Aktivitätssteigerung ist potentiell auf eine Vitamin D-abhängige Beeinflussung der *ADAM10*- und *ADAM17*-Genexpression und/oder deren Proteinstabilität/-lokalisation zurückzuführen. Vitamin D hat zusätzlich Auswirkung auf den Aβ-Katabolismus durch die Expressionsregulation der **Aβ-Degradationsenzyme**. Als dominante Degradationsenzyme gelten Neprilysin und IDE. Gerade bei diesen könnte Vitamin D außerdem die zelluläre Lokalisation und somit die Aβ-Zugänglichkeit beeinflussen. Neben der Aβ-Homöostase beeinflusst Vitamin D auch **Inflammationsprozesse**. Hier könnte ADAM17/TACE eine wichtige Rolle spielen.

6. Literatur

1. (2016) Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, Demenzen.
2. Afzal S, Bojesen SE, Nordestgaard BG (2013) Reduced 25-hydroxyvitamin D and risk of Alzheimer's disease and vascular dementia. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*:1-7
3. Akiyama H, Kondo H, Ikeda K, Kato M, McGeer PL (2001) Immunohistochemical localization of neprilysin in the human cerebral cortex: inverse association with vulnerability to amyloid beta-protein (A β) deposition. *Brain research* 902:277-281
4. Althoff K, Reddy P, Voltz N, Rose-John S, Müllberg J (2000) Shedding of interleukin-6 receptor and tumor necrosis factor alpha. Contribution of the stalk sequence to the cleavage pattern of transmembrane proteins. *European journal of biochemistry / FEBS* 267:2624-2631
5. Alvarez-Díaz S, Larriba MJ, López-Otín C, Muñoz A (2010) Vitamin D: Proteases, protease inhibitors and cancer. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 9:32-37
6. Alvarez B, Quinn LS, Busquets S, Quiles MT, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM (2002) Tumor necrosis factor-alpha exerts interleukin-6-dependent and -independent effects on cultured skeletal muscle cells. *Biochimica et biophysica acta* 1542:66-72
7. Alvira-Botero X, Carro EM (2010) Clearance of amyloid- β peptide across the choroid plexus in Alzheimer's disease. *Current aging science* 3:219-229
8. Annweiler C, Schott aM, Allali G, Bridenbaugh Sa, Kressig RW, Allain P, Herrmann FR, Beauchet O (2010) Association of vitamin D deficiency with cognitive impairment in older women: cross-sectional study. *Neurology* 74:27-32
9. Anstey KJ, von Sanden C, Salim A, O'Kearney R (2007) Smoking as a risk factor for dementia and cognitive decline: a meta-analysis of prospective studies. *American journal of epidemiology* 166:367-378
10. Anstey KJ, Cherbuin N, Budge M, Young J (2011) Body mass index in midlife and late-life as a risk factor for dementia: a meta-analysis of prospective studies. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* 12:e426-437
11. Arbour NC, Prah J, DeLuca HF (1993) Stabilization of the vitamin D receptor in rat osteosarcoma cells through the action of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 7:1307-1312
12. Asai M, Hattori C, Szabó B, Sasagawa N, Maruyama K, Tanuma S-i, Ishiura S (2003) Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP alpha-secretase. *Biochemical and biophysical research communications* 301:231-235
13. Association As (2016) 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* 12:459-509
14. Backstrom JR, Lim GP, Cullen MJ, Tökés ZA (1996) Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) is synthesized in neurons of the human hippocampus and is capable of degrading the amyloid-beta peptide (1-40). *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16:7910-7919
15. Balabanova S, Richter HP, Antoniadis G, Homoki J, Kremmer N, Hanle J, Teller WM (1984) 25-Hydroxyvitamin D, 24, 25-dihydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D in human cerebrospinal fluid. *Klinische Wochenschrift* 62:1086-1090
16. Balion C, Griffith LE, Striffler L, Henderson M, Patterson C, Heckman G, Llewellyn DJ, Raina P (2012) Vitamin D, cognition, and dementia: a systematic review and meta-analysis. *Neurology* 79:1397-1405
17. Banerjee P, Chatterjee M (2003) Antiproliferative role of vitamin D and its analogs--a brief overview. *Molecular and cellular biochemistry* 253:247-254

18. Bao B-Y, Yeh S-D, Lee Y-F (2006) 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits prostate cancer cell invasion via modulation of selective proteases. *Carcinogenesis* 27:32-42
19. Baramova EN, Bajou K, Remacle A, L'Hoir C, Krell HW, Weidle UH, Noel A, Foidart JM (1997) Involvement of PA/plasmin system in the processing of pro-MMP-9 and in the second step of pro-MMP-2 activation. *FEBS letters* 405:157-162
20. Barão S, Gärtner A, Leyva-Díaz E, Demyanenko G, Munck S, Vanhoutvin T, Zhou L, Schachner M, López-Bendito G, Maness PF, De Strooper B (2015) Antagonistic Effects of BACE1 and A β 1-42 Secretase Control Axonal Guidance by Regulating Growth Cone Collapse. *Cell reports* 12:1367-1376
21. Barker R, Love S, Kehoe PG (2010) Plasminogen and plasmin in Alzheimer's disease. *Brain research* 1355:7-15
22. Bateman RJ, Munsell LY, Morris JC, Swarm R, Yarasheski KE, Holtzman DM (2006) Human amyloid-beta synthesis and clearance rates as measured in cerebrospinal fluid in vivo. *Nat Med* 12:856-861
23. Baumgart M, Snyder HM, Carrillo MC, Fazio S, Kim H, Johns H (2015) Summary of the evidence on modifiable risk factors for cognitive decline and dementia: A population-based perspective. *Alzheimer's & Dementia* 11:718-726
24. Beecham GW, Martin ER, Li YJ, Slifer MA, Gilbert JR, Haines JL, Pericak-Vance MA (2009) Genome-wide association study implicates a chromosome 12 risk locus for late-onset Alzheimer disease. *Am J Hum Genet* 84:35-43
25. Bekris LM, Yu C-E, Bird TD, Tsuang DW (2010) Genetics of Alzheimer disease. *Journal of geriatric psychiatry and neurology* 23:213-227
26. Bell NH, Epstein S, Greene A, Shary J, Oexmann MJ, Shaw S (1985) Evidence for alteration of the vitamin D-endocrine system in obese subjects. *J Clin Invest* 76:370-373
27. Belyaev ND, Nalivaeva NN, Makova NZ, Turner AJ (2009) Neprilysin gene expression requires binding of the amyloid precursor protein intracellular domain to its promoter: implications for Alzheimer disease. *EMBO Rep* 10:94-100
28. Belyaev ND, Kellett KA, Beckett C, Makova NZ, Revett TJ, Nalivaeva NN, Hooper NM, Turner AJ (2010) The transcriptionally active amyloid precursor protein (APP) intracellular domain is preferentially produced from the 695 isoform of APP in a {beta}-secretase-dependent pathway. *J Biol Chem* 285:41443-41454
29. Ben-Hur T, Ben-Yosef Y, Mizrachi-Kol R, Ben-Menachem O, Miller A (2006) Cytokine-mediated modulation of MMPs and TIMPs in multipotential neural precursor cells. *Journal of neuroimmunology* 175:12-18
30. Benayahu D, Fried A, Wientroub S (1995) PTH and 1,25(OH) $_2$ vitamin D priming to growth factors differentially regulates the osteoblastic markers in MBA-15 clonal subpopulations. *Biochemical and biophysical research communications* 210:197-204
31. Berezovska O, Xia MQ, Hyman BT (1998) Notch is expressed in adult brain, is coexpressed with presenilin-1, and is altered in Alzheimer disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 57:738-745
32. Berquin IM, Yan S, Katiyar K, Huang L, Sloane BF, Troen BR (1999) Differentiating agents regulate cathepsin B gene expression in HL-60 cells. *Journal of leukocyte biology* 66:609-616
33. Beydoun MA, Ding EL, Beydoun HA, Tanaka T, Ferrucci L, Zonderman AB (2012) Vitamin D receptor and megalin gene polymorphisms and their associations with longitudinal cognitive change in US adults. *Am J Clin Nutr* 95:163-178
34. Bhat M, Kalam R, Qadri SS, Madabushi S, Ismail A (2013) Vitamin D Deficiency-Induced Muscle Wasting Occurs through the Ubiquitin Proteasome Pathway and Is Partially Corrected by Calcium in Male Rats. *Endocrinology* 154:4018-4029

35. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP (1997) A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature* 385:729-733
36. Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology* 37:911-917
37. Bourne KZ, Ferrari DC, Lange-Dohna C, Rossner S, Wood TG, Perez-Polo JR (2007) Differential regulation of BACE1 promoter activity by nuclear factor- κ B in neurons and glia upon exposure to beta-amyloid peptides. *Journal of neuroscience research* 85:1194-1204
38. Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta neuropathologica* 82:239-259
39. Braak H, Thal DR, Ghebremedhin E, Del Tredici K (2011) Stages of the Pathologic Process in Alzheimer Disease: Age Categories From 1 to 100 Years. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 70:960-969
40. Braak H, Feldengut S, Del Tredici K (2013) Pathogenese und Pr?vention des M.?Alzheimer. *Der Nervenarzt* 84:477-482
41. Brenza HL, Kimmel-Jehan C, Jehan F, Shinki T, Wakino S, Anazawa H, Suda T, DeLuca HF (1998) Parathyroid hormone activation of the 25-hydroxyvitamin D3-1 α -hydroxylase gene promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:1387-1391
42. Brewer LD, Thibault V, Chen KC, Langub MC, Landfield PW, Porter NM (2001) Vitamin D hormone confers neuroprotection in parallel with downregulation of L-type calcium channel expression in hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21:98-108
43. Brion JP (1998) Neurofibrillary tangles and Alzheimer's disease. *European neurology* 40:130-140
44. Briones TL, Darwish H (2012) Vitamin D mitigates age-related cognitive decline through the modulation of pro-inflammatory state and decrease in amyloid burden. *J Neuroinflammation* 9:244
45. Brown AJ, Dusso A, Slatopolsky E (1999) Vitamin D. *The American journal of physiology* 277:F157-175
46. Brown J, Bianco JI, McGrath JJ, Eyles DW (2003) 1,25-dihydroxyvitamin D3 induces nerve growth factor, promotes neurite outgrowth and inhibits mitosis in embryonic rat hippocampal neurons. *Neuroscience letters* 343:139-143
47. Brown NJ, Vaughan DE (1998) Angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Circulation* 97:1411-1420
48. Buell JS, Dawson-Hughes B, Scott TM, Weiner DE, Dallal GE, Qui WQ, Bergethon P, Rosenberg IH, Folstein MF, Patz S, Bhadelia RA, Tucker KL (2010) 25-Hydroxyvitamin D, dementia, and cerebrovascular pathology in elders receiving home services. *Neurology* 74:18-26
49. Buggia-Prevot V, Sevalle J, Rossner S, Checler F (2008) NF κ B-dependent control of BACE1 promoter transactivation by A β 42. *The Journal of biological chemistry* 283:10037-10047
50. Bulloj A, Leal MC, Surace EI, Zhang X, Xu H, Ledesma MD, Castano EM, Morelli L (2008) Detergent resistant membrane-associated IDE in brain tissue and cultured cells: Relevance to A β and insulin degradation. *Mol Neurodegener* 3:22
51. Bulloj A, Leal MC, Xu H, Castaño EM, Morelli L (2010) Insulin-degrading enzyme sorting in exosomes: a secretory pathway for a key brain amyloid-beta degrading protease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 19:79-95

52. Burg VK, Grimm HS, Rothhaar TL, Grösgen S, Hundsdörfer B, Hauptenthal VJ, Zimmer VC, Mett J, Weingärtner O, Laufs U, Broersen LM, Tanila H, Vanmierlo T, Lütjohann D, Hartmann T, Grimm MOW (2013) Plant sterols the better cholesterol in Alzheimer's disease? A mechanistical study. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33:16072-16087
53. Burild A, Lauridsen C, Faqir N, Sommer HM, Jakobsen J (2016) Vitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D3 in pork and their relationship to vitamin D status in pigs. *Journal of Nutritional Science* 5:e3-e3
54. Burns A, Jacoby R, Luthert P, Levy R (1990) Cause of death in Alzheimer's disease. *Age and ageing* 19:341-344
55. Butterfield DA, Drake J, Pocernich C, Castegna A (2001) Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid beta-peptide. *Trends in molecular medicine* 7:548-554
56. Buxbaum JD, Liu KN, Luo Y, Slack JL, Stocking KL, Peschon JJ, Johnson RS, Castner BJ, Cerretti DP, Black Ra (1998) Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *The Journal of biological chemistry* 273:27765-27767
57. Caccamo A, Oddo S, Sugarman MC, Akbari Y, LaFerla FM (2005) Age- and region-dependent alterations in Abeta-degrading enzymes: implications for Abeta-induced disorders. *Neurobiology of aging* 26:645-654
58. Campion D, Dumanchin C, Hannequin D, Dubois B, Belliard S, Puel M, Thomas-Anterion C, Michon A, Martin C, Charbonnier F, Raux G, Camuzat A, Penet C, Mesnage V, Martinez M, Clerget-Darpoux F, Brice A, Frebourg T (1999) Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *Am J Hum Genet* 65:664-670
59. Cao X, Südhof TC (2001) A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science (New York, NY)* 293:115-120
60. Carlesimo GA, Oscar-Berman M (1992) Memory deficits in Alzheimer's patients: a comprehensive review. *Neuropsychology review* 3:119-169
61. Carpenter G (1987) Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. *Annual review of biochemistry* 56:881-914
62. Celli A, Treves C, Stio M (1999) Vitamin D receptor in SH-SY5Y human neuroblastoma cells and effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on cellular proliferation. *Neurochemistry international* 34:117-124
63. Centeno V, Picotto G, Pérez A, Alisio A, Tolosa de Talamoni N (2011) Intestinal Na(+)/Ca(2+) exchanger protein and gene expression are regulated by 1,25(OH)(2)D(3) in vitamin D-deficient chicks. *Archives of biochemistry and biophysics* 509:191-196
64. Chagas CE, Borges MC, Martini LA, Rogero MM (2012) Focus on vitamin D, inflammation and type 2 diabetes. *Nutrients* 4:52-67
65. Chan R, Chan D, Woo J, Ohlsson C, Mellström D, Kwok T, Leung P (2011) Association between serum 25-hydroxyvitamin D and psychological health in older Chinese men in a cohort study. *Journal of affective disorders* 130:251-259
66. Chávez-Gutiérrez L, Tolia A, Maes E, Li T, Wong PC, de Strooper B (2008) Glu(332) in the Nicastrin ectodomain is essential for gamma-secretase complex maturation but not for its activity. *The Journal of biological chemistry* 283:20096-20105
67. Cheng J, Xia X, Rui Y, Zhang Z, Qin L, Han S, Wan Z (2016) The combination of 1 α ,25dihydroxyvitaminD3 with resveratrol improves neuronal degeneration by regulating endoplasmic reticulum stress, insulin signaling and inhibiting tau hyperphosphorylation in SH-SY5Y cells. *Food and Chemical Toxicology* 93:32-40

68. Cheng JB, Motola DL, Mangelsdorf DJ, Russell DW (2003) De-orphanization of cytochrome P450 2R1: a microsomal vitamin D 25-hydroxylase. *The Journal of biological chemistry* 278:38084-38093
69. Cheret C, Willem M, Fricker FR, Wende H, Wulf-Goldenberg A, Tahirovic S, Nave K-A, Saftig P, Haass C, Garratt AN, Bennett DL, Birchmeier C (2013) Bace1 and Neuregulin-1 cooperate to control formation and maintenance of muscle spindles. *The EMBO journal* 32:2015-2028
70. Chesneau V, Vekrellis K, Rosner MR, Selkoe DJ (2000) Purified recombinant insulin-degrading enzyme degrades amyloid beta-protein but does not promote its oligomerization. *Biochem J* 351 Pt 2:509-516
71. Christakos S, Ajibade DV, Dhawan P, Fechner AJ, Mady LJ (2010) Vitamin D: metabolism. *Endocrinol Metab Clin North Am* 39:243-253, table of contents
72. Christensen MA, Zhou W, Qing H, Lehman A, Philipsen S, Song W (2004) Transcriptional regulation of BACE1, the beta-amyloid precursor protein beta-secretase, by Sp1. *Mol Cell Biol* 24:865-874
73. Chun JT, Wang L, Pasinetti GM, Finch CE, Zlokovic BV (1999) Glycoprotein 330/megalin (LRP-2) has low prevalence as mRNA and protein in brain microvessels and choroid plexus. *Experimental neurology* 157:194-201
74. Chun RF, Peercy BE, Orwoll ES, Nielson CM, Adams JS, Hewison M (2014) Vitamin D and DBP: the free hormone hypothesis revisited. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 144 Pt A:132-137
75. Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I, Selkoe DJ (1992) Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* 360:672-674
76. Citron M (2002) Emerging Alzheimer's disease therapies: inhibition of beta-secretase. *Neurobiol Aging* 23:1017-1022
77. Clark IM, Swingler TE, Sampieri CL, Edwards DR (2008) The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *The international journal of biochemistry & cell biology* 40:1362-1378
78. Clemens TL, Garrett KP, Zhou XY, Pike JW, Haussler MR, Dempster DW (1988) Immunocytochemical localization of the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor in target cells. *Endocrinology* 122:1224-1230
79. Coates D (2003) The angiotensin converting enzyme (ACE). *The international journal of biochemistry & cell biology* 35:769-773
80. Cook DG, Leverenz JB, McMillan PJ, Kulstad JJ, Ericksen S, Roth RA, Schellenberg GD, Jin LW, Kovacina KS, Craft S (2003) Reduced hippocampal insulin-degrading enzyme in late-onset Alzheimer's disease is associated with the apolipoprotein E-epsilon4 allele. *Am J Pathol* 162:313-319
81. Cooke NE, Haddad JG (1989) Vitamin D binding protein (Gc-globulin). *Endocrine reviews* 10:294-307
82. Cordero JB, Cozzolino M, Lu Y, Vidal M, Slatopolsky E, Stahl PD, Barbieri MA, Dusso A (2002) 1,25-Dihydroxyvitamin D down-regulates cell membrane growth- and nuclear growth-promoting signals by the epidermal growth factor receptor. *The Journal of biological chemistry* 277:38965-38971
83. Costa EM, Feldman D (1986) Homologous up-regulation of the 1,25 (OH)₂ vitamin D₃ receptor in rats. *Biochemical and biophysical research communications* 137:742-747
84. Costa I, Labio R, Rasmussen L, Viani G, Chen E, Villares Jo, Turecki G, Smith ML, Pay?o S (2017) Change in INSR, APBA2 and IDE Gene Expressions in Brains of Alzheimer?s Disease Patients. *Current Alzheimer Research* 14:1-1

85. Cruts M, Van Broeckhoven C (1998) Presenilin mutations in Alzheimer's disease. *Human mutation* 11:183-190
86. Cui X, McGrath JJ, Burne THJ, Mackay-Sim A, Eyles DW (2007) Maternal vitamin D depletion alters neurogenesis in the developing rat brain. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 25:227-232
87. Culpan D, Palmer J, Miners JS, Love S, Kehoe PG (2011) The influence of tumour necrosis factor- alpha (TNF-alpha) on amyloid-beta (Abeta)-degrading enzymes in vitro. *Int J Mol Epidemiol Genet* 2:409-415
88. Cuvillier O, Pirianov G, Kleuser B, Vanek PG, Coso OA, Gutkind S, Spiegel S (1996) Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature* 381:800-803
89. Dalby B, Cates S, Harris A, Ohki EC, Tilkins ML, Price PJ, Ciccarone VC (2004) Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods (San Diego, Calif)* 33:95-103
90. De Strooper B, Saftig P, Craessaerts K, Vanderstichele H, Guhde G, Annaert W, Von Figura K, Van Leuven F (1998) Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 391:387-390
91. De Strooper B, Annaert W, Cupers P, Saftig P, Craessaerts K, Mumm JS, Schroeter EH, Schrijvers V, Wolfe MS, Ray WJ, Goate A, Kopan R (1999) A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 398:518-522
92. De Vrij FM, Sluijs JA, Gregori L, Fischer DF, Hermens WT, Goldgaber D, Verhaagen J, Van Leeuwen FW, Hol EM (2001) Mutant ubiquitin expressed in Alzheimer's disease causes neuronal death. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15:2680-2688
93. Deb S, Gottschall PE (1996) Increased production of matrix metalloproteinases in enriched astrocyte and mixed hippocampal cultures treated with beta-amyloid peptides. *Journal of neurochemistry* 66:1641-1647
94. DeBette S, Seshadri S, Beiser A, Au R, Himali JJ, Palumbo C, Wolf PA, DeCarli C (2011) Midlife vascular risk factor exposure accelerates structural brain aging and cognitive decline. *Neurology* 77:461-468
95. DeClerck YA, Laug WE (1996) Cooperation between matrix metalloproteinases and the plasminogen activator-plasmin system in tumor progression. *Enzyme & protein* 49:72-84
96. Dhawan P, Peng X, Sutton AL, MacDonald PN, Croniger CM, Trautwein C, Centrella M, McCarthy TL, Christakos S (2005) Functional cooperation between CCAAT/enhancer-binding proteins and the vitamin D receptor in regulation of 25-hydroxyvitamin D3 24-hydroxylase. *Mol Cell Biol* 25:472-487
97. Dickson DW, Lee SC, Mattiace LA, Yen SH, Brosnan C (1993) Microglia and cytokines in neurological disease, with special reference to AIDS and Alzheimer's disease. *Glia* 7:75-83
98. Dobnig H, Pilz S, Scharnagl H, Renner W, Seelhorst U, Wellnitz B, Kinkeldei J, Boehm BO, Weihrauch G, Maerz W (2008) Independent association of low serum 25-hydroxyvitamin d and 1,25-dihydroxyvitamin d levels with all-cause and cardiovascular mortality. *Archives of internal medicine* 168:1340-1349
99. Doi H, Nishida K, Yorimitsu M, Komiyama T, Kadota Y, Tetsunaga T, Yoshida A, Kubota S, Takigawa M, Ozaki T (2008) Interleukin-4 downregulates the cyclic tensile stress-induced matrix metalloproteinases-13 and cathepsin B expression by rat normal chondrocytes. *Acta medica Okayama* 62:119-126

100. Dong J, Wong SL, Lau CW, Lee HK, Ng CF, Zhang L, Yao X, Chen ZY, Vanhoutte PM, Huang Y (2012) Calcitriol protects renovascular function in hypertension by down-regulating angiotensin II type 1 receptors and reducing oxidative stress. *European heart journal* 33:2980-2990
101. Duckworth WC, Bennett RG, Hamel FG (1998) Insulin degradation: progress and potential. *Endocrine reviews* 19:608-624
102. Duering M, Grimm MOW, Grimm HS, Schröder J, Hartmann T (2005) Mean age of onset in familial Alzheimer's disease is determined by amyloid beta 42. *Neurobiology of Aging* 26:785-788
103. Durk MR, Chan GNY, Campos CR, Peart JC, Chow ECY, Lee E, Cannon RE, Bendayan R, Miller DS, Pang KS (2012) $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃-liganded vitamin D receptor increases expression and transport activity of P-glycoprotein in isolated rat brain capillaries and human and rat brain microvessel endothelial cells. *Journal of neurochemistry* 123:944-953
104. Durk MR, Han K, Chow ECY, Ahrens R, Henderson JT, Fraser PE, Pang KS (2014) $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ Reduces Cerebral Amyloid- β Accumulation and Improves Cognition in Mouse Models of Alzheimer's Disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34:7091-7101
105. Dursun E, Gezen-Ak D, Yilmazer S (2011) A novel perspective for Alzheimer's disease: vitamin D receptor suppression by amyloid- β and preventing the amyloid- β induced alterations by vitamin D in cortical neurons. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 23:207-219
106. Dursun E, Gezen-Ak D, Yilmazer S (2013a) A New Mechanism for Amyloid- β Induction of iNOS: Vitamin D-VDR Pathway Disruption. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*
107. Dursun E, Gezen-Ak D, Yilmazer S (2013b) Beta amyloid suppresses the expression of the vitamin d receptor gene and induces the expression of the vitamin d catabolic enzyme gene in hippocampal neurons. *Dementia and geriatric cognitive disorders* 36:76-86
108. Dursun E, Gezen-Ak D (2017) Vitamin D receptor is present on the neuronal plasma membrane and is co-localized with amyloid precursor protein, ADAM10 or Nicastrin. *PLOS ONE* 12:e0188605-e0188605
109. Dusso A, Arcidiacono MV, Yang J, Tokumoto M (2010) Vitamin D inhibition of TACE and prevention of renal osteodystrophy and cardiovascular mortality. *J Steroid Biochem Mol Biol* 121:193-198
110. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E (2005) Vitamin D. *American journal of physiology Renal physiology* 289:F8-28
111. Eckman EA, Reed DK, Eckman CB (2001) Degradation of the Alzheimer's amyloid beta peptide by endothelin-converting enzyme. *The Journal of biological chemistry* 276:24540-24548
112. Eckman EA, Watson M, Marlow L, Sambamurti K, Eckman CB (2003) Alzheimer's disease beta-amyloid peptide is increased in mice deficient in endothelin-converting enzyme. *The Journal of biological chemistry* 278:2081-2084
113. Eckman EA, Adams SK, Troendle FJ, Stodola BA, Kahn MA, Fauq AH, Xiao HD, Bernstein KE, Eckman CB (2006) Regulation of steady-state beta-amyloid levels in the brain by neprilysin and endothelin-converting enzyme but not angiotensin-converting enzyme. *The Journal of biological chemistry* 281:30471-30478
114. Edbauer D, Willem M, Lammich S, Steiner H, Haass C (2002) Insulin-degrading enzyme rapidly removes the beta-amyloid precursor protein intracellular domain (AICD). *The Journal of biological chemistry* 277:13389-13393

115. Edvardsen K, Brustad M, Engelsen O, Aksnes L (2007) The solar UV radiation level needed for cutaneous production of vitamin D₃ in the face. A study conducted among subjects living at a high latitude (68 degrees N). *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 6:57-62
116. El-Amouri SS, Zhu H, Yu J, Marr R, Verma IM, Kindy MS (2008) Neprilysin: an enzyme candidate to slow the progression of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 172:1342-1354
117. Esch FS, Keim PS, Beattie EC, Blacher RW, Culwell aR, Oltersdorf T, McClure D, Ward PJ (1990) Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science (New York, NY)* 248:1122-1124
118. Etgen T, Sander D, Bickel H, Sander K, Förstl H (2012) Vitamin D deficiency, cognitive impairment and dementia: a systematic review and meta-analysis. *Dementia and geriatric cognitive disorders* 33:297-305
119. Evans DA, Funkenstein HH, Albert MS, Scherr PA, Cook NR, Chown MJ, Hebert LE, Hennekens CH, Taylor JO (1989) Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. Higher than previously reported. *JAMA* 262:2551-2556
120. Evatt ML, DeLong MR, Khazai N, Rosen A, Triche S, Tangpricha V (2008) Prevalence of vitamin d insufficiency in patients with Parkinson disease and Alzheimer disease. *Arch Neurol* 65:1348-1352
121. Eyles DW, Smith S, Kinobe R, Hewison M, McGrath JJ (2005) Distribution of the vitamin D receptor and 1 alpha-hydroxylase in human brain. *Journal of chemical neuroanatomy* 29:21-30
122. Fabbro S, Seeds NW (2009) Plasminogen activator activity is inhibited while neuroserpin is up-regulated in the Alzheimer disease brain. *Journal of neurochemistry* 109:303-315
123. Fabbro S, Schaller K, Seeds NW (2011) Amyloid-beta levels are significantly reduced and spatial memory defects are rescued in a novel neuroserpin-deficient Alzheimer's disease transgenic mouse model. *Journal of neurochemistry* 118:928-938
124. Faghihi MA, Modarresi F, Khalil AM, Wood DE, Sahagan BG, Morgan TE, Finch CE, St Laurent G, 3rd, Kenny PJ, Wahlestedt C (2008) Expression of a noncoding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forward regulation of beta-secretase. *Nat Med* 14:723-730
125. Farris W, Mansourian S, Chang Y, Lindsley L, Eckman EA, Frosch MP, Eckman CB, Tanzi RE, Selkoe DJ, Guenette S (2003) Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4162-4167
126. Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Sczuzfca M (2005) Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 366:2112-2117
127. Ferrington L, Miners JS, Palmer LE, Bond SM, Povey JE, Kelly PA, Love S, Horsburgh KJ, Kehoe PG (2011) Angiotensin II-inhibiting drugs have no effect on intraneuronal A β or oligomeric A β levels in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Am J Transl Res* 3:197-208
128. Ferrington L, Palmer LE, Love S, Horsburgh KJ, Kelly PA, Kehoe PG (2012) Angiotensin II-inhibition: effect on Alzheimer's pathology in the aged triple transgenic mouse. *Am J Transl Res* 4:151-164
129. Fidani L, Goate A (1992) Mutations in APP and their role in beta-amyloid deposition. *Progress in clinical and biological research* 379:195-214

130. Filley CM, Rollins YD, Anderson CA, Arciniegas DB, Howard KL, Murrell JR, Boyer PJ, Kleinschmidt-DeMasters BK, Ghetti B (2007) The genetics of very early onset Alzheimer disease. *Cognitive and behavioral neurology : official journal of the Society for Behavioral and Cognitive Neurology* 20:149-156
131. Fleet JC (2004) Rapid, membrane-initiated actions of 1,25 dihydroxyvitamin D: what are they and what do they mean? *The Journal of nutrition* 134:3215-3218
132. Fraser DR, Kodicek E (1970) Unique biosynthesis by kidney of a biological active vitamin D metabolite. *Nature* 228:764-766
133. Fukumoto H, Cheung BS, Hyman BT, Irizarry MC (2002) Beta-secretase protein and activity are increased in the neocortex in Alzheimer disease. *Archives of neurology* 59:1381-1389
134. Gatz M, Pedersen NL, Berg S, Johansson B, Johansson K, Mortimer JA, Posner SF, Viitanen M, Winblad B, Ahlbom A (1997) Heritability for Alzheimer's disease: the study of dementia in Swedish twins. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* 52:M117-125
135. Gatz M, Reynolds CA, Fratiglioni L, Johansson B, Mortimer JA, Berg S, Fiske A, Pedersen NL (2006) Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Archives of general psychiatry* 63:168-174
136. Gezen-Ak D, Dursun E, Ertan T, Hanağasi H, Gürvit H, Emre M, Eker E, Oztürk M, Engin F, Yilmazer S (2007) Association between vitamin D receptor gene polymorphism and Alzheimer's disease. *The Tohoku journal of experimental medicine* 212:275-282
137. Gezen-Ak D, Dursun E, Bilgiç B, Hanağasi H, Ertan T, Gürvit H, Emre M, Eker E, Ulutin T, Uysal O, Yilmazer S (2012) Vitamin D receptor gene haplotype is associated with late-onset Alzheimer's disease. *The Tohoku journal of experimental medicine* 228:189-196
138. Gezen-Ak D, Dursun E, Yilmazer S (2013) Vitamin D inquiry in hippocampal neurons: consequences of vitamin D-VDR pathway disruption on calcium channel and the vitamin D requirement. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology* 34:1453-1458
139. Gezen-Ak D, Atasoy IL, Candaş E, Alaylioglu M, Yilmazer S, Dursun E (2017) Vitamin D Receptor Regulates Amyloid Beta 1–42 Production with Protein Disulfide Isomerase A3. *ACS Chemical Neuroscience* 8:2335-2346
140. Glenner GG, Wong CW (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and biophysical research communications* 120:885-890
141. Gloth FM, Gundberg CM, Hollis BW, Haddad JG, Tobin JD (1995) Vitamin D deficiency in homebound elderly persons. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 274:1683-1686
142. Goddard DR, Bunning RA, Woodroffe MN (2001) Astrocyte and endothelial cell expression of ADAM 17 (TACE) in adult human CNS. *Glia* 34:267-271
143. Grimm MO, Kuchenbecker J, Grosgen S, Burg VK, Hundsdorfer B, Rothhaar TL, Friess P, de Wilde MC, Broersen LM, Penke B, Peter M, Vigh L, Grimm HS, Hartmann T (2011) Docosahexaenoic acid reduces amyloid beta production via multiple pleiotropic mechanisms. *J Biol Chem* 286:14028-14039
144. Grimm MO, Zimmer VC, Lehmann J, Grimm HS, Hartmann T (2013a) The impact of cholesterol, DHA, and sphingolipids on Alzheimer's disease. *Biomed Res Int* 2013:814390
145. Grimm MO, Regner L, Mett J, Stahlmann CP, Schorr P, Nelke C, Streidenberger O, Stoetzel H, Winkler J, Zaidan SR, Thiel A, Endres K, Grimm HS, Volmer DA,

- Hartmann T (2016a) Tocotrienol Affects Oxidative Stress, Cholesterol Homeostasis and the Amyloidogenic Pathway in Neuroblastoma Cells: Consequences for Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* 17
146. Grimm MOW, Hauptenthal VJ, Rothhaar TL, Zimmer VC, Grösgen S, Hundsdörfer B, Lehmann J, Grimm HS, Hartmann T (2013b). Effect of Different Phospholipids on α -Secretase Activity in the Non-Amyloidogenic Pathway of Alzheimer's Disease. In *Int J Mol Sci*, pp. 5879-5898.
147. Grimm MOW, Lehmann J, Mett J, Zimmer VC, Grösgen S, Stahlmann CP, Hundsdörfer B, Hauptenthal VJ, Rothhaar TL, Herr C, Bals R, Grimm HS, Hartmann T (2013c) Impact of Vitamin D on Amyloid Precursor Protein Processing and Amyloid- β Peptide Degradation in Alzheimer's Disease. *Neuro-degenerative diseases*
148. Grimm MOW, Hundsdörfer B, Grösgen S, Mett J, Zimmer VC, Stahlmann CP, Hauptenthal VJ, Rothhaar TL, Lehmann J, Pätzold A, Zinser EG, Tanila H, Shen J, Müller U, Grimm HS, Hartmann T (2014) PS dependent APP cleavage regulates glucosylceramide synthase and is affected in Alzheimer's disease. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 34:92-110
149. Grimm MOW, Mett J, Stahlmann CP, Grösgen S, Hauptenthal VJ, Blömel T, Hundsdörfer B, Zimmer VC, Mylonas NT, Tanila H, Müller U, Grimm HS, Hartmann T (2015) APP intracellular domain derived from amyloidogenic β 2- and β 3-secretase cleavage regulates neprilysin expression. *Frontiers in Aging Neuroscience* 7:77-77
150. Grimm MOW, Mett J, Stahlmann CP, Hauptenthal VJ, Blömel T, Stötzel H, Grimm HS, Hartmann T (2016b) Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid increase the degradation of amyloid- β by affecting insulin-degrading enzyme ¹. *Biochemistry and Cell Biology* 94:534-542
151. Grimm MOW, Thiel A, Lauer AA, Winkler J, Lehmann J, Regner L, Nelke C, Janitschke D, Benoist C, Streidenberger O, Stötzel H, Endres K, Herr C, Beisswenger C, Grimm HS, Bals R, Lammert F, Hartmann T (2017) Vitamin D and Its Analogues Decrease Amyloid- β (A β) Formation and Increase A β -Degradation. *International journal of molecular sciences* 18:2764-2764
152. Grinberg LT, Rüb U, Ferretti REL, Nitrini R, Farfel JM, Polichiso L, Gierga K, Jacob-Filho W, Heinsen H, Brazilian Brain Bank Study G (2009) The dorsal raphe nucleus shows phospho-tau neurofibrillary changes before the transentorhinal region in Alzheimer's disease. A precocious onset? *Neuropathology and applied neurobiology* 35:406-416
153. Grudzien A, Shaw P, Weintraub S, Bigio E, Mash DC, Mesulam MM (2007) Locus coeruleus neurofibrillary degeneration in aging, mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* 28:327-335
154. Grundmann M, Haidar M, Placzko S, Niendorf R, Darashchonak N, Hubel CA, von Versen-Höynck F (2012) Vitamin D improves the angiogenic properties of endothelial progenitor cells. *American journal of physiology Cell physiology* 303:C954-962
155. Grziwa B, Grimm MOW, Masters CL, Beyreuther K, Hartmann T, Lichtenthaler SF (2003) The transmembrane domain of the amyloid precursor protein in microsomal membranes is on both sides shorter than predicted. *The Journal of biological chemistry* 278:6803-6808
156. Gudala K, Bansal D, Schifano F, Bhansali A (2013) Diabetes mellitus and risk of dementia: A meta-analysis of prospective observational studies. *Journal of diabetes investigation* 4:640-650
157. Gumireddy K, Ikegaki N, Phillips PC, Sutton LN, Reddy CD (2003) Effect of 20-epi-1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 on the proliferation of human neuroblastoma: role of

- cell cycle regulators and the Myc-Id2 pathway. *Biochemical pharmacology* 65:1943-1955
158. Guo YX, He LY, Zhang M, Wang F, Liu F, Peng WX (2016) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 regulates expression of LRP1 and RAGE in vitro and in vivo, enhancing A β 1–40 brain-to-blood efflux and peripheral uptake transport. *Neuroscience* 322:28-38
 159. Haass C, Hung AY, Schlossmacher MG, Teplow DB, Selkoe DJ (1993) beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *The Journal of biological chemistry* 268:3021-3024
 160. Hadler-Olsen E, Winberg J-O, Uhlin-Hansen L (2013) Matrix metalloproteinases in cancer: their value as diagnostic and prognostic markers and therapeutic targets. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 34:2041-2051
 161. Hagiwara H, Furuhashi H, Nakaya K, Nakamura Y (1988) Effects of vitamin D3 and related compounds on angiotensin converting enzyme activity of endothelial cells and on release of plasminogen activator from them. *Chemical & pharmaceutical bulletin* 36:4858-4864
 162. Halder SK, Osteen KG, Al-Hendy A (2013) Vitamin D3 inhibits expression and activities of matrix metalloproteinase-2 and -9 in human uterine fibroid cells. *Human reproduction (Oxford, England)* 28:2407-2416
 163. Hamilton JA, Lingelbach S, Partridge NC, Martin TJ (1985) Regulation of plasminogen activator production by bone-resorbing hormones in normal and malignant osteoblasts. *Endocrinology* 116:2186-2191
 164. Hanson RW (1998) Biological role of the isoforms of C/EBP minireview series. *The Journal of biological chemistry* 273:28543-28543
 165. Hardy J (1997) The Alzheimer family of diseases: many etiologies, one pathogenesis? *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:2095-2097
 166. Hawkes N (2017) Merck ends trial of potential Alzheimer's drug verubecestat. *BMJ (Clinical research ed)* 356:j845-j845
 167. He C (1996) Molecular mechanism of transcriptional activation of human gelatinase B by proximal promoter. *Cancer letters* 106:185-191
 168. He G, Qing H, Tong Y, Cai F, Ishiura S, Song W (2007) Degradation of nicastrin involves both proteasome and lysosome. *Journal of neurochemistry* 101:982-992
 169. Hebert LE, Weuve J, Scherr PA, Evans DA (2013) Alzheimer disease in the United States (2010-2050) estimated using the 2010 census. *Neurology* 80:1778-1783
 170. Hemming ML, Selkoe DJ, Farris W (2007) Effects of prolonged angiotensin-converting enzyme inhibitor treatment on amyloid beta-protein metabolism in mouse models of Alzheimer disease. *Neurobiol Dis* 26:273-281
 171. Heneka MT, Carson MJ, Khoury JE, Landreth GE, Brosseron F, Feinstein DL, Jacobs AH, Wyss-Coray T, Vitorica J, Ransohoff RM, Herrup K, Frautschy SA, Finsen B, Brown GC, Verkhratsky A, Yamanaka K, Koistinaho J, Latz E, Halle A, Petzold GC, Town T, Morgan D, Shinohara ML, Perry VH, Holmes C, Bazan NG, Brooks DJ, Hunot S, Joseph B, Deigendesch N, Garaschuk O, Boddeke E, Dinarello CA, Breitner JC, Cole GM, Golenbock DT, Kummer MP (2015) Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology* 14:388-405
 172. Hill CS, Treisman R (1995) Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell* 80:199-211
 173. Hitt B, Riordan SM, Kukreja L, Eimer WA, Rajapaksha TW, Vassar R (2012) β -Site amyloid precursor protein (APP)-cleaving enzyme 1 (BACE1)-deficient mice exhibit a close homolog of L1 (CHL1) loss-of-function phenotype involving axon guidance defects. *The Journal of biological chemistry* 287:38408-38425

174. Hofman A, Rocca WA, Brayne C, Breteler MM, Clarke M, Cooper B, Copeland JR, Dartigues JF, da Silva Droux A, Hagnell O (1991) The prevalence of dementia in Europe: a collaborative study of 1980-1990 findings. Eurodem Prevalence Research Group. *International journal of epidemiology* 20:736-748
175. Holcomb L, Gordon MN, McGowan E, Yu X, Benkovic S, Jantzen P, Wright K, Saad I, Mueller R, Morgan D, Sanders S, Zehr C, O'Campo K, Hardy J, Prada CM, Eckman C, Younkin S, Hsiao K, Duff K (1998) Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nature medicine* 4:97-100
176. Holick MF, Frommer JE, McNeill SC, Richtand NM, Henley JW, Potts JT (1977) Photometabolism of 7-dehydrocholesterol to previtamin D3 in skin. *Biochemical and biophysical research communications* 76:107-114
177. Holick MF (2007) Vitamin D deficiency. *The New England journal of medicine* 357:266-281
178. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, Murad MH, Weaver CM, Endocrine S (2011) Evaluation, Treatment, and Prevention of Vitamin D Deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 96:1911-1930
179. Holst-Hansen C, Johannessen B, Høyer-Hansen G, Rømer J, Ellis V, Brüner N (1996) Urokinase-type plasminogen activation in three human breast cancer cell lines correlates with their in vitro invasiveness. *Clinical & experimental metastasis* 14:297-307
180. Hoogenraad TU, Jansen GH (1994) Alzheimer type II cells in multiple system atrophy? *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 9:472-473
181. Hook V, Hook G, Kindy M (2010) Pharmacogenetic features of cathepsin B inhibitors that improve memory deficit and reduce beta-amyloid related to Alzheimer's disease. *Biological chemistry* 391:861-872
182. Hook V, Funkelstein L, Wegrzyn J, Bark S, Kindy M, Hook G (2012) Cysteine Cathepsins in the secretory vesicle produce active peptides: Cathepsin L generates peptide neurotransmitters and cathepsin B produces beta-amyloid of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1824:89-104
183. Horiuchi K, Kimura T, Miyamoto T, Takaishi H, Okada Y, Toyama Y, Blobel CP (2007) Cutting edge: TNF-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17) inactivation in mouse myeloid cells prevents lethality from endotoxin shock. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 179:2686-2689
184. Howell S, Caswell AM, Kenny AJ, Turner AJ (1993) Membrane peptidases on human osteoblast-like cells in culture: hydrolysis of calcitonin and hormonal regulation of endopeptidase-24.11. *Biochem J* 290 (Pt 1):159-164
185. Hu J, Igarashi A, Kamata M, Nakagawa H (2001) Angiotensin-converting enzyme degrades Alzheimer amyloid beta-peptide (A beta); retards A beta aggregation, deposition, fibril formation; and inhibits cytotoxicity. *The Journal of biological chemistry* 276:47863-47868
186. Hu X, Hicks CW, He W, Wong P, Macklin WB, Trapp BD, Yan R (2006) Bace1 modulates myelination in the central and peripheral nervous system. *Nature neuroscience* 9:1520-1525
187. Hu X, He W, Luo X, Tsubota KE, Yan R (2013) BACE1 regulates hippocampal astrogenesis via the Jagged1-Notch pathway. *Cell reports* 4:40-49
188. Huang S-M, Mouri A, Kokubo H, Nakajima R, Suemoto T, Higuchi M, Staufenbiel M, Noda Y, Yamaguchi H, Nabeshima T, Saido TC, Iwata N (2006) Neprilysin-sensitive synapse-associated amyloid-beta peptide oligomers impair neuronal

- plasticity and cognitive function. *The Journal of biological chemistry* 281:17941-17951
189. Hussain I, Powell D, Howlett DR, Tew DG, Meek TD, Chapman C, Gloger IS, Murphy KE, Southan CD, Ryan DM, Smith TS, Simmons DL, Walsh FS, Dingwall C, Christie G (1999) Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Molecular and cellular neurosciences* 14:419-427
 190. Hutton M (2004) Presenilin mutations associated with fronto-temporal dementia. *Annals of neurology* 55:604-606
 191. Ibi M, Sawada H, Nakanishi M, Kume T, Katsuki H, Kaneko S, Shimohama S, Akaike A (2001) Protective effects of 1 alpha,25-(OH)(2)D(3) against the neurotoxicity of glutamate and reactive oxygen species in mesencephalic culture. *Neuropharmacology* 40:761-771
 192. Ida N, Hartmann T, Pantel J, Schröder J, Zerfass R, Förstl H, Sandbrink R, Masters CL, Beyreuther K (1996) Analysis of heterogeneous A4 peptides in human cerebrospinal fluid and blood by a newly developed sensitive Western blot assay. *The Journal of biological chemistry* 271:22908-22914
 193. Indig FE, Benayahu D, Fried A, Wientroub S, Blumberg S (1990) Neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) is highly expressed on osteoblastic cells and other marrow stromal cell types. *Biochemical and biophysical research communications* 172:620-626
 194. International Genomics of Alzheimer's Disease Consortium L, Lambert J-C, Wang L-S, Choi S-H, Harold D, Vedernikov A, Escott-Price V, Stone T, Richards A, Bellenguez C, Ibrahim-Verbaas CA, Naj AC, Sims R, Gerrish A, Jun G, DeStefano AL, Bis JC, Beecham GW, Grenier-Boley B, Russo G, Thornton-Wells TA, Jones N, Smith AV, Chouraki V, Thomas C, Ikram MA, Zelenika D, Vardarajan BN, Kamatani Y, Lin C-F, Schmidt H, Kunkle BW, Dunstan ML, Ruiz A, Bihoreau M-T, Reitz C, Pasquier F, Hollingworth P, Hanon O, Fitzpatrick AL, Buxbaum JD, Campion D, Crane PK, Becker T, Gudnason V, Cruchaga C, Craig D, Amin N, Berr C, Lopez OL, De Jager PL, Deramecourt V, Johnston JA, Evans D, Lovestone S, Letteneur L, Kornhuber J, Tarraga L, Rubinsztein DC, Eiriksdottir G, Sleegers K, Goate AM, Fiévet N, Huentelman MJ, Gill M, Emilsson V, Brown K, Kamboh MI, Keller L, Barberger-Gateau P, McGuinness B, Larson EB, Myers AJ, Dufouil C, Todd S, Wallon D, Love S, Kehoe P, Rogaeva E, Gallacher J, St George-Hyslop P, Clarimon J, Lleò A, Bayer A, Tsuang DW, Yu L, Tsolaki M, Bossù P, Spalletta G, Proitsi P, Collinge J, Sorbi S, Sanchez Garcia F, Fox N, Hardy J, Deniz Naranjo MC, Razquin C, Bosco P, Clarke R, Brayne C, Galimberti D, Mancuso M, Moebus S, Mecocci P, del Zompo M, Maier W, Hampel H, Pilotto A, Bullido M, Panza F, Caffarra P, Nacmias B, Gilbert JR, Mayhaus M, Jessen F, Dichgans M, Lannfelt L, Hakonarson H, Pichler S, Carrasquillo MM, Ingelsson M, Beekly D, Alavarez V, Zou F, Valladares O, Younkin SG, Coto E, Hamilton-Nelson KL, Mateo I, Owen MJ, Faber KM, Jonsson PV, Combarros O, O'Donovan MC, Cantwell LB, Soininen H, Blacker D, Mead S, Mosley TH, Bennett DA, Harris TB, Fratiglioni L, Holmes C, de Bruijn RFAG, Passmore P, Montine TJ, Bettens K, Rotter JI, Brice A, Morgan K, Foroud TM, Kukull WA, Hannequin D, Powell JF, Nalls MA, Ritchie K, Lunetta KL, Kauwe JSK, Boerwinkle E, Riemenschneider M, Boada M, Hiltunen M, Martin ER, Pastor P, Schmidt R, Rujescu D, Dartigues J-F, Mayeux R, Tzourio C, Hofman A, Nöthen MM, Graff C, Psaty BM, Haines JL, Lathrop M, Pericak-Vance MA, Launer LJ, Farrer LA, van Duijn CM, Van Broeckhoven C, Ramirez A, Schellenberg GD, Seshadri S, Amouyel P, Williams J, Holmans PA (2015) Convergent genetic and expression data implicate immunity in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 11:658-671

195. Ito S, Ohtsuki S, Nezu Y, Koitabashi Y, Murata S, Terasaki T (2011) 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 enhances cerebral clearance of human amyloid-beta peptide(1-40) from mouse brain across the blood-brain barrier. *Fluids Barriers CNS* 8:20
196. Iwata N, Takaki Y, Fukami S, Tsubuki S, Saido TC (2002) Region-specific reduction of A beta-degrading endopeptidase, neprilysin, in mouse hippocampus upon aging. *Journal of neuroscience research* 70:493-500
197. Iwata N, Sekiguchi M, Hattori Y, Takahashi A, Asai M, Ji B, Higuchi M, Staufenbiel M, Muramatsu S-i, Saido TC (2013) Global brain delivery of neprilysin gene by intravascular administration of AAV vector in mice. *Scientific reports* 3:1472-1472
198. Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y (1994) Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron* 13:45-53
199. Jablonski KL, Chonchol M, Pierce GL, Walker AE, Seals DR (2011) 25-Hydroxyvitamin D deficiency is associated with inflammation-linked vascular endothelial dysfunction in middle-aged and older adults. *Hypertension* 57:63-69
200. Jacobsen JS, Comery TA, Martone RL, Elokda H, Crandall DL, Oganessian A, Aschmies S, Kirksey Y, Gonzales C, Xu J, Zhou H, Atchison K, Wagner E, Zaleska MM, Das I, Arias RL, Bard J, Riddell D, Gardell SJ, Abou-Gharbia M, Robichaud A, Magolda R, Vlasuk GP, Bjornsson T, Reinhart PH, Pangalos MN (2008) Enhanced clearance of Abeta in brain by sustaining the plasmin proteolysis cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:8754-8759
201. Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT (1993) The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 32:4693-4697
202. Jones L, Holmans PA, Hamshere ML, Harold D, Moskvina V, Ivanov D, Pocklington A, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Gerrish A, Pahwa JS, Jones N, Stretton A, Morgan AR, Lovestone S, Powell J, Proitsi P, Lupton MK, Brayne C, Rubinsztein DC, Gill M, Lawlor B, Lynch A, Morgan K, Brown KS, Passmore PA, Craig D, McGuinness B, Todd S, Holmes C, Mann D, Smith AD, Love S, Kehoe PG, Mead S, Fox N, Rossor M, Collinge J, Maier W, Jessen F, Schürmann B, Heun R, Kölsch H, van den Bussche H, Heuser I, Peters O, Kornhuber J, Wiltfang J, Dichgans M, Frölich L, Hampel H, Hüll M, Rujescu D, Goate AM, Kauwe JSK, Cruchaga C, Nowotny P, Morris JC, Mayo K, Livingston G, Bass NJ, Gurling H, McQuillin A, Gwilliam R, Deloukas P, Al-Chalabi A, Shaw CE, Singleton AB, Guerreiro R, Mühleisen TW, Nöthen MM, Moebus S, Jöckel K-H, Klopp N, Wichmann HE, Rütger E, Carrasquillo MM, Pankratz VS, Younkin SG, Hardy J, O'Donovan MC, Owen MJ, Williams J (2010) Genetic evidence implicates the immune system and cholesterol metabolism in the aetiology of Alzheimer's disease. *PloS one* 5:e13950-e13950
203. Kalvodova L, Kahya N, Schwille P, Eehalt R, Verkade P, Drechsel D, Simons K (2005) Lipids as modulators of proteolytic activity of BACE: involvement of cholesterol, glycosphingolipids, and anionic phospholipids in vitro. *The Journal of biological chemistry* 280:36815-36823
204. Kamel K, Kolinski A (2012) Assessment of the free binding energy of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and its analogs with the human VDR receptor model. *Acta biochimica Polonica* 59:653-660
205. Kang EL, Cameron AN, Piazza F, Walker KR, Tesco G (2010) Ubiquitin regulates GGA3-mediated degradation of BACE1. *J Biol Chem* 285:24108-24119
206. Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Muller-Hill B (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325:733-736

207. Karaca I, Wagner H, Ramirez A (2017) Suche nach Risikogenen bei der Alzheimer-Erkrankung. *Der Nervenarzt*
208. Kärkkäinen I, Rybnikova E, Pelto-Huikko M, Huovila AP (2000) Metalloprotease-disintegrin (ADAM) genes are widely and differentially expressed in the adult CNS. *Molecular and cellular neurosciences* 15:547-560
209. Keller JN, Hanni KB, Markesbery WR (2000) Impaired proteasome function in Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry* 75:436-439
210. Kennedy ME, Stamford AW, Chen X, Cox K, Cumming JN, Dockendorf MF, Egan M, Ereshefsky L, Hodgson RA, Hyde LA, Jhee S, Kleijn HJ, Kuvelkar R, Li W, Mattson BA, Mei H, Palcza J, Scott JD, Tanen M, Troyer MD, Tseng JL, Stone JA, Parker EM, Forman MS (2016) The BACE1 inhibitor verubecestat (MK-8931) reduces CNS β -amyloid in animal models and in Alzheimers disease patients. *Science Translational Medicine* 8:363ra150-363ra150
211. Kieseier BC, Pischel H, Neuen-Jacob E, Tourtellotte WW, Hartung H-P (2003) ADAM-10 and ADAM-17 in the inflamed human CNS. *Glia* 42:398-405
212. Kimberly WT, Wolfe MS (2003) Identity and function of gamma-secretase. *Journal of neuroscience research* 74:353-360
213. Kinoshita A, Fukumoto H, Shah T, Whelan CM, Irizarry MC, Hyman BT (2003) Demonstration by FRET of BACE interaction with the amyloid precursor protein at the cell surface and in early endosomes. *Journal of cell science* 116:3339-3346
214. Klenk J, Rapp K, Denkinger MD, Nagel G, Nikolaus T, Peter R, Koenig W, Böhm BO, Rothenbacher D (2013) Seasonality of vitamin D status in older people in Southern Germany: implications for assessment. *Age and ageing* 42:404-408
215. Knops J, Suomensaaari S, Lee M, McConlogue L, Seubert P, Sinha S (1995) Cell-type and amyloid precursor protein-type specific inhibition of A beta release by bafilomycin A1, a selective inhibitor of vacuolar ATPases. *The Journal of biological chemistry* 270:2419-2422
216. Koh YH, von Arnim CAF, Hyman BT, Tanzi RE, Tesco G (2005) BACE is degraded via the lysosomal pathway. *The Journal of biological chemistry* 280:32499-32504
217. Koli K, Keski-Oja J (1996) Vitamin D3 regulation of transforming growth factor-beta system in epithelial and fibroblastic cells--relationships to plasminogen activation. *The journal of investigative dermatology Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc [and] European Society for Dermatological Research* 1:33-38
218. Koli K, Keski-Oja J (2000) 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and its analogues down-regulate cell invasion-associated proteases in cultured malignant cells. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* 11:221-229
219. Koo EH, Squazzo SL (1994) Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. *The Journal of biological chemistry* 269:17386-17389
220. Kounnas MZ, Haudenschild CC, Strickland DK, Argraves WS Immunological localization of glycoprotein 330, low density lipoprotein receptor related protein and 39 kDa receptor associated protein in embryonic mouse tissues. *In vivo (Athens, Greece)* 8:343-351
221. Kuhn PH, Wang H, Dislich B, Colombo A, Zeitschel U, Ellwart JW, Kremmer E, Rossner S, Lichtenthaler SF (2010) ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *Embo j* 29:3020-3032
222. Kumar S, Rezaei-Ghaleh N, Terwel D, Thal DR, Richard M, Hoch M, Mc Donald JM, Wullner U, Glebov K, Heneka MT, Walsh DM, Zweckstetter M, Walter J (2011)

- Extracellular phosphorylation of the amyloid beta-peptide promotes formation of toxic aggregates during the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Embo j* 30:2255-2265
223. Kumar S, Singh S, Hinze D, Josten M, Sahl HG, Siepmann M, Walter J (2012) Phosphorylation of amyloid-beta peptide at serine 8 attenuates its clearance via insulin-degrading and angiotensin-converting enzymes. *J Biol Chem* 287:8641-8651
 224. Kuningas M, Mooijaart SP, Jolles J, Slagboom PE, Westendorp RGJ, van Heemst D (2009) VDR gene variants associate with cognitive function and depressive symptoms in old age. *Neurobiology of aging* 30:466-473
 225. Kuruppu S, Tochon-Danguy N, Smith AI (2010) Role of Protein Kinase C in Endothelin Converting Enzyme-1 trafficking and shedding from endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* 398:173-177
 226. Kuruppu S, Smith AI (2012) Endothelin Converting Enzyme-1 phosphorylation and trafficking. *FEBS letters* 586:2212-2217
 227. Kwaan HC, McMahon B (2009) The role of plasminogen-plasmin system in cancer. *Cancer treatment and research* 148:43-66
 228. Lambert J-C, Amouyel P (2011) Genetics of Alzheimer's disease: new evidences for an old hypothesis? *Current opinion in genetics & development* 21:295-301
 229. Landel V, Annweiler C, Millet P, Morello M, Féron F (2016a) Vitamin D, Cognition and Alzheimer's Disease: The Therapeutic Benefit is in the D-Tails. *Journal of Alzheimer's Disease* 53:419-444
 230. Landel V, Millet P, Baranger K, Loriod B, Féron F (2016b) Vitamin D interacts with Esr1 and Igf1 to regulate molecular pathways relevant to Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration* 11:22-22
 231. Landel V, Stephan D, Cui X, Eyles D, Féron F (2017) Differential expression of vitamin D-associated enzymes and receptors in brain cell subtypes. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*
 232. Landfield PW, Cadwallader-Neal L (1998) Long-term treatment with calcitriol (1,25(OH)₂ vit D₃) retards a biomarker of hippocampal aging in rats. *Neurobiol Aging* 19:469-477
 233. Launer LJ, Ross GW, Petrovitch H, Masaki K, Foley D, White LR, Havlik RJ Midlife blood pressure and dementia: the Honolulu-Asia aging study. *Neurobiology of aging* 21:49-55
 234. Lautrette A, Li S, Alili R, Sunnarborg SW, Burtin M, Lee DC, Friedlander G, Terzi F (2005) Angiotensin II and EGF receptor cross-talk in chronic kidney diseases: a new therapeutic approach. *Nature medicine* 11:867-874
 235. Leal MC, Surace EI, Holgado MP, Ferrari CC, Tarelli R, Pitossi F, Wisniewski T, Castano EM, Morelli L (2012) Notch signaling proteins HES-1 and Hey-1 bind to insulin degrading enzyme (IDE) proximal promoter and repress its transcription and activity: implications for cellular Abeta metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1823:227-235
 236. Leal MC, Magnani N, Villordo S, Buslje CM, Evelson P, Castaño EM, Morelli L (2013) Transcriptional regulation of insulin-degrading enzyme modulates mitochondrial amyloid β (A β) peptide catabolism and functionality. *The Journal of biological chemistry* 288:12920-12931
 237. Ledesma MD, Da Silva JS, Crassaerts K, Delacourte A, De Strooper B, Dotti CG (2000) Brain plasmin enhances APP alpha-cleavage and Abeta degradation and is reduced in Alzheimer's disease brains. *EMBO Rep* 1:530-535
 238. Lee YH, Kim J-H, Song GG (2014) Vitamin D receptor polymorphisms and susceptibility to Parkinson's disease and Alzheimer's disease: a meta-analysis. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology* 35:1947-1953

239. Lehmann DJ, Refsum H, Warden DR, Medway C, Wilcock GK, Smith aD (2011) The vitamin D receptor gene is associated with Alzheimer's disease. *Neuroscience letters* 504:79-82
240. Leissring MA, Farris W, Chang AY, Walsh DM, Wu X, Sun X, Frosch MP, Selkoe DJ (2003) Enhanced proteolysis of beta-amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death. *Neuron* 40:1087-1093
241. Leissring MA, Farris W, Wu X, Christodoulou DC, Haigis MC, Guarente L, Selkoe DJ (2004) Alternative translation initiation generates a novel isoform of insulin-degrading enzyme targeted to mitochondria. *Biochem J* 383:439-446
242. Li R, Lindholm K, Yang LB, Yue X, Citron M, Yan R, Beach T, Sue L, Sabbagh M, Cai H, Wong P, Price D, Shen Y (2004) Amyloid beta peptide load is correlated with increased beta-secretase activity in sporadic Alzheimer's disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3632-3637
243. Lin X, Koelsch G, Wu S, Downs D, Dashti A, Tang J (2000) Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1456-1460
244. Littlejohns TJ, Henley WE, Lang IA, Annweiler C, Beauchet O, Chaves PH, Fried L, Kestenbaum BR, Kuller LH, Langa KM, Lopez OL, Kos K, Soni M, Llewellyn DJ (2014) Vitamin D and the risk of dementia and Alzheimer disease. *Neurology* 83:920-928
245. Liu RM, van Groen T, Katre A, Cao D, Kadisha I, Ballinger C, Wang L, Carroll SL, Li L (2011) Knockout of plasminogen activator inhibitor 1 gene reduces amyloid beta peptide burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 32:1079-1089
246. Liu W, Yu WR, Carling T, Juhlin C, Rastad J, Ridefelt P, Akerström G, Hellman P (1998) Regulation of gp330/megalin expression by vitamins A and D. *European journal of clinical investigation* 28:100-107
247. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25:402-408
248. Llewellyn DJ, Lang IA, Langa KM, Melzer D (2011) Vitamin D and cognitive impairment in the elderly U.S. population. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 66:59-65
249. Loef M, Walach H (2013) Midlife obesity and dementia: meta-analysis and adjusted forecast of dementia prevalence in the United States and China. *Obesity (Silver Spring, Md)* 21:E51-55
250. Lu H, Mirshahi M, Soria C, Soria J, Li H, Dosquet-Bernard C, Caen JP (1988) Enhanced expression of urokinase activity on U 937 cell line by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ induction. *Thrombosis research Supplement* 8:57-63
251. Luo X-h, Liao E-y (2003) 1alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ regulates the expression of membrane-type matrix metalloproteinase-1 in normal human osteoblast-like cells. *Endocrine research* 29:353-362
252. Luo Y, Bolon B, Kahn S, Bennett BD, Babu-Khan S, Denis P, Fan W, Kha H, Zhang J, Gong Y, Martin L, Louis JC, Yan Q, Richards WG, Citron M, Vassar R (2001) Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nature neuroscience* 4:231-232
253. Ma D, Doi Y, Jin S, Li E, Sonobe Y, Takeuchi H, Mizuno T, Suzumura A (2012) TGF- β induced by interleukin-34-stimulated microglia regulates microglial proliferation and attenuates oligomeric amyloid β neurotoxicity. *Neuroscience letters* 529:86-91
254. MacLaughlin J, Holick MF (1985) Aging decreases the capacity of human skin to produce vitamin D₃. *J Clin Invest* 76:1536-1538

255. Madani R, Poirier R, Wolfer DP, Welzl H, Groscurth P, Lipp H-P, Lu B, El Mouedden M, Mercken M, Nitsch RM, Mohajeri MH (2006) Lack of neprilysin suffices to generate murine amyloid-like deposits in the brain and behavioral deficit in vivo. *Journal of neuroscience research* 84:1871-1878
256. Marini F, Bartoccini E, Cascianelli G, Voccoli V, Baviglia MG, Magni MV, Garcia-Gil M, Albi E (2010) Effect of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ in embryonic hippocampal cells. *Hippocampus* 20:696-705
257. Markesbery WR (1997) Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free radical biology & medicine* 23:134-147
258. Masoumi A, Goldenson B, Ghirmai S, Avagyan H, Zaghi J, Abel K, Zheng X, Espinosa-Jeffrey A, Mahanian M, Liu PT, Hewison M, Mizwickie M, Cashman J, Fiala M (2009) 1alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ interacts with curcuminoids to stimulate amyloid-beta clearance by macrophages of Alzheimer's disease patients. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 17:703-717
259. Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K (1985) Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:4245-4249
260. Mathiasen IS, Hansen CM, Foghsgaard L, Jäätelä M (2001) Sensitization to TNF-induced apoptosis by 1,25-dihydroxy vitamin D(3) involves up-regulation of the TNF receptor 1 and cathepsin B. *International journal of cancer Journal international du cancer* 93:224-231
261. Matsue M, Kageyama R, Denhardt DT, Noda M (1997) Helix-loop-helix-type transcription factor (HES-1) is expressed in osteoblastic cells, suppressed by 1,25(OH)₂ vitamin D₃, and modulates 1,25(OH)₂ vitamin D₃ enhancement of osteopontin gene expression. *Bone* 20:329-334
262. Matthews V, Schuster B, Schütze S, Bussmeyer I, Ludwig A, Hundhausen C, Sadowski T, Saftig P, Hartmann D, Kallen K-J, Rose-John S (2003) Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE). *The Journal of biological chemistry* 278:38829-38839
263. Mattson MP, Guo ZH, Geiger JD (1999) Secreted form of amyloid precursor protein enhances basal glucose and glutamate transport and protects against oxidative impairment of glucose and glutamate transport in synaptosomes by a cyclic GMP-mediated mechanism. *Journal of neurochemistry* 73:532-537
264. Mawer EB, Backhouse J, Holman CA, Lumb GA, Stanbury SW (1972) The distribution and storage of vitamin D and its metabolites in human tissues. *Clinical science* 43:413-431
265. Mawuenyega KG, Sigurdson W, Ovod V, Munsell L, Kasten T, Morris JC, Yarasheski KE, Bateman RJ (2010) Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science* 330:1774
266. Max D, Brandsch C, Schumann S, Kühne H, Frommhagen M, Schutkowski A, Hirche F, Staeger MS, Stangl GI (2013) Maternal vitamin D deficiency causes smaller muscle fibers and altered transcript levels of genes involved in protein degradation, myogenesis, and cytoskeleton organization in the newborn rat. *Molecular nutrition & food research*
267. Mazzaferro S, Goldsmith D, Larsson TE, Massy ZA, Cozzolino M (2014) Vitamin D metabolites and/or analogs: which D for which patient? *Current vascular pharmacology* 12:339-349
268. McGrath J, Scragg R, Chant D, Eyles D, Burne T, Obradovic D (2007) No association between serum 25-hydroxyvitamin D₃ level and performance on psychometric tests in NHANES III. *Neuroepidemiology* 29:49-54

269. Merchiers P, Bulens F, Stockmans I, De Vriese A, Convents R, Bouillon R, Collen D, Belayew A, Carmeliet G (1999) 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) induction of the tissue-type plasminogen activator gene is mediated through its multihormone-responsive enhancer. *FEBS letters* 460:289-296
270. Mesulam M, Shaw P, Mash D, Weintraub S (2004) Cholinergic nucleus basalis tauopathy emerges early in the aging-MCI-AD continuum. *Annals of neurology* 55:815-828
271. Meziane H, Dodart JC, Mathis C, Little S, Clemens J, Paul SM, Ungerer A (1998) Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:12683-12688
272. Michaelson DM (2014) APOE ϵ 4: the most prevalent yet understudied risk factor for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 10:861-868
273. Miller BC, Eckman EA, Sambamurti K, Dobbs N, Chow KM, Eckman CB, Hersh LB, Thiele DL (2003) Amyloid-beta peptide levels in brain are inversely correlated with insulin activity levels in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:6221-6226
274. Miller BJ, Whisner CM, Johnston CS (2016) Vitamin D Supplementation Appears to Increase Plasma A β 40 in Vitamin D Insufficient Older Adults: A Pilot Randomized Controlled Trial. *Journal of Alzheimer's Disease* 52:843-847
275. Miners JS, Baig S, Palmer J, Palmer LE, Kehoe PG, Love S (2008a) Abeta-degrading enzymes in Alzheimer's disease. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 18:240-252
276. Miners JS, Kehoe PG, Love S (2008b) Immunocapture-based fluorometric assay for the measurement of insulin-degrading enzyme activity in brain tissue homogenates. *J Neurosci Methods* 169:177-181
277. Miners JS, Verbeek MM, Rikkert MO, Kehoe PG, Love S (2008c) Immunocapture-based fluorometric assay for the measurement of neprilysin-specific enzyme activity in brain tissue homogenates and cerebrospinal fluid. *Journal of neuroscience methods* 167:229-236
278. Mizuno T, Doi Y, Mizoguchi H, Jin S, Noda M, Sonobe Y, Takeuchi H, Suzumura A (2011) Interleukin-34 selectively enhances the neuroprotective effects of microglia to attenuate oligomeric amyloid- β neurotoxicity. *The American journal of pathology* 179:2016-2027
279. Mizwicki MT, Liu G, Fiala M, Magpantay L, Sayre J, Siani A, Mahanian M, Weitzman R, Hayden EY, Rosenthal MJ, Nemere I, Ringman J, Teplow DB (2013) 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 and resolvin D1 retune the balance between amyloid- β phagocytosis and inflammation in Alzheimer's disease patients. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 34:155-170
280. Mokry LE, Ross S, Morris JA, Manousaki D, Forgetta V, Richards JB (2016) Genetically decreased vitamin D and risk of Alzheimer disease. *Neurology* 87:2567-2574
281. Mook ORF, Frederiks WM, Van Noorden CJF (2004) The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochimica et biophysica acta* 1705:69-89
282. Moon M, Song H, Hong HJ, Nam DW, Cha MY, Oh MS, Yu J, Ryu H, Mook-Jung I (2013) Vitamin D-binding protein interacts with A β and suppresses A β -mediated pathology. *Cell death and differentiation* 20:630-638
283. Moore DD, Kato S, Xie W, Mangelsdorf DJ, Schmidt DR, Xiao R, Kliewer SA (2006) International Union of Pharmacology. LXII. The NR1H and NR1I receptors: constitutive androstane receptor, pregnane X receptor, farnesoid X receptor alpha, farnesoid X receptor beta, liver X receptor alpha, liver X receptor beta, and vitamin D receptor. *Pharmacological reviews* 58:742-759

284. Moss ML, Jin SL, Milla ME, Bickett DM, Burkhart W, Carter HL, Chen WJ, Clay WC, Didsbury JR, Hassler D, Hoffman CR, Kost TA, Lambert MH, Leesnitzer MA, McCauley P, McGeehan G, Mitchell J, Moyer M, Pahel G, Rocque W, Overton LK, Schoenen F, Seaton T, Su JL, Becherer JD (1997) Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature* 385:733-736
285. Mueller-Steiner S, Zhou Y, Arai H, Roberson ED, Sun B, Chen J, Wang X, Yu G, Esposito L, Mucke L, Gan L (2006) Anti-amyloidogenic and neuroprotective functions of cathepsin B: implications for Alzheimer's disease. *Neuron* 51:703-714
286. Muir EM, Adcock KH, Morgenstern DA, Clayton R, von Stillfried N, Rhodes K, Ellis C, Fawcett JW, Rogers JH (2002) Matrix metalloproteases and their inhibitors are produced by overlapping populations of activated astrocytes. *Brain research Molecular brain research* 100:103-117
287. Muller L, Barret A, Etienne E, Meidan R, Valdenaire O, Corvol P, Tougaard C (2003) Heterodimerization of endothelin-converting enzyme-1 isoforms regulates the subcellular distribution of this metalloprotease. *The Journal of biological chemistry* 278:545-555
288. Murayama O, Tomita T, Nihonmatsu N, Murayama M, Sun X, Honda T, Iwatsubo T, Takashima A (1999) Enhancement of amyloid beta 42 secretion by 28 different presenilin 1 mutations of familial Alzheimer's disease. *Neuroscience letters* 265:61-63
289. Murphy G, Atkinson S, Ward R, Gavrilovic J, Reynolds JJ (1992) The role of plasminogen activators in the regulation of connective tissue metalloproteinases. *Annals of the New York Academy of Sciences* 667:1-12
290. Naveilhan P, Neveu I, Baudet C, Ohyama KY, Brachet P, Wion D (1993) Expression of 25(OH) vitamin D3 24-hydroxylase gene in glial cells. *Neuroreport* 5:255-257
291. Nelson CD, Powell JL, Price DM, Hersom MJ, Yelich JV, Drewnoski ME, Bird SL, Bridges GA (2016) Assessment of serum 25-hydroxyvitamin D concentrations of beef cows and calves across seasons and geographical locations. *Journal of Animal Science* 94:3958-3958
292. Nemere I, Norman AW (1987) Rapid action of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on calcium transport in perfused chick duodenum: effect of inhibitors. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2:99-107
293. Neveu I, Naveilhan P, Mena C, Wion D, Brachet P, Garabédian M (1994) Synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D3 by rat brain macrophages in vitro. *Journal of neuroscience research* 38:214-220
294. Nikolaev A, McLaughlin T, O'Leary DD, Tessier-Lavigne M (2009) APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature* 457:981-989
295. Norval M, Wulf HC (2009) Does chronic sunscreen use reduce vitamin D production to insufficient levels? *The British journal of dermatology* 161:732-736
296. Nykjaer A, Dragun D, Walther D, Vorum H, Jacobsen C, Herz J, Melsen F, Christensen EI, Willnow TE (1999) An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D3. *Cell* 96:507-515
297. Okano T, Yasumura M, Mizuno K, Kobayashi T (1977) Photochemical conversion of 7-dehydrocholesterol into vitamin D3 in rat skins. *Journal of nutritional science and vitaminology* 23:165-168
298. Olsson E, Byberg L, Karlström B, Cederholm T, Melhus H, Sjögren P, Kilander L (2017) Vitamin D is not associated with incident dementia or cognitive impairment: an 18-y follow-up study in community-living old men. *The American journal of clinical nutrition* 105:936-943

299. Omdahl JL, Gray RW, Boyle IT, Knutson J, DeLuca HF (1972) Regulation of metabolism of 25-hydroxycholecalciferol by kidney tissue in vitro by dietary calcium. *Nature: New biology* 237:63-64
300. Omdahl JL, Morris HA, May BK (2002) Hydroxylase enzymes of the vitamin D pathway: expression, function, and regulation. *Annual review of nutrition* 22:139-166
301. Orzechowski HD, Günther A, Menzel S, Funke-Kaiser H, Richter M, Bohnemeier H, Paul M (1998) Endothelial expression of endothelin-converting enzyme-1 beta mRNA is regulated by the transcription factor Ets-1. *Journal of cardiovascular pharmacology* 31 Suppl 1:S55-57
302. Orzechowski HD, Günther A, Menzel S, Zimmermann A, Funke-Kaiser H, Real R, Subkowski T, Zollmann FS, Paul M (2001) Transcriptional mechanism of protein kinase C-induced isoform-specific expression of the gene for endothelin-converting enzyme-1 in human endothelial cells. *Molecular pharmacology* 60:1332-1342
303. Ott A, Breteler MMB, van Harskamp F, Claus JJ, van der Cammen TJM, Grobbee DE, Hofman A (1995) Prevalence of Alzheimer's disease and vascular dementia: association with education. The Rotterdam study. *BMJ* 310:970-973
304. Pacheco-Quinto J, Eckman EA (2013) Endothelin-converting enzymes degrade intracellular β -amyloid produced within the endosomal/lysosomal pathway and autophagosomes. *The Journal of biological chemistry* 288:5606-5615
305. Pagenstecher A, Stalder AK, Kincaid CL, Shapiro SD, Campbell IL (1998) Differential expression of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase genes in the mouse central nervous system in normal and inflammatory states. *Am J Pathol* 152:729-741
306. Pardossi-Piquard R, Petit A, Kawarai T, Sunyach C, Alves da Costa C, Vincent B, Ring S, D'Adamio L, Shen J, Müller U, St George Hyslop P, Checler F (2005) Presenilin-dependent transcriptional control of the Abeta-degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of betaAPP and APLP. *Neuron* 46:541-554
307. Pardridge WM, Sakiyama R, Coty WA (1985) Restricted transport of vitamin D and A derivatives through the rat blood-brain barrier. *Journal of neurochemistry* 44:1138-1141
308. Parikh SJ, Edelman M, Uwaifo GI, Freedman RJ, Semega-Janneh M, Reynolds J, Yanovski JA (2004) The relationship between obesity and serum 1,25-dihydroxy vitamin D concentrations in healthy adults. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 89:1196-1199
309. Pierucci F, Garcia-Gil M, Frati A, Bini F, Martinesi M, Vannini E, Mainardi M, Luzzati F, Peretto P, Caleo M, Meacci E (2017) Vitamin D3 protects against A β peptide cytotoxicity in differentiated human neuroblastoma SH-SY5Y cells: A role for S1P1/p38MAPK/ATF4 axis. *Neuropharmacology* 116:328-342
310. Porteu F, Nathan C (1990) Shedding of tumor necrosis factor receptors by activated human neutrophils. *J Exp Med* 172:599-607
311. Postina R, Schroeder A, Dewachter I, Bohl J, Schmitt U, Kojro E, Prinzen C, Endres K, Hiemke C, Blessing M, Flamez P, Dequenue A, Godaux E, van Leuven F, Fahrenholz F (2004) A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest* 113:1456-1464
312. Prince M, Bryce R, Albanese E, Wimo A, Ribeiro W, Ferri CP (2013) The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 9:63-75.e62
313. Prince M, Comas-Herrera MA, Knapp M, Guerchet M, Karagiannidou MM (2016) World Alzheimer Report 2016 Improving healthcare for people living with dementia coverage, Quality and costs now and In the future.

314. Prüfer K, Veenstra TD, Jirikowski GF, Kumar R (1999) Distribution of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor immunoreactivity in the rat brain and spinal cord. *Journal of chemical neuroanatomy* 16:135-145
315. Qing H, Zhou W, Christensen MA, Sun X, Tong Y, Song W (2004) Degradation of BACE by the ubiquitin-proteasome pathway. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18:1571-1573
316. Qiu WQ, Ye Z, Kholodenko D, Seubert P, Selkoe DJ (1997) Degradation of amyloid beta-protein by a metalloprotease secreted by microglia and other neural and non-neural cells. *The Journal of biological chemistry* 272:6641-6646
317. Qiu WQ, Walsh DM, Ye Z, Vekrellis K, Zhang J, Podlisny MB, Rosner MR, Safavi A, Hersh LB, Selkoe DJ (1998) Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. *The Journal of biological chemistry* 273:32730-32738
318. Raha S, Lee HJ, Yumnam S, Hong GE, Venkatarama Gowda Saralamma V, Ha YL, Kim JO, Kim YS, Heo JD, Lee SJ, Kim E-H, Kim GS (2016) Vitamin D₂ suppresses amyloid- β 25–35 induced microglial activation in BV2 cells by blocking the NF- κ B inflammatory signaling pathway. *Life Sciences* 161:37-44
319. Rahman A, Hershey S, Ahmed S, Nibbelink K, Simpson RU (2007) Heart extracellular matrix gene expression profile in the vitamin D receptor knockout mice. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 103:416-419
320. Ramji DP, Foka P (2002) CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J* 365:561-575
321. Reddy P, Slack JL, Davis R, Cerretti DP, Kozlosky CJ, Blanton RA, Shows D, Peschon JJ, Black RA (2000) Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *The Journal of biological chemistry* 275:14608-14614
322. Reichrath J (2009) Skin cancer prevention and UV-protection: how to avoid vitamin D-deficiency? *The British journal of dermatology* 161 Suppl:54-60
323. Reiser J, Adair B, Reinheckel T (2010) Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease. *J Clin Invest* 120:3421-3431
324. Renbaum P, Levy-Lahad E (1998) Monogenic determinants of familial Alzheimer's disease: presenilin-2 mutations. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 54:910-919
325. Ring S, Weyer SW, Kilian SB, Waldron E, Pietrzik CU, Filippov Ma, Herms J, Buchholz C, Eckman CB, Korte M, Wolfer DP, Müller UC (2007) The secreted beta-amyloid precursor protein ectodomain APPs alpha is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:7817-7826
326. Roberds SL, Anderson J, Basi G, Bienkowski MJ, Branstetter DG, Chen KS, Freedman SB, Frigon NL, Games D, Hu K, Johnson-Wood K, Kappenman KE, Kawabe TT, Kola I, Kuehn R, Lee M, Liu W, Motter R, Nichols NF, Power M, Robertson DW, Schenk D, Schoor M, Shopp GM, Shuck ME, Sinha S, Svensson KA, Tatsuno G, Tintrop H, Wijsman J, Wright S, McConlogue L (2001) BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary beta-secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics. *Human molecular genetics* 10:1317-1324
327. Roher AE, Kasunic TC, Woods AS, Cotter RJ, Ball MJ, Fridman R (1994) Proteolysis of A beta peptide from Alzheimer disease brain by gelatinase A. *Biochemical and biophysical research communications* 205:1755-1761

328. Rose-John S, Scheller J, Elson G, Jones SA (2006) Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *Journal of leukocyte biology* 80:227-236
329. Rosen CJ (2011) Clinical practice. Vitamin D insufficiency. *The New England journal of medicine* 364:248-254
330. Rosenstreich SJ, Rich C, Volwiler W (1971) Deposition in and release of vitamin D₃ from body fat: evidence for a storage site in the rat. *J Clin Invest* 50:679-687
331. Rothhaar TL, Grösgen S, Hauptenthal VJ, Burg VK, Hundsdörfer B, Mett J, Riemenschneider M, Grimm HS, Hartmann T, Grimm MOW (2012) Plasmalogens inhibit APP processing by directly affecting γ -secretase activity in Alzheimer's disease. *TheScientificWorldJournal* 2012:141240-141240
332. Rungby J, Mosekilde L, Poulsen JH (1990) Evidence for a long-term storage of calcitriol in a patient with 1-alpha hydroxylase deficiency and rickets. *Acta endocrinologica* 123:383-384
333. Rungby J, Mortensen L, Jakobsen K, Brock A, Mosekilde L (1993) Distribution of hydroxylated vitamin D metabolites [25OHD₃ and 1,25(OH)₂D₃] in domestic pigs: evidence that 1,25(OH)₂D₃ is stored outside the blood circulation? *Comparative biochemistry and physiology Comparative physiology* 104:483-484
334. Rusanen M, Kivipelto M, Quesenberry CP, Zhou J, Whitmer RA (2011) Heavy smoking in midlife and long-term risk of Alzheimer disease and vascular dementia. *Archives of internal medicine* 171:333-339
335. Russo R, Borghi R, Markesbery W, Tabaton M, Piccini A (2005) Neprylisin decreases uniformly in Alzheimer's disease and in normal aging. *FEBS letters* 579:6027-6030
336. Saito A, Pietromonaco S, Loo AK, Farquhar MG (1994) Complete cloning and sequencing of rat gp330/"megalin," a distinctive member of the low density lipoprotein receptor gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:9725-9729
337. Santiago-Josefat B, Esselens C, Bech-Serra JJ, Arribas J (2007) Post-transcriptional up-regulation of ADAM17 upon epidermal growth factor receptor activation and in breast tumors. *The Journal of biological chemistry* 282:8325-8331
338. Sato Y, Asoh T, Oizumi K (1998) High prevalence of vitamin D deficiency and reduced bone mass in elderly women with Alzheimer's disease. *Bone* 23:555-557
339. Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Crapper-MacLachlan DR, Alberts MJ (1993) Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 43:1467-1472
340. Sbai O, Ferhat L, Bernard A, Gueye Y, Ould-Yahoui A, Thiolloy S, Charrat E, Charton G, Tremblay E, Risso J-J, Chauvin J-P, Arsanto J-P, Rivera S, Khrestchatisky M (2008) Vesicular trafficking and secretion of matrix metalloproteinases-2, -9 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in neuronal cells. *Molecular and cellular neurosciences* 39:549-568
341. Sbai O, Ould-Yahoui A, Ferhat L, Gueye Y, Bernard A, Charrat E, Mehanna A, Risso J-J, Chauvin J-P, Fenouillet E, Rivera S, Khrestchatisky M (2010) Differential vesicular distribution and trafficking of MMP-2, MMP-9, and their inhibitors in astrocytes. *Glia* 58:344-366
342. Schagger H, von Jagow G (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical biochemistry* 166:368-379
343. Schönheit B, Zarski R, Ohm TG (2004) Spatial and temporal relationships between plaques and tangles in Alzheimer-pathology. *Neurobiology of aging* 25:697-711

344. Schott JM, Price SL, Frost C, Whitwell JL, Rossor MN, Fox NC (2005) Measuring atrophy in Alzheimer disease: a serial MRI study over 6 and 12 months. *Neurology* 65:119-124
345. Schweizer A, Valdenaire O, Nelbock P, Deuschle U, Dumas Milne Edwards JB, Stumpf JG, Loffler BM (1997) Human endothelin-converting enzyme (ECE-1): three isoforms with distinct subcellular localizations. *Biochem J* 328 (Pt 3):871-877
346. Seamans KM, Hill TR, Scully L, Meunier N, Andrillo-Sanchez M, Polito A, Hininger-Favier I, Ciarapica D, Simpson EEA, Stewart-Knox BJ, O'Connor JM, Coudray C, Cashman KD (2010) Vitamin D status and measures of cognitive function in healthy older European adults. *European journal of clinical nutrition* 64:1172-1178
347. Shah S, Lee S-F, Tabuchi K, Hao Y-H, Yu C, LaPlant Q, Ball H, Dann CE, Südhof T, Yu G (2005) Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor. *Cell* 122:435-447
348. Shirotani K, Tsubuki S, Iwata N, Takaki Y, Harigaya W, Maruyama K, Kiryu-Seo S, Kiyama H, Iwata H, Tomita T, Iwatsubo T, Saido TC (2001) Neprilysin degrades both amyloid beta peptides 1-40 and 1-42 most rapidly and efficiently among thiorphan- and phosphoramidon-sensitive endopeptidases. *The Journal of biological chemistry* 276:21895-21901
349. Simboli-Campbell M, Narvaez CJ, Tenniswood M, Welsh J (1996) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces morphological and biochemical markers of apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 58:367-376
350. Simboli-Campbell M, Narvaez CJ, van Weelden K, Tenniswood M, Welsh J (1997) Comparative effects of 1,25(OH)2D3 and EB1089 on cell cycle kinetics and apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *Breast cancer research and treatment* 42:31-41
351. Smith AI, Lew RA, Thomas WG, Tochon-Danguy N (2006) Protein Kinase C Regulates the Cell Surface Activity of Endothelin-Converting Enzyme-1. *Int J Pept Res Ther* 12:291-295
352. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry* 150:76-85
353. Solomon A, Kivipelto M, Wolozin B, Zhou J, Whitmer RA (2009) Midlife serum cholesterol and increased risk of Alzheimer's and vascular dementia three decades later. *Dementia and geriatric cognitive disorders* 28:75-80
354. Solomon KA, Pesti N, Wu G, Newton RC (1999) Cutting edge: a dominant negative form of TNF-alpha converting enzyme inhibits proTNF and TNFRII secretion. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 163:4105-4108
355. St George-Hyslop P (2000) Alzheimer's disease. *Neurobiology of disease* 7:546-548
356. Stephens DJ, Austen BM (1996) Metabolites of the beta-amyloid precursor protein generated by beta-secretase localise to the trans-Golgi network and late endosome in 293 cells. *Journal of neuroscience research* 46:211-225
357. Sun J, Kong J, Duan Y, Szeto FL, Liao A, Madara JL, Li YC (2006) Increased NF-kappaB activity in fibroblasts lacking the vitamin D receptor. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 291:E315-322
358. Sun ZX, Zhou QH, Sui SF (2005) Cholesterol depletion inhibits the degradation of amyloid beta-peptide in rat pheochromocytoma (PC12) cells. *Neurosci Lett* 391:71-75
359. Sundar IK, Hwang JW, Wu S, Sun J, Rahman I (2011) Deletion of vitamin D receptor leads to premature emphysema/COPD by increased matrix metalloproteinases and lymphoid aggregates formation. *Biochem Biophys Res Commun* 406:127-133

360. Taghizadeh M, Djazayeri A, Salami M, Eshraghian MR, Zavareh SAT (2011) Vitamin-D-free regimen intensifies the spatial learning deficit in Alzheimer's disease. *The International journal of neuroscience* 121:16-24
361. Taghizadeh M, Talaei SA, Djazayeri A, Salami M (2013) Vitamin D supplementation restores suppressed synaptic plasticity in Alzheimer's disease. *Nutritional neuroscience*
362. Tamaoka A, Sawamura N, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Shoji S, Mori H (1995) Amyloid beta protein 1-42/43 (A beta 1-42/43) in cerebellar diffuse plaques: enzyme-linked immunosorbent assay and immunocytochemical study. *Brain research* 679:151-156
363. Taniura H, Ito M, Sanada N, Kuramoto N, Ohno Y, Nakamichi N, Yoneda Y (2006) Chronic vitamin D3 treatment protects against neurotoxicity by glutamate in association with upregulation of vitamin D receptor mRNA expression in cultured rat cortical neurons. *Journal of neuroscience research* 83:1179-1189
364. Terry RD (1995) Biologic differences between early- and late-onset Alzheimer disease. *Alzheimer disease and associated disorders* 9 Suppl 1:S26-27
365. Tesco G, Koh YH, Kang EL, Cameron AN, Das S, Sena-Esteves M, Hiltunen M, Yang SH, Zhong Z, Shen Y, Simpkins JW, Tanzi RE (2007) Depletion of GGA3 stabilizes BACE and enhances beta-secretase activity. *Neuron* 54:721-737
366. Thinakaran G, Teplow DB, Siman R, Greenberg B, Sisodia SS (1996) Metabolism of the "Swedish" amyloid precursor protein variant in neuro2a (N2a) cells. Evidence that cleavage at the "beta-secretase" site occurs in the golgi apparatus. *The Journal of biological chemistry* 271:9390-9397
367. Tippmann F, Hundt J, Schneider A, Endres K, Fahrenholz F (2009) Up-regulation of the alpha-secretase ADAM10 by retinoic acid receptors and acitretin. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23:1643-1654
368. Tolppanen A-M, Williams DM, Lawlor DA (2011) The association of serum ionized calcium and vitamin D with adult cognitive performance. *Epidemiology (Cambridge, Mass)* 22:113-117
369. Tucker HM, Kihiko M, Caldwell JN, Wright S, Kawarabayashi T, Price D, Walker D, Scheff S, McGillis JP, Rydel RE, Estus S (2000) The plasmin system is induced by and degrades amyloid-beta aggregates. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:3937-3946
370. Tunsophon S, Nemere I (2010) Protein kinase C isoforms in signal transduction for the 1,25D3-MARRS receptor (ERp57/PDIA3) in steroid hormone-stimulated phosphate uptake. *Steroids* 75:307-313
371. Uchida K, Uchida S, Nitta K, Yumura W, Nihei H (1997) Regulated expression of endothelin converting enzymes in glomerular endothelial cells. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 8:580-585
372. Ulstein I, Bøhmer T (2016) Normal Vitamin Levels and Nutritional Indices in Alzheimer's Disease Patients with Mild Cognitive Impairment or Dementia with Normal Body Mass Indexes. *Journal of Alzheimer's Disease* 55:717-725
373. Vagelatos NT, Eslick GD (2013) Type 2 diabetes as a risk factor for Alzheimer's disease: the confounders, interactions, and neuropathology associated with this relationship. *Epidemiologic reviews* 35:152-160
374. van der Schaft J, Koek HL, Dijkstra E, Verhaar HJJ, van der Schouw YT, Emmelot-Vonk MH (2013) The association between vitamin D and cognition: a systematic review. *Ageing research reviews* 12:1013-1023
375. van Leeuwen FW, de Kleijn DP, van den Hurk HH, Neubauer A, Sonnemans MA, Sluijs JA, Köycü S, Ramdjielal RD, Salehi A, Martens GJ, Grosveld FG, Peter J,

- Burbach H, Hol EM (1998) Frameshift mutants of beta amyloid precursor protein and ubiquitin-B in Alzheimer's and Down patients. *Science (New York, NY)* 279:242-247
376. Veenstra TD, Prüfer K, Koenigsberger C, Brimijoin SW, Grande JP, Kumar R (1998) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 receptors in the central nervous system of the rat embryo. *Brain research* 804:193-205
377. Vekrellis K, Ye Z, Qiu WQ, Walsh D, Hartley D, Chesneau V, Rosner MR, Selkoe DJ (2000) Neurons regulate extracellular levels of amyloid beta-protein via proteolysis by insulin-degrading enzyme. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:1657-1665
378. Vincenti MP, Brinckerhoff CE (2007) Signal transduction and cell-type specific regulation of matrix metalloproteinase gene expression: can MMPs be good for you? *Journal of cellular physiology* 213:355-364
379. Walbert T, Jirikowski GF, Prüfer K (2001) Distribution of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor immunoreactivity in the limbic system of the rat. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme* 33:525-531
380. Wang D-S, Iwata N, Hama E, Saido TC, Dickson DW (2003) Oxidized neprilysin in aging and Alzheimer's disease brains. *Biochemical and biophysical research communications* 310:236-241
381. Wang D-S, Lipton RB, Katz MJ, Davies P, Buschke H, Kuslansky G, Verghese J, Younkin SG, Eckman C, Dickson DW (2005) Decreased neprilysin immunoreactivity in Alzheimer disease, but not in pathological aging. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 64:378-385
382. Wang L, Hara K, Van Baaren JM, Price JC, Beecham GW, Gallins PJ, Whitehead PL, Wang G, Lu C, Slifer Ma, Züchner S, Martin ER, Mash D, Haines JL, Pericak-Vance Ma, Gilbert JR (2012) Vitamin D receptor and Alzheimer's disease: a genetic and functional study. *Neurobiology of aging* 33:1844.e1841-1849
383. Webb AR, Kline L, Holick MF (1988) Influence of season and latitude on the cutaneous synthesis of vitamin D3: exposure to winter sunlight in Boston and Edmonton will not promote vitamin D3 synthesis in human skin. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 67:373-378
384. Wicher G, Larsson M, Fex Svenningsen A, Gyllencreutz E, Rask L, Aldskogius H (2006) Low density lipoprotein receptor-related protein-2/megalin is expressed in oligodendrocytes in the mouse spinal cord white matter. *Journal of neuroscience research* 83:864-873
385. Willem M, Garratt AN, Novak B, Citron M, Kaufmann S, Rittger A, DeStrooper B, Saftig P, Birchmeier C, Haass C (2006) Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1. *Science (New York, NY)* 314:664-666
386. Won S, Sayeed I, Peterson BL, Wali B, Kahn JS, Stein DG (2015) Vitamin D prevents hypoxia/reoxygenation-induced blood-brain barrier disruption via vitamin D receptor-mediated NF-kB signaling pathways. *PLoS One* 10:e0122821
387. Wood JA, Wood PL, Ryan R, Graff-Radford NR, Pilapil C, Robitaille Y, Quirion R (1993) Cytokine indices in Alzheimer's temporal cortex: no changes in mature IL-1 beta or IL-1RA but increases in the associated acute phase proteins IL-6, alpha 2-macroglobulin and C-reactive protein. *Brain research* 629:245-252
388. Wu S, Liao AP, Xia Y, Li YC, Li JD, Sartor RB, Sun J (2010a) Vitamin D receptor negatively regulates bacterial-stimulated NF-kappaB activity in intestine. *Am J Pathol* 177:686-697
389. Wu S, Xia Y, Liu X, Sun J (2010b) Vitamin D receptor deletion leads to reduced level of IkappaBalpha protein through protein translation, protein-protein interaction, and post-translational modification. *Int J Biochem Cell Biol* 42:329-336

390. Yamada T, Sasaki H, Furuya H, Miyata T, Goto I, Sakaki Y (1987) Complementary DNA for the mouse homolog of the human amyloid beta protein precursor. *Biochemical and biophysical research communications* 149:665-671
391. Yamamoto N, Shibata M, Ishikuro R, Tanida M, Taniguchi Y, Ikeda-Matsuo Y, Sobue K (2017) Epigallocatechin gallate induces extracellular degradation of amyloid β -protein by increasing neprilysin secretion from astrocytes through activation of ERK and PI3K pathways. *Neuroscience* 362:70-78
392. Yan P, Hu X, Song H, Yin K, Bateman RJ, Cirrito JR, Xiao Q, Hsu FF, Turk JW, Xu J, Hsu CY, Holtzman DM, Lee J-M (2006) Matrix metalloproteinase-9 degrades amyloid-beta fibrils in vitro and compact plaques in situ. *The Journal of biological chemistry* 281:24566-24574
393. Yan R, Bienkowski MJ, Shuck ME, Miao H, Tory MC, Pauley AM, Brashier JR, Stratman NC, Mathews WR, Buhl AE, Carter DB, Tomasselli AG, Parodi LA, Heinrikson RL, Gurney ME (1999) Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature* 402:533-537
394. Yan R (2016) Stepping closer to treating Alzheimer's disease patients with BACE1 inhibitor drugs. *Translational Neurodegeneration* 5:13-13
395. Yang WS, Yu H, Kim JJ, Lee MJ, Park S-K (2016) Vitamin D-induced ectodomain shedding of TNF receptor 1 as a nongenomic action: D3 vs D2 derivatives. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 155:18-25
396. Yasojima K, Akiyama H, McGeer EG, McGeer PL (2001) Reduced neprilysin in high plaque areas of Alzheimer brain: a possible relationship to deficient degradation of beta-amyloid peptide. *Neuroscience letters* 297:97-100
397. Yin K-J, Cirrito JR, Yan P, Hu X, Xiao Q, Pan X, Bateman R, Song H, Hsu F-F, Turk J, Xu J, Hsu CY, Mills JC, Holtzman DM, Lee J-M (2006) Matrix metalloproteinases expressed by astrocytes mediate extracellular amyloid-beta peptide catabolism. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:10939-10948
398. Younkin SG (1991) Processing of the Alzheimer's disease beta A4 amyloid protein precursor (APP). *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 1:253-262
399. Yu J, Gattoni-Celli M, Zhu H, Bhat NR, Sambamurti K, Gattoni-Celli S, Kindy MS (2011) Vitamin D3-enriched diet correlates with a decrease of amyloid plaques in the brain of A β PP transgenic mice. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 25:295-307
400. Zanatta L, Bouraïma-Lelong H, Delalande C, Silva FRMB, Carreau S (2011a) Regulation of aromatase expression by 1 α ,25(OH) $_2$ vitamin D3 in rat testicular cells. *Reproduction, fertility, and development* 23:725-735
401. Zanatta L, Zamoner A, Gonçalves R, Zanatta AP, Bouraïma-Lelong H, Carreau S, Silva FRMB (2011b) 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D(3) signaling pathways on calcium uptake in 30-day-old rat Sertoli cells. *Biochemistry* 50:10284-10292
402. Zehnder D, Bland R, Williams MC, McNinch RW, Howie AJ, Stewart PM, Hewison M (2001) Extrarenal expression of 25-hydroxyvitamin d(3)-1 alpha-hydroxylase. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 86:888-894
403. Zhang D, Li M, Dong Y, Zhang X, Liu X, Chen Z, Zhu Y, Wang H, Liu X, Zhu J, Shen Y, Korner H, Ying S, Fang S, Shen Y (2017) 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 up-regulates IL-34 expression in SH-SY5Y neural cells. *Innate Immunity* 23:584-591
404. Zhang M, Deng Y, Luo Y, Zhang S, Zou H, Cai F, Wada K, Song W (2012) Control of BACE1 degradation and APP processing by ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1. *Journal of neurochemistry* 120:1129-1138
405. Zhang Y, Hegen M, Xu J, Keith JC, Jin G, Du X, Cummons T, Sheppard BJ, Sun L, Zhu Y, Rao VR, Wang Q, Xu W, Cowling R, Nickerson-Nutter CL, Gibbons J, Skotnicki J, Lin L-L, Levin J (2004) Characterization of (2R, 3S)-2-([(4-(2-

- butynyloxy)phenyl]sulfonyl]amino)-N,3-dihydroxybutanamide, a potent and selective inhibitor of TNF-alpha converting enzyme. *International immunopharmacology* 4:1845-1857
406. Zhao J, Paganini L, Mucke L, Gordon M, Refolo L, Carman M, Sinha S, Oltersdorf T, Lieberburg I, McConlogue L (1996) Beta-secretase processing of the beta-amyloid precursor protein in transgenic mice is efficient in neurons but inefficient in astrocytes. *The Journal of biological chemistry* 271:31407-31411
407. Zhao J, Li L, Leissring MA (2009) Insulin-degrading enzyme is exported via an unconventional protein secretion pathway. *Mol Neurodegener* 4:4
408. Zheng G, Bachinsky DR, Stamenkovic I, Strickland DK, Brown D, Andres G, McCluskey RT (1994) Organ distribution in rats of two members of the low-density lipoprotein receptor gene family, gp330 and LRP/alpha 2MR, and the receptor-associated protein (RAP). *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 42:531-542
409. Zou K, Yamaguchi H, Akatsu H, Sakamoto T, Ko M, Mizoguchi K, Gong J-S, Yu W, Yamamoto T, Kosaka K, Yanagisawa K, Michikawa M (2007) Angiotensin-converting enzyme converts amyloid beta-protein 1-42 (Abeta(1-42)) to Abeta(1-40), and its inhibition enhances brain Abeta deposition. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:8628-8635
410. Zou Z, Chung B, Nguyen T, Mentone S, Thomson B, Biemesderfer D (2004) Linking receptor-mediated endocytosis and cell signaling: evidence for regulated intramembrane proteolysis of megalin in proximal tubule. *The Journal of biological chemistry* 279:34302-34310

Weblink:

- <http://imsieweb.uni-koeln.de/beratung/rechner/t2.html>
- <http://www.biosciencewriters.com/Guidelines-for-Formatting-Gene-and-Protein-Names.aspx>

7. Publikationen (*peer-reviewed*)

Die in dieser Arbeit dargelegten Ergebnisse wurden zum größten Teil in den folgenden Studien publiziert. Dies ist in den einzelnen Kapiteln in den Abbildungen angegeben (*verändert nach...*). An dieser Stelle möchte ich mich nochmals bei allen beteiligten Personen für die freundliche und kollegiale Zusammenarbeit bedanken.

1. Grimm MOW, Thiel A, Lauer AA, Winkler J, **Lehmann J**, Regner L, Nelke C, Janitschke D, Benoist C, Streidenberger O, Stötzel H, Endres K, Herr C, Beisswenger C, Grimm HS, Bals R, Lammert F, Hartmann T (2017) Vitamin D and Its Analogues Decrease Amyloid- β (A β) Formation and Increase A β -Degradation. *International journal of molecular sciences* 18:2764-2764

2. **Lehmann J***, Grimm MOW*, Mett J, Zimmer VC, Grösgen S, Stahlmann CP, Hundsdörfer B, Hauptenthal VJ, Rothhaar TL, Herr C, Bals R, Grimm HS, Hartmann T (2013) Impact of Vitamin D on Amyloid Precursor Protein Processing and Amyloid- β Peptide Degradation in Alzheimer's Disease. *Neuro-degenerative diseases*

- * contributed equally to this work

Poster:

Anna A. Lauer, Andrea Thiel, **Johannes Lehmann**, Christoph P. Stahlmann, Jakob Winkler, Liesa Regner, Christopher Nelke, Heike S. Grimm, Matthias Riemenschneider, Robert Bals, Tobias Hartmann, and Marcus O.W. Grimm (2017). Vitamin D and their analogues: A mechanistical link to Alzheimer's disease. *Lipids & Brain IV: Lipids in Alzheimer Disease*. Nancy, France.

Lehmann, J.*, Blümel, T.*, Mett, J., Zimmer, V.C., Grösgen, S., Stahlmann, C.P., Hundsdörfer, B., Hauptenthal, V.J., Rothhaar, T.L., Herr, C., Bals, R., Grimm, H.S., Grimm, M.O.*, and Hartmann, T.* (2015). Impact of vitamin D on amyloid precursor protein processing and amyloid- β peptide degradation in Alzheimer's disease. *Düsseldorf-Jülich Symposium on Neurodegenerative Diseases, Düsseldorf, Germany*

8. Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei allen Personen herzlichst bedanken, die entscheidend an der Entstehung und Fertigstellung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Bei meinem Doktorvater Professor Tobias Hartmann möchte ich mich an erster Stelle für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Schaffung des finanziellen Rahmens und das mir gegenüber erbrachte Vertrauen bedanken.

PD Dr. Marcus Grimm gilt mein besonderer Dank für die intensive Betreuung während meiner Zeit im Labor sowie für die Hilfestellungen und geduldigen Korrekturen bei der Verfassung dieser Arbeit. Es war zu jeder Zeit möglich methodische und inhaltliche Fragen zu stellen, welche durch ihn stets kompetent, freundlich und verständlich beantwortet wurden. Auch in schwierigen Situationen fand er immer die richtigen Worte, zeigte Lösungsvorschläge auf und motivierte zum Weitermachen.

Dr. Heike Grimm möchte ich insbesondere für die Erstellung der Manuskripte danken. Durch ihre langjährige Erfahrung war auch sie immer eine kompetente Ansprechpartnerin und stand einem mit Rat und Tat zur Seite.

Des Weiteren danke ich allen aktuellen und ehemaligen Mitdoktorandinnen und –doktoranden sowie Mitarbeitern der AG Hartmann – Dr. Verena Burg, Dr. Benjamin Hundsdörfer, Dr. Tatjana Rothhaar, Dr. Viola Hauptenthal, Dr. Sven Grösgen, Christoph Stahlmann, Valerie Zimmer, Inge Tomic, Tamara Blümel, Andrea Thiel, Jakob Winkler, Liesa Regner, Christopher Nelke, Daniel Janitschke, Celine Benoist, Olga Streidenberger und Hannah Stötzel. Besonders danken möchte ich Frau Dr. Janine Mett für die ausdauernde und freundliche Betreuung meiner praktischen Tätigkeiten im Labor. Auch Frau Anna Lauer gilt mein besonderer Dank, insbesondere für die sorgfältige Korrektur dieser Arbeit. Allen danke ich für die angenehme und kollegiale Zusammenarbeit und freundliche Arbeitsatmosphäre.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie für ihre uneingeschränkte Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Meiner langjährigen Freundin Valerie Zimmer danke ich für die vielen liebevollen und aufmunternden Worte während der gesamten Zeit und für ihren ständigen Rückhalt.