

Aus dem Bereich der Experimentellen Neurologie  
Der Medizinischen Fakultät  
Der Universität des Saarlandes, Homburg/ Saar

**Der Einfluss von Vitamin D und seinen Analoga auf die in der Alzheimer-Demenz  
relevante A $\beta$ -Homöostase**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2023**

Vorgelegt von Andrea Thiel  
Geboren am 15.02.1995 in Völklingen

Tag der Promotion: 15.12.2023

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Marcus O. W. Grimm

Prof. Dr. med. Jörg Reichrath

## **EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

### **gemäß §7 Abschnitt 1 Nummer 2 der Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Die im Kapitel Kooperationen aufgeführten Personen haben mir in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater/innen oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Außer den Angegebenen hat niemand von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Vor Aufnahme der vorstehenden Versicherung an Eides Statt wurde ich über die Bedeutung einer eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung belehrt.

Homburg, 21.07.2023

Andrea Thiel

# I. Inhaltsverzeichnis

<b>II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>VII</b>
<b>III. ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>XI</b>
<b>IV. TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>XII</b>
<b>V. KOOPERATIONSVERZEICHNIS</b>	<b>XIII</b>
<b>1 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
1.1 Der Einfluss von Vitamin D und seinen Analoga auf die in der Alzheimer-Demenz relevante A $\beta$ -Homöostase	1
1.2 The influence of vitamin D and its analogues on the A $\beta$ -homeostasis relevant in Alzheimer's disease	2
<b>2 EINLEITUNG</b>	<b>4</b>
2.1 Die Alzheimer-Demenz und aktuelle Therapiemöglichkeiten	4
2.1.1 Krankheitsbild und Epidemiologie	4
2.1.2 Biomolekulare und neuropathologische Mechanismen	5
2.1.2.1 <i>Tau-Pathologie</i>	5
2.1.2.2 <i>Amyloid-<math>\beta</math>-Pathologie</i>	6
2.1.2.3 <i>Neuroinflammation und Interleukin-1<math>\beta</math></i>	7
2.1.3 Diagnosestellung von Morbus Alzheimer	8
2.1.4 Aktuelle präventive und therapeutische Ansätze der Alzheimer-Demenz	9
2.2 Vitamin D und die Hypovitaminose D	12
2.2.1 Metabolismus und Funktion von Vitamin D	12
2.2.2 Entstehung, Häufigkeit und Folgen einer Hypovitaminose D	13
2.3 Vitamin D Supplementierung & synthetische Vitamin D Analoga	16
2.3.1 Vitamin D Zufuhr und Supplementierung bei Risikogruppen	16
2.3.2 Nebenwirkungen und Risiken einer Vitamin D Supplementierung	19
2.4 Fragestellung der Arbeit	20

<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODIK</b>	<b>21</b>
<b>3.1</b>	<b>Geräte</b>	<b>21</b>
<b>3.2</b>	<b>Chemikalien</b>	<b>23</b>
<b>3.3</b>	<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>26</b>
<b>3.4</b>	<b>Antikörper</b>	<b>27</b>
<b>3.5</b>	<b>Kits</b>	<b>28</b>
<b>3.6</b>	<b>Primer</b>	<b>28</b>
<b>3.7</b>	<b>Zelllinien</b>	<b>29</b>
<b>3.8</b>	<b>Murines Material</b>	<b>29</b>
3.8.1	Generierung einer Hypovitaminose D <sub>3</sub> im murinen Modell	30
3.8.2	Tötung der Mäuse und Präparation der Maushirne	30
<b>3.9</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b>	<b>31</b>
3.9.1	Kultivierung und Kryokonservierung eukaryotischer Zellen	31
3.9.2	Inkubation von Zellen mit Vitamin D Analoga	33
3.9.3	Zytotoxizitätsbestimmung mittels Laktatdehydrogenase-Test	34
<b>3.10</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden</b>	<b>34</b>
3.10.1	Probenverarbeitung	34
3.10.1.1	<i>Verarbeitung konditionierter Medien</i>	34
3.10.1.2	<i>Zellaufschluss</i>	35
3.10.1.3	<i>Herstellung von Homogenaten aus Gewebe</i>	35
3.10.1.4	<i>Generierung von postnukleären Fraktionen aus SH-SY5Y WT Zellen</i>	36
3.10.1.5	<i>Inkubation der Hirnhomogenate und der PNFs</i>	36
3.10.1.6	<i>Membranpräparation aus SH-SY5Y WT PNFs</i>	36
3.10.2	Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bicinchoninsäure - Test	36
3.10.3	A $\beta$ -Immunpräzipitation	37
3.10.4	Proteinauftrennung mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	38
3.10.5	Western Blot Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran	40
3.10.6	Immunologische Detektion der Proteine auf Nitrozellulosemembran	40
3.10.7	Visualisierung der Proteinbanden mittels Chemilumineszenzreaktion	41
3.10.8	Bestimmung der A $\beta$ <sub>40</sub> -Gesamtdegradation	42
3.10.8.1	<i>A<math>\beta</math><sub>40</sub>-Gesamtdegradation in vitro auf N2a-Zellen</i>	42
3.10.8.2	<i>A<math>\beta</math><sub>40</sub>-Gesamtdegradation ex vivo auf Maushirnhomogenaten</i>	42

3.10.9	Messung von Enzym Aktivitäten _____	43
3.10.9.1	Messung der $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ -Sekretase Aktivität auf metabolisch aktiven SH-SY5Y WT Zellen _____	44
3.10.9.2	Messung der $\beta$ -Sekretase Aktivität aus Hirnhomogenaten _____	44
3.10.9.3	Messung der $\beta$ -Sekretase Aktivität nach Membranpräparation _____	44
3.10.9.4	Analyse der NEP-Aktivität _____	45
3.10.9.5	IL-1 $\beta$ -Messung _____	46
<b>3.11</b>	<b>Molekularbiologische Methode _____</b>	<b>46</b>
3.11.1	Ribonukleinsäure-Isolation aus Zellen mittels TRIZol _____	46
3.11.2	Reinheits- und Konzentrationsbestimmung der Ribonukleinsäure _____	47
3.11.3	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure Synthese _____	48
3.11.4	Echtzeit-Polymerasekettenreaktion _____	48
<b>3.12</b>	<b>Statistische Datenauswertung _____</b>	<b>49</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE _____</b>	<b>51</b>
<b>4.1</b>	<b>Überprüfung der Inkubationsbedingungen _____</b>	<b>52</b>
<b>4.2</b>	<b>Einfluss der Vitamin D Analoga auf das A<math>\beta</math>-Gesamtlevel _____</b>	<b>54</b>
<b>4.3</b>	<b>Einfluss der Vitamin D Analoga auf den A<math>\beta</math>-Anabolismus _____</b>	<b>57</b>
4.3.1	Effekte der Vitamin D Analoga auf die Aktivität der $\beta$ -Sekretase in SH-SY5Y WT Zellen _____	57
4.3.2	Bestimmung der $\beta$ -Sekretase Aktivität in aus SH-SY5Y WT isolierten Membranen _____	59
4.3.3	Bestimmung des sAPP $\beta$ -Levels in SH-SY5Y WT Zellen _____	61
4.3.4	Bestimmung der $\beta$ -Sekretase Aktivität in Maushirnen nach Vitamin D Supplementierung _____	62
4.3.5	Bestimmung der $\beta$ -Sekretase Aktivität in Vitamin D unterversorgten Maushirnen _____	63
4.3.6	Messung der BACE1-Expression in SH-SY5Y WT Zellen _____	68
4.3.7	Bestimmung des BACE1-Proteinlevels nach Vitamin D Analoga Inkubation _____	70
4.3.8	Bestimmung der $\gamma$ -Sekretase Aktivität _____	72
4.3.9	Bestimmung der NCSTN-Genexpression _____	73

<b>4.4</b>	<b>Einfluss der Vitamin D Analoga auf die nicht amyloidogene APP-Prozessierung</b>	<b>75</b>
<b>4.5</b>	<b>Einfluss der Vitamin D Analoga auf den A<math>\beta</math>-Katabolismus</b>	<b>77</b>
4.5.1	A $\beta$ -Gesamtdegradation in N2a WT-Zellen nach Inkubation mit Vitamin D Analoga	77
4.5.2	A $\beta$ -Gesamtdegradation auf Vitamin D unterversorgten Maushirnen	79
4.5.3	Einflüsse der Vitamin D Analoga auf die NEP-Expression	81
4.5.4	Einflüsse der Vitamin D Analoga auf die Neprilysin Aktivität in SH-SY5Y WT Zellen	83
<b>4.6</b>	<b>Einfluss der Vitamin D Analoga auf inflammatorische Prozesse</b>	<b>84</b>
<b>4.7</b>	<b>Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse</b>	<b>87</b>
<b>4.8</b>	<b>Kooperationsprojekt: Expressionsanalyse Alzheimer-Demenz relevanter Gene bei bestehender Hypovitaminose D</b>	<b>89</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>92</b>
<b>5.1</b>	<b>Molekulare Wirkmechanismen der Vitamin D Analoga auf die A<math>\beta</math>-Homöostase</b>	<b>94</b>
5.1.1	Molekulare Wirkmechanismen der Vitamin D Analoga auf das Gesamt-A $\beta$	94
5.1.2	Molekulare Wirkmechanismen der Vitamin D Analoga auf die $\beta$ -Sekretase	97
5.1.3	Molekulare Wirkmechanismen der Vitamin D Analoga auf die $\gamma$ -Sekretase	101
5.1.4	Molekulare Wirkmechanismen der Vitamin D Analoga auf die nicht-amyloidogene APP-Prozessierung	105
5.1.5	Molekulare Wirkmechanismen der Vitamin D Analoga auf den A $\beta$ -Katabolismus	107
<b>5.2</b>	<b>Molekulare Wirkmechanismen der Vitamin D Analoga auf neuroinflammatorische Prozesse anhand des Beispiels Interleukin-1<math>\beta</math></b>	<b>109</b>
<b>5.3</b>	<b>Epidemiologische Studienlage bezüglich Vitamin D und Vitamin D Analoga in Bezug auf Morbus Alzheimer</b>	<b>112</b>
5.3.1	Assoziation von Vitamin D Mangel und Morbus Alzheimer	113
5.3.2	Supplementierung von Vitamin D oder Analoga bei Morbus Alzheimer	118
<b>5.4</b>	<b>Strukturelle Eigenschaften der Vitamin D Analoga</b>	<b>122</b>

5.4.1	Strukturelle Unterschiede der Vitamin D Analoga und ihre klinische Anwendung	123
5.4.1.1	<i>Maxacalcitol (22-oxa-1<math>\alpha</math>-25(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>)</i>	123
5.4.1.2	<i>Paricalcitol (19nor-1,25-OH<sub>2</sub>-D<sub>2</sub>)</i>	124
5.4.1.3	<i>Calcipotriol (1,24-OH<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>)</i>	125
5.4.1.4	<i>Alfacalcidol (1-OH-D<sub>3</sub>)</i>	126
5.4.1.5	<i>Doxercalciferol (1-OH-D<sub>2</sub>)</i>	127
5.4.2	Voraussetzungen zur zerebralen Wirkung der Vitamin D Analoga	128
5.4.3	25-Hydroxylierung von Doxercalciferol und Alfacalcidol	129
5.4.4	1 $\alpha$ -Hydroxylierung als Gemeinsamkeit der Vitamin D Analoga	132
5.4.4.1	<i>Eingeschränkte renale 1<math>\alpha</math>-Hydroxylase bei Niereninsuffizienz</i>	134
5.4.4.2	<i>Eingeschränkte renale 1<math>\alpha</math>-Hydroxylase durch Östrogenmangel</i>	136
5.4.4.3	<i>Eingeschränkte renale 1<math>\alpha</math>-Hydroxylase durch erhöhten Fibroblasten-Wachstumsfaktor 23</i>	136
<b>5.5</b>	<b>Weitere therapeutische Ansatzpunkte der Vitamin D Analoga in Bezug auf Morbus Alzheimer</b>	<b>138</b>
5.5.1	Beeinflussung der Hyperphosphorylierung von Tau-Proteinen und oxidativem Stress	138
5.5.2	Parallelen von Vitamin D und seinen Analoga zu Antidementiva	139
5.5.2.1	<i>Beeinflussung von Acetylcholin</i>	139
5.5.2.2	<i>Beeinflussung von Glutamat</i>	141
5.5.2.3	<i>Beeinflussung von Dopamin</i>	142
5.5.3	Vitamin D und Beeinflussung kardiovaskulärer Risikofaktoren	143
5.5.3.1	<i>Arterielle Hypertonie</i>	144
5.5.3.2	<i>Diabetes mellitus</i>	145
5.5.3.3	<i>Lipidstoffwechsel</i>	145
5.5.3.4	<i>Immobilität</i>	146
<b>5.6</b>	<b>Fazit &amp; Ausblick</b>	<b>147</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>150</b>
<b>7</b>	<b>PUBLIKATIONEN</b>	<b>182</b>
<b>7.1</b>	<b>Erstautorenschaften</b>	<b>182</b>



<b>7.2</b>	<b>Mitautorenschaften</b>	<b>182</b>
<b>7.3</b>	<b>Poster</b>	<b>183</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>184</b>
<b>9</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>185</b>

## II. Abkürzungsverzeichnis

A $\beta$	Amyloid- $\beta$ -Peptid
ACE	Angiotensin konvertierendes Enzym ( <i>engl. angiotensin converting enzyme</i> )
ADAM	Disintegrin und Metalloprotease ( <i>engl. a disintegrin and metalloprotease</i> )
AICD	intrazelluläre Domäne des APP ( <i>engl. APP intracellular domain</i> )
ANOVA	Varianzanalyse ( <i>engl. analysis of variance</i> )
APH1a	<i>engl. anterior pharynx defective 1a</i>
APH1b	<i>engl. anterior pharynx defective 1b</i>
APP	Amyloid Vorläuferprotein ( <i>engl. amyloid precursor-protein</i> )
BACE1	$\beta$ -seitiges APP schneidendes Enzym 1 ( <i>engl. <math>\beta</math>-site APP cleaving enzyme 1</i> )
BCA	Bicinchoninsäure ( <i>engl. bicinchoninic acid</i> ),
BSA	Rinderserum Albumin ( <i>engl. bovin serum albumin</i> )
C	Kohlenstoff
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
cDNS	komplementäre Desoxyribonukleinsäure ( <i>engl. complementary DNA</i> )
CERAD	<i>engl. Consortium to establish a registry of Alzheimer's disease</i>
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CuSO <sub>4</sub>	Kupfersulfat
CYP450	Cytochrom P450
d	Tag
Da	Dalton
DBP	Vitamin D bindendes Protein
dd	bidestilliert
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
DMEM	<i>engl. Dulbecco's modified Eagels medium</i>

DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	Erweiterte Chemilumineszenz ( <i>engl. enhanced chemiluminescence</i> )
EDTA	<i>engl. ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ELISA	<i>engl. enzyme linked immunosorbent assay</i>
engl.	englisch
et al.	und andere
EtOH	Ethanol
FCS	Fetales Kälberserum ( <i>engl. fetal calf serum</i> )
FGF23	Fibroblasten-Wachstumsfaktor 23 ( <i>engl. fibroblast growth factor 23</i> )
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
GFR	glomerulären Filtrationsrate
h	Stunde
HCl	Salzsäure
H <sub>2</sub> O	Wasser
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ( <i>engl. high performance liquid chromatography</i> )
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>engl. horseradish peroxidase</i> )
IE	Internationale Einheit
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
k	Kilo
KCl	Kaliumchlorid
KG	Körpergewicht
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
LPS	Lipopolysacchariden

LRP1	Lipoprotein Rezeptor verwandtes Protein 1 ( <i>engl. low density lipoprotein receptor-related protein 1</i> )
m	milli oder Meter
M	Molar
MCI	milde kognitive Beeinträchtigungen ( <i>engl. mild cognitive impairment</i> )
MEM	<i>engl. minimum essential medium</i>
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minuten
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
MMST	Mini-Mental-Status-Test
mRNS	<i>engl. messenger RNA</i>
n	nano
N2a	Neuro-2a
NaCl	Natriumchlorid
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, oxidierte Form
NADH+H <sup>+</sup>	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, reduzierte Form
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Di-Natriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NEM	N-Ethylmaleimide
NEP	Neprilysin
NIA-AA	<i>engl. National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease</i>
NICD	intrazelluläre Notch-Domäne ( <i>engl. notch intracellular domain</i> )
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PBS	<i>engl. phosphate buffered saline</i>
PEN2	Presenilin Verstärkerprotein ( <i>engl. presenilin enhancer 2</i> )
PNF	Postnukleare Fraktionen

PS1/PS2	Presenilin 1/Presenilin 2
RNS	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Echtzeit-Polymerasekettenreaktion ( <i>engl. real-time polymerase chain reaction</i> )
sAPP $\alpha$	lösliches APP $\alpha$ ( <i>engl. soluble <math>\alpha</math>-secreted APP</i> )
sAPP $\beta$	lösliches APP $\beta$ ( <i>engl. soluble <math>\beta</math>-secreted APP</i> )
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese ( <i>engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
Sec	Sekunde
SREBP	<i>engl. sterol regulatory element-binding protein</i>
TGF- $\beta$ 1	transformierende Wachstumsfaktor- $\beta$ 1 ( <i>engl. transforming growth factor</i> )
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
VDR	Vitamin D Rezeptor
v/v	Volumenprozent
WT	Wildtyp
z.B.	Zum Beispiel
ZnCl <sub>2</sub>	Zinkchlorid
Å	Ångström
$\alpha$ -CTF	$\alpha$ -carboxy-terminale Produkt ( <i>engl. <math>\alpha</math>-carboxy-terminal fragment</i> )
$\beta$ -CTF	$\beta$ -carboxy-terminales Produkt ( <i>engl. <math>\beta</math>-carboxy-terminal fragment</i> )
°C	Grad Celsius
$\mu$	mikro
%	Prozent
7-DHC	7-Dehydrocholesterol

### III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Zellviabilität nach Inkubation mit 100 nM Vitamin D Analoga .....	53
Abbildung 2 Exemplarischer Röntgenfilm nach Western Blot Analyse des A $\beta$ -Gesamtlevels im Medium von SH-SY5Y APP Zellen .....	55
Abbildung 3 Einfluss der Vitamin D <sub>3</sub> Analoga auf das A $\beta$ -Gesamtlevel im Medium von SH- SY5Y APP Zellen.....	56
Abbildung 4 Einfluss der Vitamin D Analoga auf die $\beta$ -Sekretase Aktivität in metabolisch aktiven SH-SY5Y WT Zellen und daraus isolierten Membranen .....	58
Abbildung 5 sAPP $\beta$ -Proteinspiegel nach 24 h Inkubation von SH-SY5Y WT Zellen mit 100 nM Calcifediol.....	62
Abbildung 6 $\beta$ -Sekretase Aktivität nach Vitamin D Analoga Substitution im murinen <i>ex</i> <i>vivo</i> Wildtyp- und Vitamin D supprimiertem Modell .....	64
Abbildung 7 <i>BACE1</i> Genexpression in SH-SY5Y WT Zellen nach Vitamin D Analoga Inkubation.....	69
Abbildung 8 Exemplarische Röntgenfilme nach Western Blot Analyse des BACE1- und Aktin-Proteingehaltes im Zellysat von SH-SY5Y WT Zellen.....	70
Abbildung 9 BACE1 Proteinlevel in SH-SY5Y WT Lysat.....	71
Abbildung 10 Bestimmung der $\gamma$ -Sekretase Aktivität in metabolisch aktiven SH-SY5Y WT Zellen.....	73
Abbildung 11 <i>NCSTN</i> Genexpression nach Inkubation mit 100 nM Vitamin D Analoga .....	74
Abbildung 12 Aktivität der $\alpha$ -Sekretase in metabolisch aktiven SH-SY5Y WT Zellen.....	76
Abbildung 13 Effekte der Vitamin D Analoga auf die A $\beta$ -Degradation in N2a WT Zellen...	78
Abbildung 14 Einfluss der Vitamin D Analoga auf die <i>ex vivo</i> A $\beta$ -Degradation Vitamin D defizienter Maushirnhomogenaten .....	80
Abbildung 15 <i>NEP</i> -Expression in SH-SY5Y WT Zellen nach Inkubation von Vitamin D Analoga .....	82
Abbildung 16 Neprilysin-Aktivität in SH-SY5Y WT Zellen nach Inkubation der Vitamin D Analoga .....	84
Abbildung 17 IL-1 $\beta$ -Level in SH-SY5Y WT Zellen nach Inkubation mit 100 nM Vitamin D Analoga .....	85
Abbildung 18 Durch Hypovitaminose D regulierte Alzheimer-Demenz relevante Gene .....	90

Abbildung 19 Übersicht über die identifizierten Einflüsse von Vitamin D und seinen Analoga auf die APP-Prozessierung ..... 93

Abbildung 20 Strukturformeln der Vitamin D Analoga ..... 123

Abbildung 21 Vitamin D, Vitamin D Analoga und die Beeinflussung der Hydroxylierungsschritte ..... 137

## IV. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Überblick über Indikation zugelassener Vitamin D Analoga und ihr Wirkmechanismus ..... 18

Tabelle 2 Zur Durchführung der Experimente verwendete Geräte ..... 21

Tabelle 3: Zur Durchführung der Experimente verwendete Chemikalien..... 23

Tabelle 4 Zur Durchführung der Experimente verwendete Verbrauchsmaterialien..... 26

Tabelle 5 Verwendete Antikörper..... 27

Tabelle 6 Verwendete Kits..... 28

Tabelle 7 Verwendete Primer ..... 28

Tabelle 8 Verwendete Zelllinien..... 29

Tabelle 9 Verwendete Mauslinien ..... 29

Tabelle 10 Verwendete Zellkulturmedien ..... 31

Tabelle 11 Inkubationsbedingungen der Primär- und Sekundärantikörper ..... 41

Tabelle 12 Messparameter der Substrate ..... 43

Tabelle 13 Zytotoxizität von SH-SY5Y WT Zellen nach Inkubation von 100 nM Vitamin D Analoga ..... 54

Tabelle 14 Anteil der direkten und indirekten Effekte auf die Reduktion der  $\beta$ -Sekretase Aktivität in SH-SY5S WT Zellen..... 61

Tabelle 15 Mittels Bonferroni post-hoc Test ermittelten Signifikanzen beim Vergleich der Effekte von Calcifediol und den Vitamin D Analoga auf die  $\beta$ -Sekretase Aktivitäten in murinen Proben ..... 66

Tabelle 16 Mittels student's t-test ermittelte Signifikanzen beim Vergleich der  $\beta$ -Sekretase Aktivität in murinen Proben nach Inkubation von Vitamin D Analoga ..... 67

Tabelle 17 Mittels Bonferroni post-hoc Test ermittelte Signifikanzen beim Vergleich der  $\beta$ -Sekretase Aktivitäten in murinen Proben nach Inkubation von Vitamin D Analoga ..... 68

Tabelle 18 Zusammenfassung der Ergebnisse .....	87
Tabelle 19 Durch Vitamin D Mangel beeinflusste, Alzheimer relevante Gene .....	91
Tabelle 20 Überblick über Metaanalysen, die die Assoziation zwischen Vitamin D, Alzheimer oder Demenz untersuchen .....	113
Tabelle 21 Überblick über CYP27A und CYP3A4 Inhibitoren .....	131

## V. Kooperationsverzeichnis

Die dargestellten Experimente wurden größtenteils als Kooperationsprojekte innerhalb der *experimentellen Neurologie der Universität des Saarlandes* erstellt. Hierdurch wurde die Objektivität der Messmethodik gewährleistet.

Um die Hilfe bei der Einarbeitung und die Unterstützung bei der Versuchsdurchführung zu würdigen, folgt ein Überblick, bei welchen Experimenten ich kooperierend unterstützt wurde.

Kapitel	Experiment	Beteiligte Personen
4.1	Überprüfung der Inkubationsbedingungen	Andrea Thiel
4.2	A $\beta$ -Gesamtlevel in SH-SY5Y APP Zellen	Andrea Thiel Céline Benoist Liesa Regner-Nelke
4.3.1	$\beta$ -Sekretase Aktivität in SH-SY5Y WT Zellen	Andrea Thiel Dr. med. Christopher Nelke Daniel Janitschke
4.3.2	$\beta$ -Sekretase Aktivität in isolierten Membranen	Anna Lauer Dr. med. Johannes Lehmann
4.3.3	Bestimmung des sAPP $\beta$ -Levels in SH-SY5Y WT Zellen	Andrea Thiel Dr. rer. nat. Heike Grimm
4.3.4	$\beta$ -Sekretase Aktivität in murinen WT Hirnen	Andrea Thiel Anna Lauer
4.3.5	$\beta$ -Sekretase Aktivität in Vitamin D -/- Hirnen	Andrea Thiel Anna Lauer



4.3.6	<i>BACE1</i> -Expression in SH-SY5Y WT Zellen	Andrea Thiel Dr. med. Johannes Lehmann
4.3.7	BACE1 Proteinlevel in SH-SY5Y WT Zellen	Andrea Thiel
4.3.8	$\gamma$ -Sekretase Aktivität in SH-SY5Y WT Zellen	Anna Lauer
4.3.9	<i>NCSTN</i> -Expression in SH-SY5Y WT Zellen	Andrea Thiel Anna Lauer Dr. med. Johannes Lehmann
4.4	$\alpha$ -Sekretase Aktivität [%] in SH-SY5Y WT Zellen	Anna Lauer Dr. med. Christopher Nelke
4.5.1	A $\beta$ -Degradation in N2a WT Zellen	Andrea Thiel
4.5.2	A $\beta$ -Degradation in Vitamin D -/- Hirnen	Andrea Thiel
4.5.3	<i>NEP</i> -Expression in SH-SY5Y WT Zellen	Anna Lauer
4.5.4	NEP Enzymaktivität in SH-SY5Y WT Zellen	Anna Lauer Jakob Winkler Dr. med. Johannes Lehmann
4.6	Interleukin-1 $\beta$ -Level in SH-SY5Y WT Zellen	Daniel Janitschke Jakob Winkler
	Unterstützung bei der Zellkultur	Dr. med. Olga Streidenberger, Dr. med. Hannah Stötzel
	Projektplanung	Prof. Dr. rer. nat. Marcus Grimm Prof. Dr. rer. nat. Tobias Hartmann

# 1 Zusammenfassung

## 1.1 Der Einfluss von Vitamin D und seinen Analoga auf die in der Alzheimer-Demenz relevante A $\beta$ -Homöostase

Die neurodegenerative Erkrankung Morbus Alzheimer gewinnt aufgrund ihrer steigenden Prävalenz zunehmend an klinischer, sozialer und wirtschaftlicher Relevanz. Eine krankheitsmodifizierende Therapie ist in Europa bis jetzt nicht zugelassen. Als potenzieller Therapieansatz gilt die Reduktion der histopathologisch vermehrt nachweisbaren amyloiden Plaques. Obwohl Vitamin D auf molekularer Ebene in die Entstehung und den Abbau des Amyloid- $\beta$  Peptides (A $\beta$ ), dem Hauptbestandteil der amyloiden Plaques, eingreift, zeigen epidemiologischen Studien bisher keinen ausreichenden therapeutischen Nutzen einer Vitamin D Supplementierung in Bezug auf die Reduktion des Alzheimerisikos.

In vielen medizinischen Bereichen werden synthetische Vitamin D Analoga eingesetzt, die veränderte Wirkungs- und Nebenwirkungsprofile mitbringen. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die systematische Untersuchung molekularer Mechanismen ausgewählter Vitamin D Analoga auf die in der Pathologie von Morbus Alzheimer relevante A $\beta$ -Homöostase sowie auf Entzündungsparameter am Beispiel von Interleukin-1 $\beta$ . In Zellkulturen und murinen Hirnproben wurden die Effekte einer Inkubation der Vitamin D<sub>2</sub> Analoga Paricalcitol und Doxercalciferol und der Vitamin D<sub>3</sub> Analoga Maxacalcitol, Calcipotriol und Alfacalcidol auf die Genexpression, Sekretase Aktivität und die Proteinebene unterschiedlicher Enzyme analysiert, die an der A $\beta$ -Produktion und Degradation beteiligt sind. Die Effektstärken wurden mit Ethanol als Lösungsmittelkontrolle und mit natürlich vorkommenden Calcifediol verglichen.

Die Vitamin D Analoga reduzierten im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle in humanen Neuroblastomzellen das A $\beta$ -Gesamtlevel, was einerseits auf inhibierende Effekte auf die an der A $\beta$ -Produktion beteiligten  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretasen, andererseits auf einen erhöhten A $\beta$ -Abbau durch das Enzym Neprilysin zurückgeführt werden konnte. Neben Einflüssen auf die Aktivität dieser Enzyme, regulierte die Inkubation der Vitamin D Analoga auch die Genexpression. Paricalcitol erhöhte zudem die  $\alpha$ -Sekretase Aktivität, durch die das Amyloid-

Vorläuferprotein, aus dem A $\beta$  durch proteolytische Spaltung entsteht, alternativ in Form einer nicht-amyloidogenen Prozessierung zersetzt wird. Hierdurch wird die Entstehung von A $\beta$  verhindert. Darüber hinaus wurde das Interleukin-1 $\beta$ -Level durch alle Vitamin D Analoga außer Paricalcitol signifikant gesenkt, sodass auch eine Regulation inflammatorischer Prozesse gezeigt wurde. Die Effektstärken der untersuchten Vitamin D Analoga unterschieden sich hierbei untereinander und in Bezug zu Calcifediol nicht signifikant. Vitamin D und seine Analoga interagierten mit der  $\beta$ -Sekretase Aktivität und der A $\beta$ -Degradation sowohl in Hirnproben von Wildtypmäusen als auch in Hirnproben von Mäusen, in denen zuvor eine Hypovitaminose D generiert wurde.

Die Ergebnisse untermauern den Zusammenhang zwischen Morbus Alzheimer und Vitamin D und deuten darauf hin, dass eine Supplementierung von Vitamin D oder Vitamin D Analoga einen präventiven und therapeutischen Nutzen bei Morbus Alzheimer haben könnte.

## **1.2 The influence of vitamin D and its analogues on the A $\beta$ -homeostasis relevant in Alzheimer's disease**

The neurodegenerative Alzheimer's disease is gaining increasing clinical, social and economic relevance due to its rising prevalence. A disease-modifying therapy has not yet been approved in Europe. A potential therapeutic approach is the reduction of the histopathological increased detectable amyloid plaques. Although vitamin D intervenes at the molecular level in the formation and degradation of amyloid (A $\beta$ ), which is the main component of amyloid plaques, epidemiological studies have not yet shown sufficient therapeutic benefit of vitamin D supplementation in terms of reducing the risk of Alzheimer's disease.

In many medical fields, vitamin D analogues are used, which bring altered efficacy and side effect profiles. Therefore, the aim of the present study was to systematically investigate molecular mechanisms of selected vitamin D analogues on A $\beta$ -homeostasis, which is relevant in the pathology of AD, and on inflammatory parameters using interleukin-1 $\beta$ -level as an example. In cell cultures and examples of mouse brains, the effects of incubation of the vitamin D<sub>2</sub> analogues paricalcitol and doxercalciferol and the vitamin D<sub>3</sub> analogues maxacalcitol, calcipotriol, and alfacalcidol on gene expression, secretase activity, and protein

levels of different enzymes involved in A $\beta$ -production and degradation were analyzed. Effect sizes were compared with ethanol as a solvent control and with naturally occurring calcifediol.

The vitamin D analogues reduced total A $\beta$ -levels in human neuroblastoma cells, which could be attributed on the one hand to inhibitory effects on the  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretases involved in A $\beta$ -production and on the other hand to increase A $\beta$ -degradation by the enzyme neprilysin. In addition to influences on the activity of these enzymes, incubation of vitamin D analogues also regulated gene expression. Paricalcitol also increased  $\alpha$ -secretase activity, by which the amyloid precursor protein, from which A $\beta$  is generated by proteolytic cleavage, is alternatively decomposed in the sense of nonamyloidogenic processing. This prevents the formation of A $\beta$ . In addition, interleukin-1 $\beta$ -level was significantly decreased by all vitamin D analogues except paricalcitol, so regulation of inflammatory processes was also shown. The effect sizes of the investigated vitamin D analogues did not differ significantly among each other and in relation to calcifediol. Vitamin D and analogues interacted with  $\beta$ -secretase activity and A $\beta$ -degradation both in brain samples from wild-type mice and in brain samples from mice in which hypovitaminosis D had been previously generated.

The results support the link between Alzheimer's disease and vitamin D and suggest that supplementation of vitamin D or vitamin D analogues may have preventive and therapeutic benefits in Alzheimer's disease.

## 2 Einleitung

### 2.1 Die Alzheimer-Demenz und aktuelle Therapiemöglichkeiten

#### 2.1.1 Krankheitsbild und Epidemiologie

Morbus Alzheimer ist eine neurodegenerative Erkrankung, die erstmalig 1906 durch Alois Alzheimer beschrieben wurde. Dieser brachte kognitive und emotionale Einschränkungen seiner Patientin Auguste Deter mit neuropathologischen Auffälligkeiten im Gehirngewebe in Zusammenhang (ALZHEIMER, 1906).

Heute wird der Krankheitsverlauf von Morbus Alzheimer in drei ineinander übergehende Stadien gefasst. Das initiale und längste Stadium wird als präklinische Phase bezeichnet. Hier laufen zerebral bereits charakteristische pathophysiologische Prozesse ab, die Patienten sind jedoch noch symptomlos (JANSEN et al., 2015; SPERLING et al., 2011). Bis zu 20 Jahre später treten erste milde kognitive Beeinträchtigungen (*engl. mild cognitive impairment*, MCI) auf, die mittels neuropsychologischen Kurztests wie dem Mini-Mental-Status-Test (MMST) oder dem Uhrentest objektivierbar sind. Betroffene leiden unter zeitlich-örtlicher Desorientierung oder Gedächtnisverlust. Alltagskompetenz und Selbstständigkeit sind zu diesem Zeitpunkt noch erhalten (PETERSEN, 2004). Ein Fortschreiten der Krankheit führt zum letzten Stadium, dem Stadium der Demenz. Im Diagnoseschlüssel *international statistical classification of diseases and related health problems* (ICD-10) sind Demenzen als Syndrom mit kognitiven und emotionalen Beeinträchtigungen sowie Einschränkungen des Sozialverhaltens und der Motivation definiert. Betroffene Patienten verlieren ihre Kommunikationsfähigkeit, ihre autobiographische Identität und ihre Persönlichkeit. Es folgt eine zunehmende Pflegebedürftigkeit bis hin zur Bettlägerigkeit. Damit einher geht eine erhöhte Infektanfälligkeit, sodass die meisten Alzheimer-Dementen innerhalb von drei bis zehn Jahren nach Diagnosestellung versterben, überwiegend an den Folgen einer Pneumonie (BURNS et al., 1990).

Nach Schätzungen des *World Alzheimer Reports* leben derzeit weltweit über 55 Millionen Demenzkranke, davon ca. 1,7 Millionen in Deutschland. Bis 2050 wird national mit einer Verdopplung der Prävalenz gerechnet, weltweit könnten bis dahin mehr als dreimal soviel

Menschen erkrankt sein (DEUTSCHE ALZHEIMER GESELLSCHAFT E.V., 2021; WORLD ALZHEIMER REPORT, 2021). Die Demenz gewinnt damit zunehmend an sozialer und wirtschaftlicher Bedeutung (ZIEGLER, DOBLHAMMER, 2009). Morbus Alzheimer ist mit 50 – 70 % die häufigste Ursache einer Demenz. Weitere Ursachen sind beispielsweise die vaskuläre, frontotemporale oder Lewy-Körper-Demenz (ROCCA et al., 1991).

### ***2.1.2 Biomolekulare und neuropathologische Mechanismen***

Morbus Alzheimer geht mit charakteristischen neuropathologischen und neurochemischen Merkmalen einher. Hierzu zählen intra- und extrazelluläre Proteinablagerungen im Hirngewebe, wodurch der Nährstofftransport und die interneuronale Kommunikation gestört werden. Zusätzlich wird die Sauerstoff- und Energieversorgung durch Proteinablagerungen in Gefäßen erschwert. Längerfristig kommt es hierdurch zur Degeneration von Neuronen, zum Zelltod und zur Hirnatrophie (THAL et al., 2004). Besonders betroffen sind der Hippocampus und die kortikalen Hirnregionen, was makroskopisch in einer Vergrößerung der Sulci und Ventrikel mündet (SCHOTT et al., 2005). Parallel laufen im Rahmen einer chronischen Entzündung inflammatorische Prozesse ab, da das Immunsystem versucht die toxischen Proteine zu entfernen. Aufgrund der dauerhaften Entzündungsreaktion weisen Alzheimer-Demente im Vergleich zu Gesunden signifikant erhöhte Zytokinkonzentrationen im Serum auf (SWARDFAGER et al., 2010).

#### ***2.1.2.1 Tau-Pathologie***

Die intrazellulären Proteinablagerungen bestehen aus hyperphosphorylierten Tau-Proteinen. Tau-Proteine sind im Zytosol vorkommende Proteine, die unter anderem an der Bildung und Stabilisierung von Mikrotubuli beteiligt sind und hierdurch zu einem funktionsfähigen Zytoskelett beitragen. Die übermäßige Phosphorylierung von Tau-Proteinen führt bei Morbus Alzheimer zur Aggregation und zum Zusammenschluss der Tau-Proteine zu Neurofibrillen. Dies führt zur Destabilisierung und schließlich zur Zerstörung der Neuronen, wodurch die hyperphosphorylierten Tau-Proteine aus dem Zytosol ins Liquor gelangen. Bei Patienten mit Morbus Alzheimer können daher im Liquor erhöhte Gesamt- und Phospho-Tau-Proteine im Liquor nachgewiesen werden. (DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR NEUROLOGIE, 2016; GRUNDKE-IQBAL et al., 1986).

### 2.1.2.2 Amyloid- $\beta$ -Pathologie

Die extrazellulären Proteinablagerungen setzen sich überwiegend aus aggregiertem Amyloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) zusammen, weshalb sie auch als amyloide oder neuritische Plaques bezeichnet werden (BRAAK, BRAAK, 1991).  $A\beta$  entsteht durch eine sequentielle proteolytische Spaltung aus dem Amyloid Vorläuferprotein (*engl. amyloid precursor-protein, APP*). Dieses wird initial durch die  $\beta$ -Sekretase BACE1 (*engl.  $\beta$ -site APP cleaving enzyme 1*) geschnitten. Hierbei entstehen ein in der Membran verbleibendes  $\beta$ -carboxy-terminales Produkt (*engl.  $\beta$ -C-terminal fragment,  $\beta$ -CTF*), sowie ein löslicher amino-terminaler Rest, das sAPP $\beta$  (*engl. soluble  $\beta$ -secreted APP*), welches nach extrazellulär frei gegeben wird (SINHA et al., 1999; VASSAR et al., 1999). Die  $\beta$ -Sekretase ist eine membrangebundene Aspartatprotease und der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der amyloidogenen APP-Prozessierung. Anstelle der  $\beta$ -Sekretase kann auch die  $\alpha$ -Sekretase APP schneiden. Sie durchtrennt APP in der  $A\beta$ -Domäne und verhindert dadurch die spätere  $A\beta$ -Bildung, weswegen in diesem Fall von der nicht-amyloidogenen APP-Prozessierung gesprochen wird (LAMMICH et al., 1999). Durch den  $\alpha$ -Sekretase Schnitt entsteht das membranständige  $\alpha$ -carboxy-terminale Produkt (*engl.  $\alpha$ -C-terminal fragment,  $\alpha$ -CTF*) und ein löslicher N-terminaler APP-Rest, der als sAPP $\alpha$  (*engl. soluble  $\alpha$ -secreted APP*), bezeichnet wird. Die  $\alpha$ -Sekretase gehört zur Proteinfamilie der Disintegrin und Metalloproteasen (*engl. a disintegrin and metalloprotease, ADAM*). Die Hauptvertreter bilden ADAM10 und ADAM17 (KUHN et al., 2010).

Nach dem initialen Schnitt der  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Sekretase folgt der  $\gamma$ -Sekretase Schnitt. Die  $\gamma$ -Sekretase ist somit sowohl am amyloidogenen als auch am nicht-amyloidogenen Weg beteiligt und schneidet das jeweils membranständige  $\alpha$ - oder  $\beta$ -CTF innerhalb der Transmembrandomäne. Die  $\gamma$ -Sekretase ist ein multimerischer Enzymkomplex aus den vier Untereinheiten Presenilin 1 (PS1) oder Presenilin 2 (PS2), Presenilin Verstärker 2 (*engl. presenilin enhancer 2, PEN2*), Nicastrin und *Anterior Pharynx Defective 1 Homolog a* (APH1a) oder *b* (APH1b) (HAASS, 2004; KIMBERLY et al., 2003). PS1 oder PS2 bilden hierbei als Aspartylpeptidasen das katalytische Zentrum. Nicastrin agiert als Substratrezeptor. Bei der nicht-amyloidogenen APP-Prozessierung spaltet der Schnitt der  $\gamma$ -Sekretase  $\alpha$ -CTF in eine intrazelluläre Domäne des APP (*engl. APP intracellular domain, AICD*) und das Spaltprodukt p3. Im Falle der amyloidogenen APP-Prozessierung, bei der zuvor durch die  $\beta$ -Sekretase  $\beta$ -CTF gebildet wurde, teilt die  $\gamma$ -Sekretase das membranständige  $\beta$ -CTF in AICD

und A $\beta$ . AIDC wird in beiden Fällen ins Zytosol freigesetzt und ist transkriptionell aktiv (D'ANDREA et al., 2021).

Die amyloidogene APP-Prozessierung ist per se kein pathologischer Vorgang, er läuft auch physiologisch in gesunden Individuen ab (MICHIELS et al., 2021; SEHAR et al., 2022). Das entstandene A $\beta$  kann durch unterschiedliche Mechanismen abtransportiert oder abgebaut werden. Der Abtransport von A $\beta$  erfolgt über das Lymphsystem, den Liquor oder über die Blut-Hirn-Schranke, wo es im Anschluss unter anderem über den Blutkreislauf zu Leber und Niere transportiert und dort eliminiert werden kann (SAGARE et al., 2007; WELLER et al., 2000). Der Abbau von A $\beta$  erfolgt im Gehirn durch Phagozytose von Mikroglia und Astrozyten oder enzymatisch durch unterschiedliche Metalloproteasen (FRAUTSCHY et al., 1992; MINERS et al., 2011). Das wichtigste A $\beta$  degradierende Enzym ist hierbei die Zinkmetalloendopeptidase Neprilysin (NEP) (HAMPEL et al., 2021; IWATA et al., 2001). Des Weiteren wird A $\beta$  auch durch das Angiotensin konvertierende Enzym (*engl. angiotensin converting enzyme*, ACE), das Insulin degradierende Enzym (IDE) sowie die Matrix-Metalloproteasen 2 und 9, die Serinprotease Plasmin und die lysosomale Cysteinprotease Cathepsin B abgebaut (CHEN et al., 2017).

Bei Betroffenen der Alzheimer-Demenz kommt es verstärkt zur amyloidogenen APP-Prozessierung bei gleichzeitig bis zu 30 % reduzierter A $\beta$ -Elimination (MAWUENYEGA et al., 2010; SELKOE, HARDY, 2016). Aus diesem Ungleichgewicht resultiert ein erhöhter A $\beta$ -Spiegel. Das entstandene A $\beta$ -Fragment aggregiert zu A $\beta$ -Oligomeren, welche sich weiter zu Fibrillen und später zu den unlöslichen, extrazellulären Plaques zusammenlagern (SAIDO, 2013). Hierbei weist insbesondere das aus 42 Aminosäuren bestehende A $\beta$ <sub>42</sub> eine hohe Aggregationsneigung auf und wurde vermehrt in den amyloiden Plaques nachgewiesen (JARRETT et al., 1993; WILLBOLD et al., 2021). Die häufigere Variante, das 4 kDA große A $\beta$ <sub>40</sub>-Peptid zeigt eine geringere Aggregationstendenz (MATUSZYK et al., 2022).

### 2.1.2.3 Neuroinflammation und Interleukin-1 $\beta$

Durch die extra- und intrazellulären Proteinablagerungen entsteht im zentralen Nervensystem eine chronische Entzündungsreaktion, die als Neuroinflammation bezeichnet wird. Der Prozess ist gekennzeichnet durch die übermäßige Produktion von proinflammatorischen Botenstoffen, sogenannten Zytokinen, die zu synaptischer Dysfunktion, neuronalem Tod und



Hemmung der Neurogenese führt (LENG, EDISON, 2021). Die Zytokine werden insbesondere von aktivierten Gewebsmakrophagen, der sogenannten Mikroglia, welche die zelluläre Immunabwehr im zentralen Nervensystem bildet, ausgeschüttet. Die Zytokine können in die fünf Hauptgruppen der Interleukine, Interferone, Chemokine, Tumornekrosefaktoren und koloniestimulierende Faktoren unterteilt werden (MENDIOLA, CARDONA, 2018).

Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) ist ein Zytokin, welches neben Mikroglia insbesondere von Astrozyten, pathogenen Lymphozyten und myeloischen Blutzellen produziert wird. IL-1 $\beta$  übernimmt pleiotrope Funktionen, unter anderem aktiviert es seinerseits Mikroglia und Astrozyten und führt zur nachgeschalteten Synthese proinflammatorischer Botenstoffe (MENDIOLA, CARDONA, 2018; SHAFTEL et al., 2008). Dadurch nimmt IL-1 $\beta$  Einfluss auf neuronale Funktionen, indem es beispielsweise den Verlust von Synapsen induziert. Dies geschieht unter anderem durch eine IL-1 $\beta$  vermittelte, erhöhte Synthese von Prostaglandin E<sub>2</sub>. Hierdurch wird präsynaptisch Glutamat freigesetzt und postsynaptisch N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDA-Rezeptoren) aktiviert, was zum Synapsenverlust führt (LENG, EDISON, 2021; MISHRA et al., 2012).

### **2.1.3 Diagnosestellung von Morbus Alzheimer**

Neben der ausführlichen Anamnese, der körperlichen Untersuchung und der neuropsychologischen Diagnostik finden A $\beta$ , sowie die Gesamt- und Phospho-Tau-Proteine, als Biomarker diagnostischen Einsatz. Bei unklaren klinischen Diagnosefällen empfiehlt die aktuelle Demenz-Leitlinie der *Deutschen Gesellschaft für Neurologie* sowie der *Deutschen Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie, Psychosomatik und Nervenheilkunde* eine liquorbasierte neurochemische Demenzdiagnostik (DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR NEUROLOGIE, 2016). Erniedrigte A $\beta$ <sub>1-42</sub>-Werte sowie erhöhte Gesamt- oder Phospho-Tau-Proteinwerte im Liquor korrelieren hierbei mit der Wahrscheinlichkeit einer neurodegenerativen Demenz (OLSSON et al., 2016). In aktuellen Studien wird außerdem die weniger invasive, blutbasierte Bestimmung von A $\beta$  als Biomarker und prädiktiver Test untersucht (CARBONE et al., 2021; NAKAMURA et al., 2018; VERBERK et al., 2018).

*Post mortem* kann die neuropathologische Diagnose nach den „National Institute on Aging-Alzheimer’s Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer’s disease“ (NIA-AA Kriterien) gestellt werden. Als relevante Parameter zählen hierbei das Ausmaß der A $\beta$ -Plaques sowie der Tau-Pathologie. Hierzu wird der *ABC-Score* genutzt, der als Akronym für die eingehenden Parameter *A $\beta$ -Plaques nach Thal, Braak-Stadien* und dem „Consortium to establish a registry of Alzheimer’s disease“ (kurz CERAD-Kriterien) steht (KOVACS, GELPI, 2012). Thal *et al.* zeigten, dass sich die A $\beta$ -Plaques nach einem typischen Muster ausbreiten. Den ersten Ablagerungen im Neocortex folgen Ablagerungen in limbischen Arealen wie dem Hippokampus, der Amygdala und dem Gyrus cinguli. Es folgen das Dienzephalon, die Medulla oblongata und zuletzt das Kleinhirn (THAL *et al.*, 2002). Auch die Tau-Pathologie folgt einem Ausbreitungsmuster, welches durch die *Braak-Klassifikation* beschrieben wird. Die ersten Neurofibrillenbündel lagern sich transentorhinal ab, es folgt die Regio entorhinalis und das Ammonshorn, sowie der Neokortex und sekundäre Rindenfelder (BRAAK *et al.*, 2006; BRAAK, BRAAK, 1991). Die *CERAD-Kriterien* sind ein Schätzverfahren zur alterskorrelierten Dichte der neuritischen Plaques. Hierbei werden der Frontal-, Parietal- und Temporallappen ausgewertet und eine geringe, moderate oder hohe Plaquedichte beschrieben (MIRRA *et al.*, 1991).

#### **2.1.4 Aktuelle präventive und therapeutische Ansätze der Alzheimer-Demenz**

Gegenwärtig zugelassene und durch die *Deutsche Gesellschaft für Neurologie* empfohlene Antidementiva korrigieren den Spiegel bestimmter Neurotransmitter, welche durch den neuronalen Untergang ins Ungleichgewicht geraten (DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR NEUROLOGIE, 2016). So wird durch den Einsatz von Acetylcholinesterase-Inhibitoren wie *Donepezil*, *Galantamin* oder *Rivastigmin* der erniedrigte Acetylcholin-Spiegel angehoben, während NMDA-Rezeptorantagonisten, wie *Memantin* der erhöhten Glutamatausschüttung entgegenwirken (IQWIG-BERICHT, 2007, 2011). Hierdurch gelingt im Stadium der Demenz eine kurzfristige symptomatische Besserung, der Krankheitsverlauf wird jedoch nicht aufgehalten. Zudem ist die Therapie nebenwirkungsreich (FERRIS *et al.*, 2009).

Pharmakologische Therapieansätze, die sich kausal gegen die Pathologie der Alzheimer-Demenz richten, befinden sich in Prüfung. Ein therapeutischer Nutzen konnte bisher jedoch nicht ausreichend belegt werden. In den USA wurde 2021 eine Antikörpertherapie mit dem

monoklonalen Antikörper *Aducanumab* zugelassen, der sich gegen lösliches und aggregiertes A $\beta$  richtet. Die Zulassung ist jedoch unter anderem aufgrund frühzeitig beendeter Zulassungsstudien umstritten, sodass eine neunjährige Bestätigungsstudie bis 2030 den klinischen Nutzen überprüft (WALSH et al., 2021). Die *Europäische Arzneimittelagentur* lehnte den Antrag auf Zulassung von *Aducanumab* aufgrund fehlender Wirksamkeitsnachweise und möglicher schwerwiegender Nebenwirkungen wie Hirnschwellungen und -blutungen 2021 ab (MAY, 2021). Im Januar 2023 wurde in den USA zudem der humanisierte monoklonale Antikörper *Lecanemab* zugelassen, der ebenfalls lösliche A $\beta$ -Fibrillen bindet (SODERBERG et al., 2023). Auch dieser Antikörper zeigte in der Placebo kontrollierten Zulassungsstudie positive Effekte auf die kognitive Leistung. Bei 26,4 % der Teilnehmer traten jedoch infusionsbedingte Reaktionen und unerwünschte Nebenwirkungen auf, sodass weitere Studien die Sicherheit und Wirksamkeit des Antikörpers belegen müssen und in Europa bisher keine Zulassung besteht (VAN DYCK et al., 2023).

Auch  $\beta$ -Sekretase Inhibitoren befinden sich in klinischen Zulassungsstudien. Eine Studie des  $\beta$ -Sekretase Inhibitors *Verubecestat* mit 1454 Patienten musste vorzeitig abgebrochen werden, da das getestete Medikament die kognitive Leistung im Vergleich zur Placebo-Gruppe verschlechterte (EGAN et al., 2019; WESSELS et al., 2020). Ein weiterer Therapieansatz besteht in dem Einsatz anti-inflammatorischer Medikamente, wie beispielsweise dem Antibiotikum *Minocyclin*. Auch hier können aktuelle Studien keinen ausreichenden klinischen Nutzen belegen (HOWARD et al., 2020). Ebenso fehlen evidenzbasierte Daten bezüglich Phytotherapeutika wie *Ginkgo*, die in der Alternativmedizin Anwendung finden (YUAN et al., 2017).

Als nicht-medikamentöse Behandlungsform zeigte insbesondere Bewegungstherapie einen Nutzen auf den Erhalt der kognitiven Funktion. In einer Metaanalyse, die insgesamt 36 Tierstudien auswertete, reduzierte sich durch regelmäßige körperliche Betätigung signifikant der A $\beta$ -Gehalt (VASCONCELOS-FILHO et al., 2021). Im Alltag scheint jedoch die Umsetzung einer effektiven Bewegungstherapie bei Demenzkranken aufgrund des Alters, der häufig bestehenden Multimorbidität und der fehlenden Pflege- und Betreuungskräfte schwierig umzusetzen (FORBES et al., 2015; GROOT et al., 2016; LAUTENSCHLAGER et al., 2008).

Aufgrund der fehlenden Therapie wird der Prävention von Morbus Alzheimer ein großer Stellenwert zugeschrieben (BAUMGART et al., 2015). Als potenziell modifizierbare Risikofaktoren der Alzheimer-Demenz gelten Risikofaktoren wie Rauchen, arterielle Hypertonie, Adipositas, Diabetes mellitus und Hypercholesterinämie. Durch die Modifizierung des Lebensstils, insbesondere durch die Vermeidung kardiovaskulärer Risikofaktoren, kann das Demenzrisiko um bis zu 30 % gesenkt werden. Insbesondere körperliche und geistige Betätigung, aber auch eine ausgewogene Ernährung können die Kognition verbessern (KULMALA et al., 2018; LIVINGSTON et al., 2020). Insbesondere der Lipidhaushalt, aber auch unterschiedliche Vitamine, darunter Vitamin A, Vitamin E, Vitamin K und Vitamin B<sub>12</sub> stehen mit Morbus Alzheimer in Verbindung und zeigen antioxidative Effekte (GRIMM et al., 2016; KAO et al., 2020; LAUER et al., 2022).

Doch auch wenn einige Risikofaktoren durch präventive Maßnahmen reduziert werden können, lassen sich die Hauptrisikofaktoren der Alzheimer-Demenz, das Alter, die Genetik und die familiäre Vorbelastung, nicht vermeiden (HEBERT et al., 2010). Mit dem Alter steigt die Prävalenz von Morbus Alzheimer. In den USA litten 2021 5,3 % der 65–74-Jährigen, 13,8 % der 75–84-Jährigen und 34,6 % der 85-Jährigen an Morbus Alzheimer (ALZHEIMER'SASSOCIATION, 2021). Als genetischer Risikofaktor gilt insbesondere die Trägerschaft des Apolipoproteins E ε<sub>4</sub>. Heterozygote Genotypen erkranken statistisch dreimal häufiger, homozygote Träger 12-15-fach häufiger an Alzheimer-Demenz (BEKRIS et al., 2010; MICHAELSON, 2014; SAUNDERS et al., 1993). Darüber hinaus sind weitere Gene identifiziert, die beispielsweise über die APP-Homöostase, den Lipid- oder Energiestoffwechsel, die Neuroinflammation oder oxidativen Stress mit Morbus Alzheimer in Verbindung stehen (BERTRAM et al., 2007; LAMBERT, AMOUYEL, 2011).

Zudem sind Punktmutationen in den für *APP*, *PS1* oder *PS2* kodierenden Genen bekannt, die eine seltene, früh auftretende Unterform von Morbus Alzheimer auslösen. Die Häufung dieser als familiäre Alzheimer-Demenz bezeichneten Form beläuft sich auf ca. 1 % aller Fälle von Morbus Alzheimer und wird autosomal dominant vererbt. Betroffene erkranken typischerweise bereits vor dem 55. Lebensjahr an der Alzheimer-Demenz (SCHEUNER et al., 1996).

## 2.2 Vitamin D und die Hypovitaminose D

### 2.2.1 *Metabolismus und Funktion von Vitamin D*

Das fettlösliche Vitamin D zeigt strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit zu den Steroidhormonen. Im Gegensatz zu anderen Vitaminen ist es keine essenzielle Verbindung, sondern 80 – 90 % des Vitamin D Bedarfes können bei ausreichender Sonneneinstrahlung durch körpereigene Synthese aus Cholesterin gedeckt werden (SASSI et al., 2018). Der restliche Bedarf wird überwiegend in Form von Ergocalciferol (Vitamin D<sub>2</sub>) oder Cholecalciferol (Vitamin D<sub>3</sub>) über die Nahrung zugeführt (BENEDIK, 2022). Ergocalciferol wird durch photochemische Prozesse in Pflanzen und Pilzen gebildet. Cholecalciferol stellt die Speicherform des Vitamin D in tierischen Produkten dar und wird beispielsweise durch den Verzehr fettreichen Fisches wie Lachs substituiert (BENEDIK, 2022).

Die körpereigene Vitamin D Synthese beginnt in der Leber durch die Dehydrierung von Cholesterin zu 7-Dehydrocholesterin (7-DHC). An das Vitamin D bindende Protein (DBP) gebunden gelangt 7-DHC über den Blutkreislauf in die Haut, wo durch Ultraviolette-B-Strahlung (UV-B Strahlung) der Wellenlänge 290-315 nm Prä-Vitamin D<sub>3</sub> gebildet wird. Prä-vitamin D<sub>3</sub> wird unmittelbar durch eine temperaturabhängige Isomerisierung in das Secosteroid Cholecalciferol umgewandelt (GORING, 2018). Im Anschluss werden sowohl das exogen aufgenommene als auch das kutan gebildete Cholecalciferol an DBP gebunden in die Leber transportiert. Hier wird Cholecalciferol durch die 25-Hydroxylase zu Calcifediol (25(OH)D<sub>3</sub>) hydroxyliert (SAPONARO et al., 2020). Calcifediol stellt ein wichtiges Zwischenprodukt dar, das zwar biologisch weniger aktiv als die aktive Form Calcitriol (1,25(OH)D<sub>3</sub>) ist, in seiner Konzentration jedoch auch weniger reguliert wird, wodurch der Spiegel eng mit den Vitamin D Reserven des Körpers korreliert. Es stellt daher einen wichtigen klinischen Indikator dar, anhand dessen die Vitamin D Serumkonzentration bestimmt wird. Calcifediol wird insbesondere in der Niere, aber auch in anderen Zielgeweben durch die 1 $\alpha$ -Hydroxylase zur aktiven Form Calcitriol hydroxyliert (FRASER, KODICEK, 1970; SAPONARO et al., 2020).

Calcitriol wirkt im Körper über einen im Zellkern liegenden Steroidrezeptor, der als Vitamin D Rezeptor (VDR) bezeichnet wird. Auch der Zwischenmetabolit Calcifediol kann

an den VDR binden, jedoch mit einer deutlich geringeren Affinität (BROWN et al., 1999). Durch die Bindung an den Rezeptor kommt es zur Heterodimerisierung des VDR mit dem Retinoid X Rezeptor. Dieser wandert in den Zellkern, und kann dort an das *Vitamin D Response Element* in der Promotorregion von Calcitriol regulierten Genen binden (CARLBERG, 2019; LOWE et al., 1992). Des Weiteren kann Vitamin D über nicht genomische Mechanismen wirken, z.B. durch die Beeinflussung von Kalziumkanälen (ZMIJEWSKI, 2022). Der Abbau von Calcifediol und Calcitriol erfolgt durch die 24-Hydroxylase. Ein hoher Calcitriol Spiegel induziert den Abbau, wodurch sich der Körper vor einer Hypervitaminose schützt (BROWN et al., 1999).

Vitamin D spielt eine zentrale Rolle im Kalzium- und Phosphat-Haushalt, indem es deren Resorption im Darm und deren Einbau in den Knochen reguliert. Damit beteiligt sich Vitamin D maßgeblich am Knochenstoffwechsel (DELUCA, 2004). Außerdem nimmt Vitamin D Einfluss auf das Immunsystem (CHUN et al., 2014; GUNVILLE et al., 2013). Ebenso ist Vitamin D maßgeblich an der Gehirnentwicklung und neuronalen Prozessen beteiligt und übernimmt beispielsweise eine wichtige Funktion bei der Proliferation, Differenzierung und dem Wachstum von Neuronen. Es reguliert Neurotransmitter, neurotrophe Faktoren und das Kalzium-Gleichgewicht im Gehirn (BREWER et al., 2006; BREWER et al., 2001; NAVEILHAN et al., 1996).

### **2.2.2 Entstehung, Häufigkeit und Folgen einer Hypovitaminose D**

Die *National Institutes of Health* definieren Calcifediol Serumwerte unter 30 nmol/l (12 ng/ml) als manifesten Vitamin D Mangel. Konzentrationen zwischen 30 – 50 nmol/l (12-20 ng/ml) gelten als unzureichend, Konzentrationen über 50 nmol/l (20 ng/ml) werden als adäquate Vitamin D Versorgung angesehen (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2022).

In der „*Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland*“ bestand bei 56 % der Erwachsenen zwischen 18-79 Jahren und bei 45,6 % der Kinder und Jugendlichen zwischen 1-17 Jahren ein suboptimaler Vitamin D Wert < 50 nmol/l. 15,2 % der Erwachsenen wiesen Werte < 30 nmol/l und somit einen Mangel an Vitamin D auf (GOSSWALD et al., 2012).

Die *Deutsche Gesellschaft für Ernährung* (DGE) beschreibt Vitamin D unabhängig von der Ernährungsform als potenziell kritischen Nährstoff (DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR ERNÄHRUNG, 2012; GERMAN NUTRITION, 2012). Laut der *Nationalen Verzehrstudie II* des *Max-Rubner-Instituts* und des *Bundesforschungsinstituts für Ernährung und Lebensmittel* wurden in Deutschland über die Ernährung durchschnittlich 2 – 4 µg Vitamin D pro Tag zugeführt. Damit unterschritten 82 % der Männer und 91 % der Frauen die empfohlene Zufuhr von 20µg Vitamin D pro Tag (GERMAN NUTRITION, 2012; MAX RUBNER-INSTITUT, 2008). Insbesondere an Morbus Alzheimer erkrankte Patienten weisen gehäuft Mangel- und Unterernährungszustände auf. Eine Studie zeigte zudem eine Assoziation zwischen dem Ernährungszustand von Patienten mit Morbus Alzheimer und signifikanten Veränderungen der Biomarkern für Morbus Alzheimer (DOORDUIJN et al., 2019). Zudem kann die Vitamin D Resorption z.B. aufgrund von gastrointestinalen Erkrankungen beeinflusst werden (BILEZIKIAN et al., 2021; MAURYA, AGGARWAL, 2017).

Insgesamt spielt die Bedarfsdeckung des Vitamin D Spiegels über die Ernährung jedoch eine untergeordnete Rolle, da der Tagesbedarf an Vitamin D zu 80 – 90 % über die körpereigene Vitamin D Synthese gedeckt wird (BILEZIKIAN et al., 2021). Diese ist auf die UV-Exposition der Haut angewiesen. Faktoren wie der Breitengrad und damit der Einfallswinkel der Sonnenstrahlung, die Jahres- und Tageszeit sowie die Höhe der Luftverschmutzung nehmen Einfluss auf die Effektivität der Vitamin D Synthese (WACKER, HOLICK, 2013). Die DGE empfiehlt in Deutschland zur optimalen Bedarfsdeckung abhängig von der Jahreszeit eine tägliche Sonnenlichtbestrahlung von 5-20 min. Hierbei sollte ein Viertel der Körperoberfläche in der Mittagssonne exponiert werden. Bei Sonnenlichtbestrahlung am Vor- oder Nachmittag sollte die Bestrahlungszeit verdoppelt werden (DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR ERNÄHRUNG, 2012). Personen, die sich kaum oder gar nicht im Freien aufhalten, bilden eine Risikogruppe für Hypovitaminose D. Hierzu zählen insbesondere ältere Personen und chronisch Kranke, die sich durch Immobilität, Bettlägerigkeit oder Pflegebedürftigkeit dauerhaft innerhäuslich aufhalten. Auch Säuglinge, die direkter Sonne noch nicht ausgesetzt werden sollten, bilden eine Risikogruppe (MANSUR et al., 2022). Ein erhöhtes Risiko für eine Unterversorgung haben auch Menschen, die aus kulturellen, religiösen oder medizinischen Gründen die Größe der exponierten Hautfläche einschränken. So zeigte eine Studie, dass Burka-Trägerinnen häufiger unter Vitamin D Mangel leiden (AJMANI et al., 2016). Ob die Vitamin D Synthese durch das Auftragen von

Lichtschutzfaktor verhindert wird, wird kontrovers diskutiert. Ein internationales Gremium aus dreizehn Experten weist jedoch darauf hin, dass Sonnenschutz die Vitamin D Synthese nicht beeinflusst (NEALE et al., 2019; REICHRATH, 2009; WARING, POLLACK, 1987).

Neben der Sonneneinstrahlung spielt auch die Zusammensetzung der Haut eine entscheidende Rolle bezüglich der Vitamin D Syntheseleistung. Stark pigmentierte Haut kann weniger Vitamin D bilden als helle Hauttypen (AMES et al., 2021). Zudem beeinflusst die 7-DHC Konzentration der Haut die Vitamin D Synthese. In gealterter Haut sinkt der 7-DHC Gehalt und auch die Dicke der Haut nimmt im Alter ab. Passend dazu reduziert sich in älterer Haut die Syntheseleistung für Vitamin D um bis zu 50 % (HOLICK, 1995; MACLAUGHLIN, HOLICK, 1985; NEED et al., 1993). Zuletzt kann aufgrund unterschiedlicher Erkrankungen, Arzneimittelinteraktionen oder zunehmendem Alter die Leistung der Leber und Niere zur Vitamin D Synthese abnehmen. Diese Gründe resultierten darin, dass bis zu 90 % der älteren Generation unter einer Hypovitaminose D leiden (ANNWEILER et al., 2011).

Die Folgen einer Hypovitaminose D leiten sich von den diversen Funktionen ab, die Vitamin D übernimmt. Durch seine zentrale Rolle im Knochenstoffwechsel führt ein Vitamin D Mangel zu Mineralisierungsstörungen und Erweichung des Knochens. Bei Kindern kann dies zu schwerwiegenden Wachstumsstörungen oder bleibenden Deformitäten führen, wie sie bei der Rachitis auftreten. Bei Erwachsenen führt ein manifester Vitamin D Mangel zu Osteomalazie und –porose (BOUILLON et al., 2022a) Hierdurch steigt das Frakturrisiko. Neben Knochenmineralisierungsstörungen führt die Hypovitaminose D auch zu einer reduzierten Muskelkraft (BOUILLON et al., 2022a) Auch eine zunehmende Inzidenz nicht-skelettaler Erkrankungen wie arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus Typ 2, kardiovaskulären Erkrankungen, Autoimmun-, Infektions- und Krebserkrankungen werden mit niedrigeren Vitamin D Spiegel assoziiert (AMREIN et al., 2020; AO et al., 2021). Es wird eine erhöhte Infektanfälligkeit insbesondere der Atemwege beschrieben (GUNVILLE et al., 2013; THEODORATOU et al., 2014). Zudem wird eine mögliche Assoziation zwischen einer Hypovitaminose D und depressiven Verstimmungen sowie chronischer Müdigkeit diskutiert. Eine evidenzbasierte Aussage diesbezüglich ist aufgrund der limitierten Literaturlage jedoch noch nicht möglich (PARKER et al., 2017; ROY et al., 2021; ROY et al., 2014; SAJI PAREL et al., 2022).



## 2.3 Vitamin D Supplementierung & synthetische Vitamin D Analoga

### 2.3.1 Vitamin D Zufuhr und Supplementierung bei Risikogruppen

Die Hauptindikation zur Vitamin D Supplementierung bildet ein bestehender Vitamin D Mangel (BOUILLON et al., 2022b; DEB et al., 2020). Die DGE gibt bei Erwachsenen zur Aufrechterhaltung physischer und psychischer Funktionen einen täglichen Vitamin D Bedarf von 20 µg, für Säuglinge einen Referenzwert von 10 µg pro Tag an (DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR ERNÄHRUNG, 2012). Bei intakter endogener Synthese und ausreichender Vitamin D Zufuhr über die Ernährung ist zur Bedarfsdeckung keine Supplementierung notwendig.

Risikogruppen, deren endogene Vitamin D Synthese beispielsweise aufgrund von Immobilität und einer hieraus resultierenden geringen Sonnenexposition eingeschränkt ist, wird eine tägliche Supplementierung in Höhe des Referenzwertes von 20 µg Vitamin D (800 IE/d) empfohlen. Zur Vorbeugung von Knochenerkrankungen werden insbesondere geriatrischen Patienten sogar höhere Dosen bis 1000 IE/d empfohlen (DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR ERNÄHRUNG, 2012). Säuglinge, die aufgrund ihrer großen Körperoberfläche im Verhältnis zum Körpervolumen und der eingeschränkten Möglichkeit zur Temperaturregulation direkter Sonne nicht ausgesetzt werden sollen, sollten insbesondere im ersten Lebensjahr täglich 10 µg Vitamin D (400 IE/d) erhalten (RIZZOLI, 2021). Die Supplementierung kann mit unterschiedlichen natürlich vorkommenden Vitamin D Präparaten oder synthetisch hergestellten Vitamin D Analoga erfolgen und gewinnt zunehmend an klinischer und wirtschaftlicher Relevanz, was sich in steigenden Verordnungsraten widerspiegelt (LUDWIG, 2021). Cholecalciferol (Vitamin D<sub>3</sub>) bildet dabei die verordnungstärkste Gruppe, 2020 wurden 548,6 Millionen Tagesdosen verordnet (SOSA HENRIQUEZ, GOMEZ DE TEJADA ROMERO, 2020). Insbesondere 2020 stieg die Verordnungsraten stark an, was auf die zeitgleiche SARS-CoV-2 Pandemie zurückzuführen ist, da der Nutzen einer Vitamin D Supplementierung in Bezug auf Prophylaxe und Therapie einer SARS-CoV-2 Infektion kontrovers diskutiert wurde und Teile der Bevölkerung eigenmächtig Vitamin D Präparate zuführten (LUDWIG, 2021). Ergocalciferol (Vitamin D<sub>2</sub>) wird aus Pflanzen gewonnen und bietet sich daher z.B. zur Supplementierung für vegane und vegetarische Ernährungsformen an (GIUSTINA et al., 2020). Die enterale Absorption von

Ergocalciferol ist ebenso effizient wie die von Cholecalciferol, sodass sich die Bioverfügbarkeit beider Vitamin D Formen nicht relevant unterscheidet (BOREL et al., 2015). Beide Formen nehmen nach ihrer Aufnahme am Vitamin D Metabolismus teil und werden durch die 25- und 1 $\alpha$ -Hydroxylierung aktiviert.

Arzneimittelinteraktionen, Leber- und Nierenfunktionsstörungen oder weitere Pathomechanismen können die Kapazität der 25- oder 1 $\alpha$ -Hydroxylase minimieren und die Synthese der Vitamin D Präparate dadurch beeinträchtigen (LAM et al., 2018; THIEL et al., 2023). Zur Überwindung dieses Problems wurden Vitamin D Präparate wie Calcifediol, Calcitriol oder weiter modifizierte synthetische, hydroxylierte Vitamin D Analoga entwickelt. Calcifediol ist bereits an C<sub>25</sub> hydroxyliert und umgeht damit die hepatische 25-Hydroxylierung. Es ist polarer als Cholecalciferol, wird durch den Darm effektiver resorbiert und erreicht schneller seinen Wirkspiegel. Dadurch weist es eine kürzere Halbwertszeit (10-13 Tage) als Cholecalciferol (Halbwertszeit 19 Tage) auf, was bei Intoxikationen ein Vorteil ausmachen kann. Gemessen am Anstieg des Vitamin D Serumspiegels ist die Wirksamkeit von Calcifediol im Vergleich zu Cholecalciferol mindestens dreifach höher (CIANFEROTTI et al., 2015). Daneben sind für einige klinische Indikationen unterschiedliche synthetisch hergestellte Vitamin D Analoga zugelassen, die durch Modifizierungen der Strukturformel ein verändertes Wirk- und Nebenwirkungsprofil mitbringen (MAESTRO et al., 2019). Die synthetisch hergestellten Vitamin D<sub>3</sub> Analoga Alfacalcidol, Maxacalcitol und Calcipotriol leiten sich von Vitamin D<sub>3</sub> ab, während die Vitamin D<sub>2</sub> Analoga Paricalcitol und Doxercalciferol auf der Grundstruktur des pflanzlichen Ergocalciferols basieren. Alfacalcidol, Paricalcitol und Doxercalciferol werden zur Therapie des sekundären Hyperparathyreoidismus eingesetzt. In Japan sind zudem die Analoga Maxacalcitol und Falecalcitriol für diese Indikation zugelassen (BOLLERSLEV et al., 2015; MAZZAFERRO et al., 2007). Calcitriol, Tacalcitol, Calcipotriol und in Japan auch Maxacalcitol werden bei Psoriasis vulgaris verschrieben (LUNG et al., 2022). Außerdem werden Calcitriol, Alfacalcidol und Eldecalcitol zur Vorbeugung und Therapie von Osteoporose eingesetzt (BROWN, 2001; MAESTRO et al., 2019). Hier wird einerseits bei Erkrankungen wie Osteoporose oder sekundärem Hyperparathyreoidismus genutzt, dass Vitamin D in den Knochenstoffwechsel eingreift, indem es die Kalzium- und Phosphathomöostase reguliert. Andererseits finden die antiproliferativen, zelldifferenzierungsfördernden und immunsuppressiven Wirkungen einzelner Vitamin D Analoga beispielsweise bei der

Behandlung der Psoriasis vulgaris Anwendung (MAESTRO et al., 2019). Tabelle 1 gibt einen Überblick über Indikationen und Wirkungsweisen zugelassener Vitamin D Analoga. Der genaue strukturelle Aufbau und die klinische Relevanz der Modifizierungen, der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Vitamin D Analoga, werden in Kapitel 5.4.1 diskutiert.

Tabelle 1 Überblick über Indikation zugelassener Vitamin D Analoga und ihr Wirkmechanismus

<b>Indikation</b>	<b>Zugelassene Vitamin D Analoga</b>	<b>Wirkmechanismus</b>
Rachitis Osteomalazie	Cholecalciferol, Ergocalciferol, Calcifediol, Calcitriol	Erhöhung der Resorption von Kalzium und Phosphat im Darm und der Niere
Osteoporose renale Osteopathie	Calcitriol, Alfacalcidol, Eldecalcitol ( <i>Japan</i> )	Erhöhung der Knochendichte  (CIANFEROTTI et al., 2015)
Psoriasis vulgaris	Calcitriol, Calcipotriol, Tacalcitol, Maxacalcitol ( <i>Japan</i> )	Inhibition der Hyperproliferation epidermaler Keratinozyten und T-Lymphozyten  Inhibition von Chemokinen, die Psoriasis vulgaris triggern  (LUNG et al., 2022)
Hypoparathyreoidismus	Calcitriol, Alfacalcidol	Ausgleich des Vitamin D Mangels, der durch den Parathormonmangel entsteht  (BOLLERSLEV et al., 2015; PETERSENN et al., 2019)
Chronische Niereninsuffizienz, Hyperparathyreodismus	Calcitriol, Doxercalciferol, Alfacalcidol, Paricalcitol, Maxacalcitol ( <i>Japan</i> ), Falecalcitriol ( <i>Japan</i> )	Reduktion der Parathormon-Freisetzung  (BROGAN et al., 2020; KIM, SPRAGUE, 2002; MAZZAFERRO et al., 2007)

Die Vitamin D Analoga werden zukünftig an wirtschaftlicher Relevanz gewinnen, da die Inzidenz unterschiedlicher Indikationen, bei denen Vitamin D und Vitamin D Analoga zugelassen sind, stetig zunimmt. Beispielsweise kommen unterschiedliche Vitamin D Analoga bei fortgeschrittener Niereninsuffizienz zum Einsatz und bis 2040 ist mit einem Anstieg dialysepflichtiger Patienten um 20-23 % zu rechnen (HACKL et al., 2021).

Darüber hinaus sind Vitamin D Analoga eine wichtige Säule in der Therapie des postoperativen Hypoparathyreoidismus, dessen Inzidenz aufgrund steigender Schilddrüsenoperationen zunimmt (SCHAFFLER, 2010).

Der Einsatz von Vitamin D Analoga in Bezug auf Morbus Alzheimer wurde erstmalig im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht.

### ***2.3.2 Nebenwirkungen und Risiken einer Vitamin D Supplementierung***

Eine beschriebene Nebenwirkung einer Vitamin D Supplementierung, insbesondere wenn hierfür Calcitriol eingesetzt wird, ist die Hyperkalzämie (TINAWI, 2021). Diese kann zu gastrointestinalen Beschwerden, Appetitlosigkeit, Übelkeit und Erbrechen führen. Auch ein erhöhtes Auftreten von Nephrolithiasis wird im Rahmen einer Hyperkalzämie beschrieben. Zudem können psychische Symptome wie Bewusstseinsstörungen, Psychosen oder Depressionen ausgelöst werden. Letztlich kann eine Hyperkalzämie in schweren Fällen auch zu Herzrhythmusstörungen oder zum Tode führen.

Toxische Effekte werden ab Serumkonzentrationen von 150 ng/ml beobachtet (AVENELL et al., 2014). In unterschiedlichen Studien ging die Anwendung von Vitamin D Analoga mit einem signifikant niedrigeren Risiko zur Entwicklung einer Hyperkalzämie einher im Vergleich zur Anwendung von Calcifediol oder Calcitriol (ERBEN et al., 1997; SPRAGUE et al., 2003; TAMURA et al., 2005).

## 2.4 Fragestellung der Arbeit

Die Alzheimer-Demenz gewinnt zunehmend an Relevanz und bisher existiert keine ausreichende kausale Therapie. Vitamin D steht über unterschiedliche Mechanismen mit Morbus Alzheimer in Verbindung und ein möglicher Nutzen einer Vitamin D Supplementierung wird kontrovers diskutiert. Multimorbidität und Polypharmazie können dazu führen, dass die Verstoffwechslung von natürlich vorkommenden Vitamin D Präparaten wie Ergocalciferol und Cholecalciferol insbesondere bei älteren Patienten eingeschränkt ist.

Daher konzentriert sich diese Arbeit auf den Nutzen synthetischer Vitamin D Analoga in Bezug auf die Alzheimer-Demenz, da dieser Zusammenhang bisher nicht untersucht wurde. Vitamin D Analoga weisen durch Modifizierungen ihrer Strukturformeln veränderte Wirk- und Nebenwirkungsprofile auf, wodurch sie im Vergleich zu natürlich vorkommenden Vitamin D Präparaten Vorteile bei unterschiedlichen Grunderkrankungen bieten und bei älteren an Morbus Alzheimer erkrankten Patienten mit bestehender Multimorbidität und Polypharmazie effektiver eingesetzt werden könnten. Ziel der vorliegenden Arbeit war die systematische Untersuchung der Effekte therapeutisch genutzter Vitamin D Analoga auf relevante Pathomechanismen der Alzheimer-Demenz. Hierzu wurde der Einfluss von Vitamin D<sub>2</sub> Analoga Paricalcitol und Doxercalciferol und der Vitamin D<sub>3</sub> Analoga Maxacalcitol, Calcipotriol und Alfacalcidol auf die A $\beta$ -Homöostase und das IL-1 $\beta$ -Level untersucht. In unterschiedlichen Zelllinien sowie in murinen Hirnproben wurden die Auswirkungen einer Inkubation mit Vitamin D Analoga auf unterschiedliche an der A $\beta$ -Produktion und Degradation beteiligter Enzyme bestimmt. Dies geschah einerseits auf Proteinebene, andererseits wurden Genexpressionen und die Sekretase Aktivität analysiert. Verglichen wurden die Effekte mit denen der reinen Lösungsmittelkontrolle sowie mit einer Inkubation von Calcifediol. Es wurde untersucht, ob signifikante Unterschiede zwischen den Vitamin D Analoga bestehen und ob die Substitution mit Vitamin D Analoga der Substitution mit Calcifediol über- oder unterlegen ist. Darüber hinaus wurde analysiert, inwiefern sich die Effektstärken unterscheiden, wenn die Substitution bei bestehendem Vitamin D Mangel oder bei ausreichendem Vitamin D Status erfolgt.

Diese Arbeit soll dadurch zum Verständnis beitragen, inwiefern Vitamin D Analoga einen präventiven und therapeutischen Ansatzpunkt der Alzheimer-Demenz bilden.

### 3 Material und Methodik

#### 3.1 Geräte

Tabelle 2 Zur Durchführung der Experimente verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
4°C-Schüttler Rocky	Fröbel
-20°C Gefrierschrank Premium	Liebherr
-80°C Gefrierschrank Hera Freeze	Thermo Electron
8-Kanal-Multipipette, elektronisch	Eppendorf
Analysewaage	Sartorius
Brutschrank 37°C	Heraeus
Einfrierbox Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene
ELISA-Reader Multiscan EX	Thermo Scientific
Fluorometer Safire2	Tecan
Gelkammer Novex Mini- Cell	Life Technologies
Hamilton Pipette	Hamilton
Lichtmikroskop	Leica
Magnet-Heizrührer MR2002	Heidolph Instruments
Mikrowelle Micromat	AEG
Minilys Homogenisator	Peqlab
Multipipette plus	Eppendorf
NanoDrop 8000 UV-Vis-Spektrophotometer	Thermo Scientific
N <sub>2</sub> -Abdampfvorrichtung	VLH
N <sub>2</sub> -Tank GT 140 -196°C	Air Liquide
OD Lesegerät für 96-Lochplatten	Thermo Fisher

PCR-Zykler PRIMUS 25 ADVANCED	Peqlab
pH-Meter 766	Calimatic Knick
PikoReal PCR System	Thermo Scientific
Pipetboy Comfort	INTEGRA Biosciences AG
Pipetten-Set Research	Eppendorf
Power-Supply für Tankblot	LKB Bromma
Power-Supply Model 200 / 2.0 für Gelelektrophorese	BioRad
Reagenzglasschüttler Multi-Reax	Heidolph
Rotor TLA-100 für Ultrazentrifuge	Beckmann Coulter
Röntgenkassette Quanta III	Dupont
Scanner CanoScan LiDE50	Canon
Software Analyst 1.5	AB Sciex
Software Image Gauge V3.45	Fuji Science Lab
Software PikoReal 2.1	Thermo Scientific
Software SPSS Statistics 22	IBM Corporation
Sterilbank HeraSafe	Heraeus
Teflonhomogenisator	B.Braun
Teflonschaber	Neolab
Thermomixer comfort	Eppendorf
TransBlot Gel-Halter mit Schwämmen	BioRad
Transferkammer TransBlot Cell	BioRad
Überkopfschüttler Reax2	Heidolph
Ultrazentrifuge	Beckmann
Vortex Genie2	Bender & Hobein
Wasserbad	GFL

Wippschüttler SkyLine Shaker S-4	ELMI
Zentrifuge 5415D	Eppendorf
Zentrifuge Avanti J-20 XP	Beckmann Coulter
Zentrifuge Biofuge Pico	Heraeus
Zentrifuge Biofuge Primo	Heraeus
Zentrifuge Fresco21	Heraeus
Zentrifuge Labfuge GL Heraeus	Heraeus

### 3.2 Chemikalien

Tabelle 3: Zur Durchführung der Experimente verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
$\alpha$ -Sekretase Substrat (#565767)	Calbiochem
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich
$\beta$ -Sekretase Substrat (#565758)	Calbiochem
$\beta$ -Sekretase Inhibitor II	Merck Millipore
$\gamma$ -Sekretase Inhibitor IV (#565788)	Calbiochem
$\gamma$ -Sekretase Substrat (#565764)	Calbiochem
1-Step PNPP	Thermo Scientific
Alfacalcidol	MedChem Express
Bacitracin	Santa Cruz Biotechnology
BCA-Lösung	Sigma Aldrich
Bromphenolblau	Carl Roth
BSA	Carl Roth
BSA, fettsäurefrei	Sigma Aldrich
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	Merck Millipore



Calcifediol	MedChem Express
Calcipotriol	MedChem Express
Chloroform, HPLC grade	Merck Millipore
Complete Protease Inhibitor Cocktail (- EDTA)	Roche Diagnostics
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	Carl Roth
DMEM	Sigma Aldrich
DMSO	Carl Roth
Doxercalciferol	MedChem Express
ECL-Hyperfilm	Amersham
ECL-Lösung (Western Lightning Plus ECL)	Perkin Elmer
EDTA (Titrplex III)	Carl Roth
Entwicklerlösung GBX	Kodak
Ethanol, HPLC grade	Sigma Aldrich
Fast SYBR Green Master Mix	Life Technologies
FCS	PAN Biotech
Fixierlösung	Kodak
Glycerin	J.T. Baker
Glycin	AppliChem
HEPES, ph 7,4	Carl Roth
HCL	VWR
H <sub>2</sub> O, HPLC grade	VWR
H <sub>2</sub> O, RNase-frei	Qiagen
Hygromycin B	PAN Biotech
Isopropanol, HPLC grade	VWR
KCL	Merck Millipore
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 3H <sub>2</sub> O	Merck Millipore

L-Glutamin	Sigma Aldrich
Lipofectamin TM 2000	Invitrogen
Maxacalcitol	MedChem Express
Methanol, HPLC grade	VWR
MgCl <sub>2</sub>	Sigma Aldrich
MEM nicht-essentielle Aminosäure Lösung	Sigma Aldrich
Milchpulver, blotting grade	Carl Roth
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	Carl Roth
NaCl	AppliChem
NaOH	Carl Roth
Natrium-Desoxycholat	Sigma Aldrich
Natriumpyruvat	Sigma Aldrich
NEM	Santa Cruz Biotechnology
NEP-Substrat	R&D Systems
Nonidet P40 Substitute	Substitute Fluka
Opti-MEM	Life Technologies
Paricalcitol	MedChem Express
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Sigma Aldrich
Protease-Inhibitor-Cocktail mit AEBSF	Merck Millipore
Proteingößemarker Page Ruler	Promega
Protein-G-Sepharose	Sigma Aldrich
SDS	Sigma Aldrich
Saccharose	Sigma Aldrich
Synthetisches Peptid Aβ40	Bachem
Tricin	Biomol
Tris/HCL	Sigma Aldrich

Triton X-100	Merck Millipore
Trizma Base	Sigma Aldrich
Trizol	Life Technologies
Trypsin-EDTA-Lösung	Sigma Aldrich
Tween-20	Sigma Aldrich
ZnCl <sub>2</sub>	Merck

### 3.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4 Zur Durchführung der Experimente verwendete Verbrauchsmaterialien

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
96-Lochplatte MaxiSorp, schwarz	VWR
96-Lochplatte, transparent	Greiner
Cryo Tube Vials	Nunc
ECL-Hyperfilm	Amersham
Einfrierröhrchen 1,8 ml	Nunc
Falconröhrchen, 15 ml/ 50 ml	Sarstedt
Filterpapier	Whatman
Fotokopierfolien TypeC A4	Xerox
Glasflaschen, 2 ml	NeoLab
Glaspipetten	NeoLab
Kanülen (0,6 mm x 25 mm / 0,55 mm x 25 mm)	Becton, Dickinson, Company
Keramik-Kügelchen für Minilys-Homogenisator, 1,4 mm	Peqlab
Multitip Aufsätze für Multistep-Pipette	Eppendorf
Nitrozellulosemembran Porengröße 0,2 µm / 0,45 µm	Whatman
Novex Pre-Cast gels 10-20% Tricine 1,0 mm x 10well, 12 well	Invitrogen

Pasteurpipetten	VWR
Reaktionsgefäße 1,5 ml/ 2 ml	Eppendorf
Tris-Tricin-Gele, 10-20 %	Anamed Gelelektrophorese
Verschlussfolie für RT-PCR-Platten	Thermo Scientific
Wheaton-Röhrchen	Wheaton
Zellkultur 6-Lochplatte / 24-Lochplatte / 96-Lochplatte	Falcon
Zellkulturschale 100 x 20 mm	Sarstedt

### 3.4 Antikörper

Tabelle 5 Verwendete Antikörper

Bezeichnung	Hersteller	Epitop/ Klonalität	Verwendung
<b>ab2077</b>	Abcam, Cambridge, UK	BACE1 (AS 485-501) / polyklonal	BACE1- Western Blot
<b>AF1182</b>	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA	NEP, polyklonal	NEP-Aktivitätsmessung
<b>Mbs492139</b>	MyBioSource, San Diego, CA, USA	freier C-Terminus des humanen sAPP $\beta$ / polyklonal	sAPP $\beta$ - Western Blot
<b>P0260</b>	Dako, Hamburg, Deutschland	Maus-IgG / polyklonal	HRP-gekoppelter Sekundärantikörper für Western Blot
<b>W02</b>	Millipore, Billerica, MA, USA	APP (Aminosäure 5-10 der A $\beta$ -Sequenz) / monoklonal	Gesamt-A $\beta$ - Immunpräzipitation; sAPP $\alpha$ -Western Blot/ A $\beta$ -Gesamtdegradation
<b>W401B</b>	Promega, Mannheim, Deutschland	Kaninchen-IgG / polyklonal	HRP-gekoppelter Sekundärantikörper für Western Blot

### 3.5 Kits

Tabelle 6 Verwendete Kits

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
<b>Cytotoxicity Detection Kit</b>	LDH-Test	Roche
<b>High Capacity cDNA RT Kit</b>	komplementäre DNS-Synthese	Thermo Fisher Scientific
<b>Human IL-1<math>\beta</math> ELISA Kit</b>	IL-1 $\beta$ -Bestimmung	Abcam

### 3.6 Primer

Tabelle 7 Verwendete Primer

Gen (Protein)	Forward	Reverse
<i>ACTB</i> ( $\beta$ -Aktin)	5'-CTT CCT GGG CAT GGA GTC-3'	5'-AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG-3'
<i>BACE1</i> (BACE1)	5'- GCC TAT GCT GAG ATT GCC AGG-3'	5'-GGA GAA GAG GTT GGG AAC GTG-3'
<i>IDE</i> (IDE)	5'- TGC CCT AGA CAG GTT TGC AC-3'	5'-CTC CAG GCA TCA TTC ATC ACA T-3'
<i>MME</i> (NEP)	5'-GAT CAG CCT CTC GGT CCT TG-3'	5'-TGT TTT GGA TCA GTC GAG CAG-3'
<i>NCSTN</i> (Nicastrin)	5'-CTG TAC GGA ACC AGG TGG AG-3'	5'-GAG AGG CTG GGA CTG ATT TG-3'
<i>TBP</i> (TATA-box binding protein)	5'- CGG AGA GTT CTG GGA TTG T-3'	5'-GGT TCG TGG CTC TCT TAT C-3'

### 3.7 Zelllinien

Tabelle 8 Verwendete Zelllinien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Beschreibung</b>
N2a Wildtyp	Murine Neuroblastom-Zelllinie, zur Verfügung gestellt durch Prof. Dr. Kins, Humanbiologie und Humangenetik, Technische Universität Kaiserslautern
SH-SY5Y Wildtyp	Humane Wildtyp-Neuroblastom-Zelllinie
SH-SY5Y APP <sub>695</sub>	SH-SY5Y mit stabiler Expression von humanem APP <sub>695</sub> / Hygromycin B-Resistenz / Hergestellt von Dr. Heike Grimm

### 3.8 Murines Material

*(entsprechend (GRIMM et al., 2014))*

Alle Tierversuche erfolgten unter strikter Einhaltung des deutschen Tierschutzgesetzes. (Nummer des Tierschutzantrags: 17/2011) und in Kooperation mit der Klinik für Innere Medizin V des Universitätsklinikums des Saarlandes unter der Leitung von Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bals.

Die Bezeichnung, der Hersteller und die Herkunft der Mauslinien sind Tabelle 9 zu entnehmen.

Tabelle 9 Verwendete Mauslinien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Beschreibung/ Hersteller / Herkunft</b>
WT-Mäuse (C57BL/6)	Weibliche Wildtyp Mäuse / Charles River, Sulzfeld, Deutschland zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Matthias Laschke (Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg)

VitD <sub>3</sub> -/- (C57BL/6)	Mäuse	Weibliche Vitamin D <sub>3</sub> - defiziente Mäuse / Charles River, Sulzfeld, Deutschland / zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Dr. Robert Bals (Klinik für Innere Medizin V, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg)
------------------------------------	-------	---

Die ausschließlich weiblichen Mäuse wurden verhaltensgerecht in einer Gruppengröße von 7-10 Tieren pro Käfig untergebracht. Entsprechend eines zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus wurden die Tiere von 7 Uhr bis 19 Uhr beleuchtet. Die Haltung erfolgte unter Ad-libitum-Fütterung bei konstanter Temperatur von 20-22 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 50-60 %.

### ***3.8.1 Generierung einer Hypovitaminose D<sub>3</sub> im murinen Modell***

Zur Generierung einer Hypovitaminose D wurden weibliche C57BL/6 Mäuse ab ihrer sechsten Lebenswoche für insgesamt sechs bis neun Monate mit einem Futter ohne Vitamin D (C1017/Altromin, Lange, Deutschland) gefüttert.

Die Kontrollgruppe hingegen erhielt ein Futter mit 500 IE/kg Vitamin D<sub>3</sub> (C1000/Altromin, Lange, Deutschland). Die Zusammensetzung der Kalorienmenge und der restlichen Nährwerte, insbesondere der Protein-, Fett-, Kohlenhydrat-, Ballaststoff- und Mineralgehalt war in beiden Futtermitteln identisch.

### ***3.8.2 Tötung der Mäuse und Präparation der Maushirne***

Die Tötung und Präparation der Wildtypmäuse erfolgten gemeinsam mit Anna Lauer und Dr. rer. nat. Lisa Nalbach. Die Tötung und Präparation der Vitamin D Mangeltiere wurden kooperativ von Dr. Johannes Lehmann, Dr. Christian Herr, Inge Tomic und Dr. Janine Mett durchgeführt.

Den Versuchstieren wurde intraabdominell eine letale Dosis an Narkosemittel injiziert. Nach Todeseintritt wurden die Versuchstiere auf einer Styroporunterlage in Bauchlage an den Extremitäten fixiert. Das Fell über dem Hinterkopf wurde mit einer Pinzette angehoben und mittels eines medialen Sagittalschnitts durchtrennt. Die Schädelkalotte wurde eröffnet, um das nun freiliegende Gehirn zu präparieren. Nachdem das frisch entnommene Gehirn in NaCl

gewaschen wurde, konnte es zur Lagerung in ein Kryogefäß überführt werden und für spätere Experimente in flüssigem Stickstoff schockgefroren werden. Die Lagerung erfolgte ebenfalls in flüssigem Stickstoff.

### 3.9 Zellbiologische Methoden

#### 3.9.1 Kultivierung und Kryokonservierung eukaryotischer Zellen (nach (FRESHNEY, 2011))

##### Phosphate buffered saline (PBS)

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O

1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Einstellen des pH-Werts auf 7,5 mit HCl

Die Kultivierung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten eukaryotischen Zellen erfolgte im Inkubator bei einer konstanten Temperatur von 37 °C unter 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und einer Luftfeuchtigkeit von 95 %. Bis zum Erreichen von 90-100 % Konfluenz wurden die Zellen mit 10 ml Medium in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 10 cm angereichert. Die Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien ist in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10 Verwendete Zellkulturmedien

Zelllinie	Zellkulturmedium
N2a WT	DMEM 0,1 mM MEM Aminosäure-Lösung 10 % (v/v) FCS 100 U/ml Penicillin 0,1 mg/ml Streptomycin 2 mM L-Glutamin 1 mM Natriumpyruvat
SH-SY5Y WT	DMEM 0,1 mM MEM Aminosäure-Lösung 10 % (v/v) FCS



SH-SY5Y APP<sub>695</sub>

DMEM

0,1 mM MEM Aminosäure-Lösung

10 % (v/v) FCS

400 µg/ml Hygromycin B

Zur Überführung der Zellen erfolgte nach Absaugung des verbrauchten Kulturmediums ein einmaliger Waschschrift mit 5 ml sterilem PBS. Danach wurden die Zellen nach zweiminütigem Einwirken von 1,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung mit einer Glaspipette abgelöst und vereinzelt. Die Zellsuspension wurde mit 8,5 ml frischem, vorgewärmten Medium aufgefüllt und abhängig von der verwendeten Zelllinie wurden 0,5-3 ml in neue Kulturschalen passagiert, welche ebenfalls mit frischem Medium auf 10 ml aufgefüllt wurden. Für nachfolgende Experimente erfolgte die Aussaat der Zellsuspension auf 6-, 12-, 24-, oder 96-Lochplatten.

Um die Zellen langfristig lagern zu können, wurden Kryokulturen angelegt. Hierzu wurden die Zellen wie zuvor beschrieben mit 5 ml PBS gewaschen und mit 1,5 ml Trypsin/EDTA von den Zellschalen abgelöst und in 4,5 ml Kulturmedium vereinzelt. Diese Zellsuspension wurde zum folgenden Zentrifugationsschritt in Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 355 x g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen, während das Zellpellet in 1,5 ml standardisiertem Kulturmedium DMEM (*engl. Dulbecco's modified Eagle's medium*), welches zu 20 % mit fetalem Kälberserum (*engl. fetal calf serum*, FCS) angereichert wurde, resuspendiert wurde. Im Anschluss wurde die Lösung mit weiteren 1,5 ml DMEM mit 20 % FCS und 20 % Dimethylsulfoxid (DMSO) verdünnt. Im nächsten Schritt wurde die Suspension in je zwei Kryogefäße zu jeweils 1,5 ml aliquotiert. Diese wurde in einer Einfrierbox aus Styropor auf -80 °C heruntergekühlt und anschließend im flüssigen Stickstoff gelagert.

Zur Reaktivierung wurden 8,5 ml vorgewärmtes Kulturmedium in ein Zentrifugenröhrchen vorgelegt und die aufgetauten Gefrierkulturen darin aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde für 5 min bei 355 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet wurde in 10 ml frischem Kulturmedium resuspendiert und dann gleichmäßig in eine 10 cm Schale überführt.

Die gesamten Anwendungen an den eukaryotischen Zellen wurden steril in einer dafür vorgesehenen Sterilwerkbank durchgeführt.

### **3.9.2 Inkubation von Zellen mit Vitamin D Analoga** (*Neu-Etablierung modifiziert nach (GRIMM et al., 2014)*)

Für alle Inkubationen wurden konfluente Zellen, die zuvor mindestens zweimal passagiert wurden, verwendet. Vor Inkubationsbeginn wurden die Zellen auf 6-, 24- oder 96- Lochplatten ausgesät. Bei einer erreichten Zellkonfluenz von 80-90 % erfolgte die Reduktion des FCS-Gehaltes im Medium für 16 h auf 0,1 %-2,5 %, um Nebeneffekte des im FCS enthaltenen Vitamin D zu minimieren.

Da Vitamin D und seine Analoga aufgrund ihrer Lipophilie zur Adhärenz an Kunststoffen neigen, wurde zur Herstellung der Stocklösungen und des Inkubationsmediums Glasgefäße genutzt.

Die Stocklösungen des in Ethanol (EtOH) gelösten Vitamin D bzw. der Vitamin D Analoga wurden zwischen den Inkubationen bei -80 °C gelagert. Das Inkubationsmedium bestand aus DMEM, welches mit 0,1-2,5 % FCS und 100 nM Vitamin D bzw. Vitamin D Analoga versetzt wurde. Das Kontrollmedium wurde entsprechend des Lösungsmittels mit 100 nM EtOH angereichert, hierbei wurde darauf geachtet, dass das EtOH-Medium-Verhältnis bei maximal 1:1000 lag, um keine zytotoxischen Effekte des EtOH zu generieren.

Die Inkubation der SH-SY5Y WT und SH-SY5Y APP<sub>695</sub> Zelllinien verlief für insgesamt 24 h in zwei Inkubationsschritten. Zunächst erfolgte für 8 h eine Vorinkubation, nach Ablauf dieser Zeit wurde das Inkubationsmedium gewechselt und in gleicher Konzentration (100 nM) für weitere 16 h inkubiert.

Zur Messung der A $\beta$ <sub>40</sub>-Degradation auf N2a-Zellen erfolgte entsprechend der Dissertation von Dr. Janine Mett zunächst für 18 h eine Inkubation mit 100 nM Vitamin D bzw. Vitamin D Analoga in 0,1 % FCS und dann ein 6-stündiger zweiter Inkubationsschritt, in dem das Inkubationsmedium zusätzlich mit 0,5  $\mu$ g/ml humanem A $\beta$ <sub>40</sub> versetzt wurde.

### **3.9.3 Zytotoxizitätsbestimmung mittels Laktatdehydrogenase-Test** (entsprechend den Herstellerangaben Roche/ Cytotoxicity Detection Kit, Version Mai 2012)

Nach Inkubation der eukaryotischen Zellen mit Vitamin D bzw. den Vitamin D Analoga erfolgte eine Bestimmung der Zytotoxizität. Hierfür wurde das *Cytotoxicity Detection Kit* der Firma Roche nach Herstellerangaben eingesetzt.

Die Methode beruht auf der Aktivitätsbestimmung der Laktatdehydrogenase (LDH) im Zellmedium, welche sich direkt proportional zur Anzahl der geschädigten Zellen verhält. Physiologisch liegt LDH im Zytosol vor, bei einem Zellschaden wie beispielsweise einer Nekrose verringert sich die Plasmamembran-Integrität und LDH tritt in den Extrazellularraum über, wodurch es im Medium messbar wird.

Diese Messung des freigesetzten LDH geschieht in zwei Reaktionsschritten. Zunächst oxidiert LDH Laktat zu Pyruvat, gleichzeitig wird Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid ( $\text{NAD}^+$ ) zu  $\text{NADH}+\text{H}^+$  (reduzierte Form von NAD) reduziert. Die beiden Protonen des  $\text{NADH}+\text{H}^+$  werden in einem zweiten Reaktionsschritt durch den Katalysator Diaphorase auf Tetrazoliumsalz INT übertragen. Hierdurch entsteht Formazan, dessen rote Farbe mittels Absorptionsmessung bei 491 nm messbar ist. Um Referenzwerte zu gewinnen, wurde eine zuvor mit 1 % (v/v) TritonX100 abgetötete Positivkontrolle als Standardreihe verdünnt und entsprechend den Herstellerangaben vermessen.

## **3.10 Proteinbiochemische Methoden**

### **3.10.1 Probenverarbeitung**

(nach Dissertation Dr. Verena Burg, Universität des Saarlandes, (BURG, 2014))

#### **3.10.1.1 Verarbeitung konditionierter Medien**

Nach der Inkubation der Vitamin D Analoga wurde das konditionierte Zellmedium gewonnen und bei 13000 x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert, damit sich abgestorbene Zellen sedimentierten. Der Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt, um in nachfolgenden Experimenten beispielsweise die ins Medium sezernierten Proteine zu untersuchen.

### 3.10.1.2 Zellaufschluss

Die Zellen wurden nach Beendigung der Vitamin D Analoga Inkubation zweimal mit PBS gewaschen. Hierdurch konnte der nun für 1 h auf Eis inkubierte Lysepuffer optimal einwirken und die Zellen chemisch aufschließen. Je nach nachfolgendem Experiment wurden unterschiedliche Lysepuffer verwendet.

#### Lysepuffer für BACE1 Western Blot

50 mM Tris/HCl pH 7,4  
 150 mM NaCl  
 2 mM EDTA  
 0,1 % (v/v) Nonidet P-40  
 0,1 % (v/v) Triton X-100 in ddH<sub>2</sub>O

#### Lysepuffer für NEP-Aktivitätsmessung

20 mM Tris/HCl pH 7,4  
 10 % (w/v) Saccharose  
 0,5 % (v/v) Triton X-100 in ddH<sub>2</sub>O  
 frische Zugabe von Protease- Inhibitor -Cocktail ohne EDTA  
 (Complete-Tablette gelöst in ddH<sub>2</sub>O)

Die lysierten Zellen wurden nach der Einwirkzeit mittels Teflonschaber vom Boden der Zellkulturschale gelöst und in ein Gefäß überführt. Die Proben wurden für 5 min bei 13000 x g und 4 °C zentrifugiert, um Zellfragmente zu sedimentieren. Im Anschluss wurden die Lysate entweder direkt für nachfolgende Experimente verwendet oder bei -20 °C gelagert.

### 3.10.1.3 Herstellung von Homogenaten aus Gewebe

Die wie in Kapitel 3.8.2 beschrieben präparierten Maushirne wurden mechanisch mittels Minily-Homogenisator aufgeschlossen.

Hierzu wurden die Hirne zuvor in eiskalter 0,9 % NaCl Lösung gewaschen und gemeinsam mit 500 µl Reinstwasser bzw. H<sub>2</sub>O, welches den Reinheitsgrad der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie erfüllt (*engl. high performance liquid chromatography*, HPLC grade) und Keramikkügelchen in ein Reaktionsgefäß überführt. Durch eine 30 sec Beschleunigung der Keramikkügelchen auf 5000 U/min wurden die Maushirne vollständig homogenisiert.

#### 3.10.1.4 Generierung von postnukleären Fraktionen aus SH-SY5Y WT Zellen

##### EDTA Saccharosepuffer

10 mM Tris  
200 mM Saccharose, pH 7,5  
Proteaseinhibitor-Cocktail  
EDTA

Zur Gewinnung von postnukleären Fraktionen (PNF) wurden SH-SY5Y WT Zellen zuerst mit PBS gewaschen und anschließend in EDTA-Saccharosepuffer aufgenommen und in Reaktionsgefäße überführt. Nach Zugabe von Keramikkügelchen wurden die Gefäße im Minilys-Homogenisator bei 3000 U/min für 20 sec beschleunigt und die Zellen dadurch ebenfalls mechanisch aufgeschlossen.

#### 3.10.1.5 Inkubation der Hirnhomogenate und der PNFs

Die Homogenate der Maushirne sowie die wie in Kapitel 3.10.1.4 beschriebenen generierten PNFs der SH-SY5Y WT Zellen wurden mittels Bicinchoninsäure (*engl. bicinchoninic acid*, BCA; Verweis auf Kapitel 3.10.2) Test auf eine einheitliche Proteinkonzentration eingestellt und im Anschluss auf Eis für 15 min mit 100 nM Vitamin D, Vitamin D Analoga oder EtOH als Kontrolle inkubiert.

#### 3.10.1.6 Membranpräparation aus SH-SY5Y WT PNFs

Zur Präparation der Membranen aus den inkubierten PNFs wurde eine Ultrazentrifuge verwendet. Die Zentrifugation erfolgte für 75 min bei 55.000 rpm unter einer Temperatur von 4 °C. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen und das abgesetzte Membranpellet konnte in EDTA-Saccharosepuffer resuspendiert werden. Die Proben wurden mehrfach durch Kanülen sinkenden Durchmessers aufgenommen und wieder abgelassen, um die vollständige Lösung der Pellets zu unterstützen.

### **3.10.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bicinchoninsäure - Test**

(basierend auf (SMITH *et al.*, 1985); modifiziert nach Dissertation Dr. Tatjana Rothhaar (ROTHHAAR *et al.*, 2012))

Die Proteinkonzentration der Proben wurde mittels BCA-Testes ermittelt. Hierdurch konnten die Proben im Anschluss auf den gleichen Proteingehalt eingestellt werden, wodurch eine höhere Vergleichbarkeit erreicht wurde.

Der Test beruht darauf, dass Proteine im alkalischen Milieu Cu(II) zu Cu(I) reduzieren. Cu(I) reagiert mit BCA zu einem violetten Komplex, dessen Absorption bei 560 nm messbar ist. Die vermessene Absorption korreliert direkt proportional mit der enthaltenen Proteinmenge.

BCA-Reaktionslösung

4 % (w/v) CuSO<sub>4</sub> x 5H<sub>2</sub>O

1:39 (v/v) Bicinchoninsäure

Als Referenz wurde mittels in H<sub>2</sub>O gelöstem Rinderserum Albumin (*engl. bovine serum albumin*, BSA) eine Verdünnungsreihe mit Werten zwischen 0,1 mg/ml bis 1,1 mg/ml angesetzt und bei jeder Messung mitbestimmt. Diese Standardreihe sowie 0,5 µl bis 10 µl der zu vermessenden Proben wurden in eine 96-Lochplatte vorgelegt. 200 µl der jeweils frisch angesetzten BCA-Reaktionslösung wurden hinzugefügt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die Platte für weitere 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt (200 U/min). Nun konnte in einem Photometer die Absorption bei 560 nm gemessen werden und anhand der BSA-Standardreihe die Proteinkonzentration der dreifach bestimmten Proben ermittelt werden.

**3.10.3 Aβ-Immunpräzipitation**

(nach Dissertation Dr. Eva Zinser, (ZINSER, 2009) und Dissertation Dr. Johanna Kuchenbecker, (KUCHENBECKER, 2011))

Waschpuffer A

10 mM Tris/HCL pH7,5

150 mM NaCl

0,1 % (v/v) Nonidet P-40

0,1 % (v/v) Triton X-100

2 mM EDTA in ddH<sub>2</sub>O

Waschpuffer B

10 mM Tris/HCL pH 7,5

500 mM NaCl

0,1 % (v/v) Nonidet P-40

0,1 % (v/v) Triton X-100

2 mM EDTA in ddH<sub>2</sub>O

Waschpuffer C

10 mM Tris/HCL pH 7,5

Zur Detektion des Gesamt-A $\beta$ -Gehaltes im konditionierten Zellmedium inkubierter Neuroblastom-Zellen wurde zunächst eine Immunpräzipitation durchgeführt.

Mithilfe dieser Methode kann ein spezifisches Protein, in der vorliegenden Arbeit A $\beta$ , aus dem Medium konzentriert werden. Hierzu wird ein spezifischer Antikörper eingesetzt, der mit seiner *Fab*-Region an das zu untersuchende Protein bindet und mit seiner *Fc*-Region seinerseits an Protein G-Sepharose gebunden ist. Durch das Gewicht der Sepharose kann das entstandene Präzipitat mittels Zentrifugation aus dem übrigen Medium angereichert und nach gelelektrophoretischer Auftrennung einer Western Blot Analyse unterzogen werden.

Für die A $\beta$ -Immunpräzipitation wurde 1 ml konditioniertes Medium in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß vorgelegt und mit 10  $\mu$ g/ml W02-Antikörper und 20  $\mu$ l Protein-G-Sepharose inkubiert. Damit der Antikörper sein Antigen vollständig binden konnte, wurden die Reaktionsgefäße für eine Nacht bei 4 °C in einen Überkopfschüttler eingespannt. Anschließend wurden die Proben bei 13.000 x g und 4 °C für 1 min zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Die Präzipitate wurden daraufhin mit 1 ml Waschpuffer A gewaschen und erneut für 1 min bei 13.000 x g 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und der Wasch- und anschließende Zentrifugationsschritt wurden, wie für Waschpuffer A beschrieben mit Waschpuffer B und C wiederholt. Anschließend wurde unter der Verwendung einer Hamilton-Pipette der komplette Waschpuffer vom präzipitierten A $\beta$  abgenommen.

#### **3.10.4 Proteinauftrennung mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

*(basierend auf (SCHAGGER, VON JAGOW, 1987),*

*modifiziert wie in Dissertation Dr. Verena Burg (BURG, 2014) beschrieben)*

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese, bekannt als SDS-Page (*engl. sodium dodecyl sulfat*) genutzt, welche darauf basiert, Proteine anhand ihres Molekulargewichtes in einem elektrischen Feld zu separieren.

Kathodenpuffer SDS-Page

100 mM Tris/HCl pH 8,25-8,5

100 mM Tricin

0,1 % (w/v) SDS in ddH<sub>2</sub>O

3x Protein-Probenpuffer:

187,5 mM Tris/HCl pH 6,8

6 % (w/v) SDS

30 % (v/v) Glycerin

15 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol

0,03 % (w/v) Bromphenolblau in ddH<sub>2</sub>O

Hierzu wurden die Proteine zunächst denaturiert und durch Natrium-Dodecylsulfat unabhängig ihrer Eigenladung negativ geladen. Im Anschluss wurde an ein diskontinuierliches 10-20%-iges Tris-Tricin-Gradienten-Gel auf Polyacrylamidbasis eine elektrische Spannung angelegt, wodurch die negativ geladenen Proteine zur Anode wanderten. Abhängig der Molekulargröße erfolgte diese Wanderung unterschiedlich schnell, sodass eine Auftrennung gelang.

Zur Denaturierung wurden die konditionierten Medien, Lysate oder Homogenate auf eine Proteinmenge von 40-50  $\mu$ g eingestellt und 2:1 mit 3x Protein-Probenpuffer verdünnt. Zu den wie in Kapitel 3.10.3 beschrieben generierten Immunpräzipitaten wurde 15  $\mu$ l 3x Protein-Probenpuffer gegeben. Im Anschluss erfolgte in einem Heizblock bei 98 °C durch 5-minütige Inkubation des Protein-Probenpuffers die vollständige Denaturierung. Das im Protein-Probenpuffer enthaltene  $\beta$ -Mercaptoethanol unterstützt die Denaturierung durch Aufschluss von Disulfidbrücken. Das SDS maskiert die Proteine wie zuvor beschrieben mit einer negativen Ladung. Im Anschluss wurden die denaturierten Proben kurz zentrifugiert, sodass sie sich am Gefäßboden sammelten und vollständig mittels einer Hamilton-Kapillare in die Geltaschen des Polyacrylamidgels geladen werden konnten. Dieses Gel befand sich in einer vertikalen Gelelektrophoreseapparatur, die mit Kathodenpuffer gefüllt war. Zusätzlich wurde als spätere Referenz für das Molekulargewicht 5  $\mu$ l des Proteingrößenstandards *Page Ruler* auf das Gel aufgetragen. Nun wurde für 60 min eine elektrische Spannung von 120 V angelegt.



### **3.10.5 Western Blot Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran**

*(basierend auf (TOWBIN et al., 1979),*

*durchgeführt wie in Dissertation Dr. Verena Burg (BURG, 2014))*

Der Western Blot Transfer dient der Übertragung der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran.

#### Transferpuffer

25 mM Tris/HCL pH8,7

192 mM Glycin

20 % (v/v) Methanol

0,025 % (w/v) SDS in ddH<sub>2</sub>O

Hierzu wurde das Gel auf einer mit Transferpuffer getränkten Nitrozellulosemembran platziert, beidseits mit zwei angefeuchteten Filterpapieren und einem Schwamm umhüllt und zwischen zwei Platten eingespannt. Diese Platten wurden in einen mit Transferpuffer gefüllten Tank-Blotter eingehängt, wobei darauf zu achten war, dass das Gel zur Kathode und die Membran zur Anode gerichtet war. Anschließend wurde senkrecht zum Gel ein elektrisches Feld der Stromstärke 360 mA erzeugt, wodurch die durch das SDS negativ maskierten Proteine Richtung Anode wanderten. Hier konnten sie durch die Nitrozellulosemembran aufgefangen und immobilisiert werden.

Zur Detektion von kleinen Proteinen wie A $\beta$  wurde eine Membran der Porengröße 0,2  $\mu$ m und eine Transferdauer von 45 min gewählt, bei größeren Proteinen wurde für 3 h bei einer Porengröße von 0,45  $\mu$ m transferiert. Die Temperatur betrug konstant 4 °C.

### **3.10.6 Immunologische Detektion der Proteine auf Nitrozellulosemembran**

*(basierend auf der Dissertation von Dr. Johanna Kuchenbecker (KUCHENBECKER, 2011) und (IDA et al., 1996))*

Der Proteinnachweis auf Nitrozellulosemembran gelang durch einen spezifisch gegen das zu detektierende Protein gerichteten Primärantikörper, der nach Einsatz eines enzymmarkierten Zweitantikörpers im Anschluss per Chemilumineszenz auf lichtsensiblen Filmen sichtbar gemacht werden konnte.

Hierzu wurde die Nitrozellulosemembran nach dem Western Blot Transfer zunächst bei 4 °C über Nacht in PBS mit 10 % gelöstem Milchpulver inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Bei Verwendung des W02-Antikörpers wurde die Membran vor dem Blocken zusätzlich für 5 min in PBS aufgekocht. Die geblockte Membran wurde am folgenden Tag zweimalig für 5 min in PBS gewaschen und der Primärantikörper entsprechend den in Tabelle 11 zu entnehmenden Konzentrationen und Pufferlösungen für 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten fünf erneute 5-minütige Waschschrte mit PBS, bevor für 1 h die Inkubation des Sekundärantikörpers vollzogen wurde.

**Tabelle 11 Inkubationsbedingungen der Primär- und Sekundärantikörper**

<b>Protein</b>	<b>Primärantikörper, Konzentration, Puffer</b>	<b>Sekundärantikörper, Konzentration, Puffer</b>
A $\beta$ sAPP $\alpha$	W02 1 $\mu$ g/ml in 1 % Milch/PBS	P0260 1:5000 in PBS
BACE1	ab2077 1:1000 in 5 % Milch/PBS	W401B 1:5000 in 5 % Milch/PBS
sAPP $\beta$	Mbs492139 1:200 in 5 % Milch/PBS	W401B 1:5000 in 5 % Milch/PBS
Aktin	1:1000 in 5 % BSA	W401B

Wenn im Anschluss Aktin als Kontrolle der geladenen Proteinmenge nachbestimmt wurde, musste die Membran zunächst einem Re-Blot mittels einer Stripping-Lösung unterzogen werden. Danach war eine neue Antikörperbehandlung mit dem Aktinantikörper möglich.

### **3.10.7 Visualisierung der Proteinbanden mittels Chemilumineszenzreaktion**

Die in Kapitel 3.10.6 verwendeten Sekundärantikörper sind an das Enzym Meerrettichperoxidase (*engl. horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelt.

Nach Inkubation der Sekundärantikörper und drei erneuten 5-minütigen Waschschrten in PBS wurde die Membran in gleichen Mengen mit Chemilumineszenz fördernder (*engl. enhanced chemiluminescence*, ECL) Lösung 1 und 2 benetzt. Das gebundene HRP oxidiert

das in den Lösungen enthaltene Luminol, wodurch es zu einer Lichtemission kommt. Diese Chemilumineszenz wurde in der Dunkelkammer durch die luftblasenfreie Exposition eines Röntgenfilms (Hyper ECL) sichtbar gemacht. Der Film wurde anschließend entwickelt und fixiert. Die Intensität der so aufgezeichneten Signale verhält sich direkt proportional zur Proteinmenge und konnte unter Hinzunahme des Computerprogramms *Image Gauge Software V.345* densitometrisch quantifiziert werden.

### **3.10.8 Bestimmung der A $\beta$ <sub>40</sub>-Gesamtdegradation**

*(basierend auf (SUN et al., 2005), modifiziert nach Dissertation Dr. Janine Mett (METT, 2017))*

Um festzustellen, wie viel A $\beta$ <sub>40</sub> nach Vitamin D bzw. Vitamin D Analoga Inkubation degradiert wird, wurde murines Probenmaterial mit humanem, synthetischen A $\beta$ <sub>40</sub> inkubiert. Nach einem definierten Zeitraum wurde der verbleibende A $\beta$ <sub>40</sub>-Gehalt mittels Western Blot Analyse entsprechend den Kapiteln 3.10.4 bis 3.10.7 quantitativ detektiert.

Hierzu wurde der W02-Antikörper verwendet, welcher ausschließlich das substituierte humane A $\beta$ -Peptide nachweist. Das Epitop der murinen A $\beta$ -Sequenz bleibt vom W02-Antikörper unerkannt, wodurch das endogene A $\beta$  keinen Einfluss auf den gemessenen A $\beta$ -Gehalt nimmt. Hierdurch gelang die reine Betrachtung der Degradation ohne Effekte einer murinen A $\beta$ -Produktion. Die A $\beta$ -Degradation verhält sich umgekehrt proportional zum vermessenen A $\beta$ <sub>40</sub> und kann durch Kehrwertbildung ermittelt werden.

#### **3.10.8.1 A $\beta$ <sub>40</sub>-Gesamtdegradation in vitro auf N2a-Zellen**

Dem Kulturmedium der murinen N2a Zelllinie wurde nach 18 h Vorinkubation mit 100 nM Vitamin D bzw. Vitamin D Analoga wie in Kapitel 3.9.2 beschrieben 0,5  $\mu$ g/ml humanes, synthetisches A $\beta$ <sub>40</sub> hinzugefügt. Nach 6 h wurde das Medium abgenommen und der verbleibende A $\beta$ <sub>40</sub> Gehalt mittels Western Blot Analyse bestimmt.

#### **3.10.8.2 A $\beta$ <sub>40</sub>-Gesamtdegradation ex vivo auf Maushirnhomogenaten**

50  $\mu$ g der aus murinen Hirnen erzeugten Homogenate wurden in eine 1,5 ml Glasflasche überführt und wie in Kapitel 3.10.1 erläutert für 15 min auf Eis vorinkubiert. Dann wurde 1  $\mu$ g/ml humanes, synthetisches A $\beta$ <sub>40</sub> sowie zur Erhöhung der Spezifität 1  $\mu$ M  $\beta$ -Inhibitor

sowie 20  $\mu\text{M}$   $\gamma$ -Inhibitor hinzugegeben. Die Proben wurden für 1 h bei 37 °C unter ständiger Bewegung durch einen Schüttler inkubiert. Im Anschluss erfolgte wie beschrieben eine Western Blot Analyse.

### 3.10.9 Messung von Enzym Aktivitäten

Die Messung der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase Aktivität erfolgte in einer fluorometrischen Nachweismethode basierend auf dem Mechanismus des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET).

Hierbei wird ein spezielles FRET-Substrat eingesetzt, welches im intakten Zustand an den Molekülen eine Donator- und eine Akzeptorgruppe trägt. Diese bestehen aus Fluorophoren, zwischen denen ein als FRET bezeichneter permanenter Energieaustausch besteht. Durch den FRET wird die Fluoreszenz „ausgelöscht“ (*engl. quenching*). Durch die Anwesenheit des zu detektierenden Enzyms wird das FRET-Substrat chemisch verändert. Das Donator-Akzeptor-Paar wird räumlich getrennt. Das Fluorophor ist nun bei einer bestimmten Wellenlänge erregbar. Dabei kommt es zur Fluoreszenzfreisetzung, welche in Echtzeit messbar ist. Hierdurch lassen sich Rückschlüsse auf die Aktivität der vermessenen Sekretase ziehen. Durch zeitgleiche Anwesenheit spezifischer Sekretase Inhibitoren konnte die Spezifität der Messung überprüft werden.

Tabelle 12 Messparameter der Substrate

Substrat	Substrat-konzentration	Exzitation	Emission	Zyklen-anzahl	Mess-intervall
$\alpha$ -Sekretase	3 $\mu\text{M}$	340 nm ( $\pm 10$ nm)	490 nm ( $\pm 10$ nm)	120	120 sec
$\beta$ -Sekretase	20 $\mu\text{M}$	345 nm ( $\pm 5$ nm)	500 nm ( $\pm 5$ nm)	180	60 sec
$\gamma$ -Sekretase	12,5 $\mu\text{M}$	355 nm ( $\pm 10$ nm)	440 nm ( $\pm 10$ nm)	140	60 sec
NEP	5 $\mu\text{M}$	320 nm ( $\pm 10$ nm)	405 nm ( $\pm 10$ nm)	850	60 sec

### 3.10.9.1 Messung der $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ -Sekretase Aktivität auf metabolisch aktiven SH-SY5Y

#### WT Zellen

(nach Dissertation Dr. Verena Burg (BURG, 2014) und Dissertation Dr. Tatjana Rothhaar (ROTHHAAR et al., 2012))

#### Assay-Puffer

140 mM NaCl  
5 mM KCl  
8 mM CaCl<sub>2</sub>  
1 mM MgCl<sub>2</sub>  
20 mM HEPES, pH 7,4

Vor der Messung wurden SH-SY5Y WT auf eine schwarze 96-Lochplatte mit transparentem Boden ausgesät und entsprechend Kapitel 3.9.2 inkubiert. Im Anschluss wurde das Inkubationsmedium abgenommen und die Zellen zweimal mit dem Assay-Puffer gewaschen. Zur Bestimmung der  $\alpha$ -Sekretase Aktivität wurden 100  $\mu$ l Assay-Puffer, für die Bestimmung der  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Sekretase Aktivität 50  $\mu$ l Assaypuffer, in jede Vertiefung vorgelegt. Entsprechend Tabelle 12 wurde das Substrat hinzugegeben und die Zellen im *Safire Fluorometer* bei der entsprechenden Extinktions- und Emissionswellenlänge vermessen.

### 3.10.9.2 Messung der $\beta$ -Sekretase Aktivität aus Hirnhomogenaten

Die murinen, homogenisierten Hirnproben wurden mittels BCA auf eine einheitliche Proteinmenge eingestellt und auf eine schwarze 96-Lochplatte pipettiert, sodass je Vertiefung 250  $\mu$ g Gesamtprotein vorlagen. Die Proben wurden mit 50  $\mu$ l PBS (pH = 4,5) je Vertiefung verdünnt, um ein saures Milieu entsprechend des pH-Optimums der  $\beta$ -Sekretase zu generieren. Im Anschluss wurden die Proben wie in Kapitel 3.10.1 beschrieben, für 15 min auf Eis mit Vitamin D bzw. Vitamin D Analoga inkubiert. Nun wurde das  $\beta$ -Sekretase Substrat 1:3 verdünnt in DMSO hinzugefügt und entsprechend der Messparameter aus Tabelle 12 vermessen.

### 3.10.9.3 Messung der $\beta$ -Sekretase Aktivität nach Membranpräparation

Zur Bestimmung der  $\beta$ -Sekretase Aktivität aus resuspendierten Membranpellets wurden die Proben 1:2 in PBS (pH 4,5) verdünnt. 100  $\mu$ l der Proben wurden als Dreifachbestimmung auf eine schwarzen 96-Lochplatte pipettiert und wie zuvor beschrieben vermessen.

#### 3.10.9.4 Analyse der NEP-Aktivität

(basierend auf (MINERS et al., 2008), modifiziert nach Dissertation Dr. Janine Mett (METT, 2017))

Zur Messung der NEP-Aktivität wurde das Enzym zunächst über einen NEP-Antikörper an eine 96-Lochplatte gebunden und im Anschluss die durch Zugabe eines Substrates entstehende Fluoreszenz vermessen.

##### Waschpuffer

0,05 % (v/v) Tween-20 in PBS

##### Blockierlösung

10 % (w/v) BSA (Fettsäurefrei) in PBS

##### NEP-Assaypuffer mit Inhibitoren

100 mM Tris/HCL pH 7.0

50 mM NaCl

10  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>

In ddH<sub>2</sub>O

frische Zugabe von:

1  $\mu$ M  $\beta$ -Sekretase Inhibitor II

25  $\mu$ M  $\gamma$ -Sekretase Inhibitor IV

10  $\mu$ M Bacitracin

1x Protease Inhibitor Cocktail ohne EDTA

Hierzu erfolgte zunächst die Beschichtung einer MaxiSorp-96-Lochplatte mit dem NEP-Antikörper AF1182. Pro Vertiefung der 96-Lochplatte wurden 1,6  $\mu$ g/ml des NEP-Antikörpers gelöst in 100  $\mu$ l PBS vorgelegt, bei 150 U/min kurz vermischt und unter einer Folie für 24 h bei 4 °C inkubiert. Danach wurde die Platte sechsmal mit dem Waschpuffer gewaschen, bevor für weitere 3 h unter Raumtemperatur 125  $\mu$ l Blockierlösung je Vertiefung inkubiert wurde. Hierdurch konnten unspezifische Bindestellen auf der Platte blockiert werden. Die mit Antikörper beschichtete, geblockte Platte wurde im Anschluss erneut sechsmal mit dem Waschpuffer bearbeitet. Die zu vermessenden Zelllysate wurden mittels BCA auf eine Proteinkonzentration von 1,25  $\mu$ g/ $\mu$ l eingestellt und je 100  $\mu$ l der Probe pro Vertiefung pipettiert. Unter ständigem Schütteln bei 150 U/min wurden die Proben bei Raumtemperatur für 90 min inkubiert. Anschließend wurde die Platte erneut sechsmal mit dem Assaypuffer

gewaschen und für weiter 30 min unter gleichen Bedingungen mit 100 µl NEP-Assaypuffer inkubiert. 5 µM des NEP-Substrates wurden hinzugefügt und die entstandene Fluoreszenz im *Safire2-Fluorometer* unter den in Tabelle 12 angegebenen Parametern vermessen.

### 3.10.9.5 *IL-1β-Messung*

(nach Herstellerprotokoll *abcam/ Human IL-1 beta ELISA Kit, Version 7*)

Zur quantitativen Bestimmung des IL-1β wurde das *IL-1β-ELISA Kit* der Firma *Abcam* nach Herstellerangaben eingesetzt.

Dieses Kit bindet IL-1β zunächst durch einen Erstantikörper an eine Platte, bevor ein HRP-Enzym-gekoppelter Zweitantikörper inkubiert wird. Nach Zugabe von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)-Substratlösung läuft dann, katalysiert durch das HRP, eine Farbreaktion ab. Diese wird durch die Zugabe einer Stopplösung beendet und der Farbumschlag wird photometrisch vermessen. Als Referenz wurde eine Standard-IL-1β-Lösung mit Konzentrationen zwischen 0 - 900 pg/ml erstellt und mitbestimmt. Entsprechend dem Herstellerprotokoll wurden zunächst 50 µl Probe bzw. Standardlösung in die Lochplatte vorgelegt. Dann wurden für 2 h 50 µl des vorher angesetzten Antikörpercocktails unter ständigem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Platte dreimalig mit 350 µl Waschpuffer je Vertiefung gewaschen, um ungebundene Proteine vollständig zu entfernen. Im Anschluss wurde in der Dunkelkammer 100 µl des TMB-Substrates je Vertiefung inkubiert und bei 400 rpm geschüttelt. Nach Ablauf von 10 min wurde 100 µl der Stopplösung hinzugefügt. Nachdem diese unter Schütteln 1 min einwirken konnte, wurde die OD bei 450 nm bestimmt.

## 3.11 Molekularbiologische Methode

### 3.11.1 *Ribonukleinsäure-Isolation aus Zellen mittels TRIzol*

(nach Herstellerprotokoll *Life Technologies/ TRIzol-Reagent, Version Dezember 2012*)

Zur Durchführung molekularbiologischer Experimente wurde zunächst die Gesamt-Ribonukleinsäure (RNS) aus den Zellen isoliert. Hierzu wurden die in 6-Lochplatten kultivierten Zellen nach Abnahme des Zellkulturmediums mit 1 ml TRIzol je Vertiefung versetzt, kurz inkubiert und mittels Schaber vom Plattenboden abgelöst. Nach Überführung in

1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben und die Probe durch 15-sekündiges Schütteln vermengt. Nach dreiminütiger Einwirkzeit wurden die Proben bei 4 °C für 15 min unter 13.800 x g zentrifugiert. Hierdurch bildeten sich drei Phasen: eine untere rote Phase, welche die DNS enthielt, eine weiße proteinreiche Interphase und oben eine wässrige Phase mit der zu isolierenden RNS. Diese obere Phase wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol verdünnt. Nach 10-minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde eine weitere 10-minütige Zentrifugation bei 13.800 x g unter 4 °C gestartet. Die ausgefallene RNS zeigte sich als Pellet am Boden der Reaktionsgefäße. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml 75 % EtOH gewaschen. Anschließend folgte eine erneute 5-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 5.400 x g. Der Überstand wurde erneut verworfen und die RNS für 5 min an der Luft getrocknet. Das Pellet wurde mit 100 µl Nuklease freiem H<sub>2</sub>O versetzt und im Heizblock für 10 min auf 55 °C erhitzt.

### **3.11.2 Reinheits- und Konzentrationsbestimmung der Ribonukleinsäure**

*(nach Herstellerprotokoll Life Technologies/ TRIzol-Reagent, Version Dezember 2012)*

Nach der RNS-Isolation erfolgte mittels NanoDrop-Spektrometer eine Bestimmung der Reinheit und der Konzentration. Hierzu wurde die Absorption bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm gemessen und anschließend der Quotient bestimmt. Lag diese 260/280 Ratio zwischen 2,0 und 2,2 wurde von einer reinen RNS-Probe ausgegangen. Bei abweichenden Werten musste von einer Verunreinigung der Probe beispielsweise durch Proteinerückstände ausgegangen werden, die bei einer Wellenlänge von 280 nm maximal absorbieren. In diesem Fall wurden die Proben nicht weiterverwendet. Die maximale Extinktion reiner RNS ist bei 260 nm messbar, eine Extinktion von 1 entspricht hier einer RNS-Konzentration von 40 µg/ml. Anhand der gemessenen Werte konnte hierdurch die vorliegende RNS-Konzentration errechnet und die Proben auf eine einheitliche Konzentration von 0,2 µg/µl eingestellt werden. Nach Konzentrations- und Reinheitsbestimmung erfolgte die Langzeitlagerung der isolierten RNS bei -80 °C.



### **3.11.3 Komplementäre Desoxyribonukleinsäure Synthese**

(nach Herstellerprotokoll Thermo Fisher Scientific/ High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Version März 2016)

#### Ansatz für cDNS-Synthese

- 10 µl RNS in einer Konzentration von 0,2 µg/µl
- 2 µl 10x RT-Puffer
- 0,8 µl 25x dNTP Mix
- 2 µl 10x RT Random Primer
- 1 µl MultiScribe Reverse Transkriptase
- 4,2 µl nukleasefreies Wasser

#### Programm für cDNS-Synthese

- 1) 10 min 25 °C
- 2) 120 min 37 °C
- 3) 5 min 85 °C
- 4) konstant 8 °C

Aus der isolierten, auf eine einheitliche Konzentration eingestellten RNS wurde die komplementäre Desoxyribonukleinsäure (*engl. complementary desoxyribonucleic acid, cDNA*) synthetisiert. Hierzu wurde das *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* der Firma *Life Technologies* nach Herstellerangaben verwendet. Die reverse Transkription erfolgte im *PRIMUS 25 ADVANCED PCR*-Zykler unter Verwendung des angegebenen Programms. Die gewonnene cDNS wurde im Anschluss 1:10 mit Nuklease freien H<sub>2</sub>O versetzt und bei -20 °C gelagert.

### **3.11.4 Echtzeit-Polymerasekettenreaktion**

(nach Dissertation Dr. Sven Grösgen, Universität des Saarlandes, (GRÖSGEN, 2013))

Im Anschluss an die RNS-Isolation und die Umschreibung der RNS in cDNS erfolgte die quantitative Bestimmung unterschiedlicher Genexpressionen mittels Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (*engl. real-time polymerase chain reaction, RT-PCR*). Hierzu wurden die entsprechenden Gensequenzen durch die Verwendung Gen-spezifischer Primer (siehe Tabelle 7) amplifiziert und im Anschluss durch die Verwendung eines Fluoreszenzfarbstoffes quantitativ nachgewiesen.

Ansatz für RT-PCR

2,5 µl cDNS  
2 µl nukleasefreies Wasser  
0,25 µl Primer forward  
0,25 µl Primer reverse  
5 µl Fast SYBR Green Master Mix

Programm für RT-PCR

- 1) Denaturierung: 20 sec bei 95 °C
- 2) Denaturierung: 3 sec bei 95 °C
- 3) 40 Zyklen Anlagerung/Elongation: 30 sec bei 60 °C
- 4) Schmelzkurvenanalyse: 60-95 °C

In eine 96-Lochplatte wurden die RT-PCR-Ansätze, die die entsprechende cDNS, die spezifischen Primer und den Fluoreszenzfarbstoff *SYBRgreen* enthielten, pipettiert. Zur RT-PCR-Messung und anschließender Fluoreszenzmessung wurde das *PikoReal PCR* System der Firma *Thermo Scientific* genutzt.

Bei allen Messungen wurden die von Vitamin D und seinen Analoga nicht regulierten Haushaltsgene (*engl. housekeeping gen*)  $\beta$ -Aktin und TATA-Box bindendes Protein mitbestimmt, um auf deren Expression normieren zu können. Die Datenanalyse erfolgte unter Anwendung der *PikoReal* Software (Version 2.1.158.545) und der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode nach Livak und Schmittgen (LIVAK, SCHMITTGEN, 2001).

### 3.12 Statistische Datenauswertung

Zur statistischen Datenauswertung wurden *Microsoft Excel* und die *SPSS Statistics 22* Software verwendet.

Alle Daten wurden in mindestens drei unabhängigen Experimenten erhoben. Eine Überprüfung auf Normalverteilung erfolgte mittels Shapiro-Wilk-Test. Die Varianzhomogenität wurde mittels Levene-Tests erhoben. Beim Mittelwertvergleich zweier Gruppen wurde zur Ermittlung der statistischen Signifikanz der zweiseitige, ungepaarte student's t-test genutzt. Beim Vergleich mehrere Stichprobengruppen wurde eine

Varianzanalyse (*engl. analysis of variance, ANOVA*) angewendet. Im Falle eines signifikanten Unterschiedes im ANOVA Test wurde als Post-Hoc Test der Bonferroni-Test durchgeführt.

Ein p-Wert ( $p \leq 0,05$ ) entsprach einem statistisch signifikanten Ergebnis (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ), bei p-Werten zwischen 0,05 und 0,1 wurde von einer Tendenz ausgegangen.

Zur Untersuchung des Zusammenhanges wurde die Pearson-Korrelation bestimmt.

## 4 Ergebnisse

Die im Folgenden vorgestellten Ergebnisse wurden im *International Journal of Molecular Sciences* (Impact Factor 6,208) publiziert und zum aktuellen Zeitpunkt (18.07.2023) 31-mal in der Datenbank *PubMed* zitiert.

*Thiel A. \*, Grimm MOW\*, 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- $\beta$  ( $A\beta$ ) Formation and Increase  $A\beta$ -Degradation. *International Journal of Molecular Sciences**

\*geteilte Erstautorenschaft

Ziel der Arbeit war es unter anderem, die Effekte der Vitamin D<sub>3</sub> Analoga Maxacalcitol, Calcipotriol und Alfacalcidol sowie der Vitamin D<sub>2</sub> Analoga Paricalcitol und Doxercalciferol auf die APP-Prozessierung, die A $\beta$ -Degradation und das IL-1 $\beta$ -Level zu untersuchen. Die Resultate wurden mit den Einflüssen von 25(OH) Vitamin D<sub>3</sub>, auch als Calcifediol bezeichnet, verglichen.

Calcifediol wird aufgrund seiner langen Halbwertszeit von bis zu drei Wochen als laborchemischer Parameter zur Bestimmung des Vitamin D Spiegels genutzt und kommt als Therapie einer Hypovitaminose D zum Einsatz (WOOTTON, 2005). Die aktivierte Vitamin D Form Calcitriol (1,25(OH) Vitamin D<sub>3</sub>) hingegen ist aufgrund ihrer kurzen Halbwertszeit von 4-6 h sowohl als klinischer Messwert als auch als Vergleichsreferenz in diesem experimentellen Aufbau ungeeignet (FRASER et al., 2020).

#### 4.1 Überprüfung der Inkubationsbedingungen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Inkubation von N2a, SH-SY5Y WT und SH-SY5Y APP<sub>695</sub> Zellen mit den Vitamin D<sub>3</sub> Analoga Maxacalcitol, Calcipotriol und Alfacalcidol sowie den Vitamin D<sub>2</sub> Analoga Paricalcitol und Doxercalciferol neu etabliert. Daher war es zunächst notwendig, die Inkubationsbedingungen zu überprüfen, indem die Auswirkungen der Inkubation der Vitamin D Analoga auf die Zellviabilität untersucht wurden.

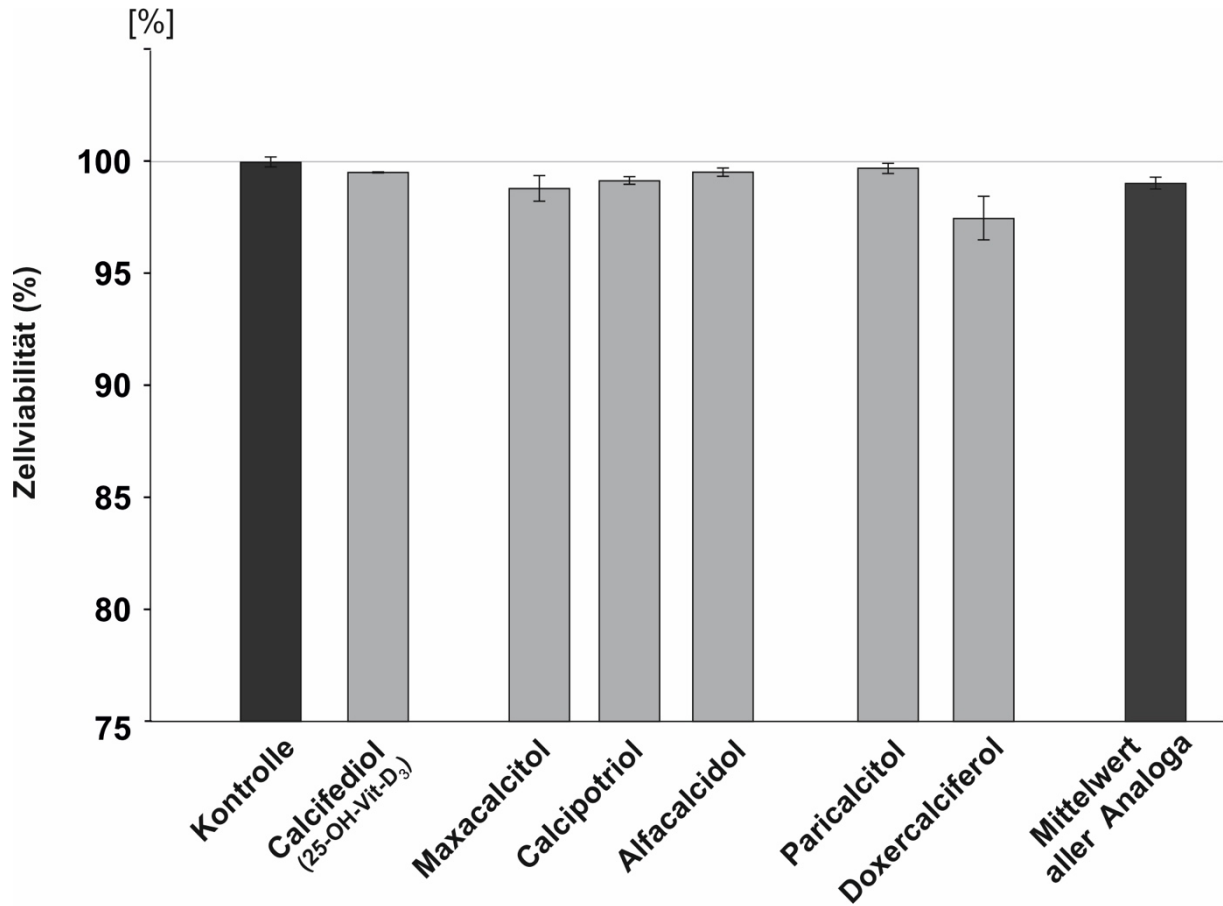
Die Zellen wurden wie in Kapitel 3.9.2 beschrieben vor und während der Inkubation in einem Medium mit reduziertem FCS-Gehalt kultiviert. Hierdurch wurden Nebeneffekte des im FCS enthaltenen Vitamin D minimiert. Die in EtOH gelösten Vitamin D Analoga wurden für 24 h (8 h + 16 h) in einer Stoffmengenkonzentration von 100 nmol/l inkubiert. Diese Konzentration wurde in Anlehnung an den physiologischen Vitamin D Spiegel im Serum gewählt, welcher über 75 nmol/l liegen sollte (VIETH, 2011).

Das Wachstumsverhalten wurde während und nach der Inkubation regelmäßig mikroskopisch kontrolliert. Verglichen mit dem Wachstumsverhalten der mit reinem Lösungsmittel oder mit Calcifediol behandelten Zellen zeigten sich keine Unterschiede, ebenso fielen keine morphologischen Differenzen auf.

Die Zellviabilität wurde wie in Kapitel 3.9.3 beschrieben mittels eines LDH-Tests bestimmt, der die LDH-Aktivität im Zellkulturmedium misst. Eine erhöhte LDH-Aktivität würde auf einen erhöhten Zelluntergang hindeuten, da LDH physiologisch im Zytosol vorliegt und erst durch Zellschäden in den Extrazellularraum übergeht.

Nach 24 h Inkubation von SH-SY5Y WT Zellen mit 100 nM Vitamin D<sub>3</sub>, den Vitamin D<sub>3</sub>- oder Vitamin D<sub>2</sub> Derivaten lag die Zytotoxizität verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle EtOH wie in Abbildung 1 verdeutlicht stets unter 3 %.

Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Calcifediol, den additiven Analoga und der Lösungsmittelkontrolle erhoben.



<b>D<sub>3</sub> oder D<sub>3</sub> Analoga</b>	+	+	+	+	-	-
<b>D<sub>2</sub> Analoga</b>	-	-	-	-	+	+
<b>25-hydroxyliert</b>	+	+	-	-	+	-

**Abbildung 1 Zellviabilität nach Inkubation mit 100 nM Vitamin D Analoga**

Mittels LDH Test wurde die Zytotoxizität von SH-SY5Y WT Zellen nach 24 h Inkubation mit 100 nM Lösungsmittel, 25(OH)Vitamin D<sub>3</sub> und den Vitamin D Analoga Maxacalcitol, Calcipotriol, Alfacalcidol, Paricalcitol sowie Doxercalciferol in FCS-reduziertem Kulturmedium gemessen. Hieraus wurde die Zellviabilität errechnet. In der Abbildung ist die prozentuale Zellviabilität nach Behandlung mit den einzelnen Vitamin D Analoga im Vergleich zur Behandlung mit dem Lösungsmittel EtOH dargestellt. Die Fehlerbalken stellen die mittlere Standardabweichung dar. Unter der Abbildung wurden die strukturellen Besonderheiten der Analoga verdeutlicht (n = 3) (Abb. modifiziert nach Thiel et al.2017)

Die genauen Zytotoxizitäten sind in Tabelle 13 aufgelistet.

**Tabelle 13 Zytotoxizität von SH-SY5Y WT Zellen nach Inkubation von 100 nM Vitamin D Analoga**

Mittels LDH Test wurde die Zytotoxizität von SH-SY5Y WT Zellen nach 24 h Inkubation mit 100 nM Lösungsmittel, 25(OH)Vitamin D<sub>3</sub> und den Vitamin D Analoga Maxacalcitol, Calcipotriol, Alfacalcidol, Paricalcitol sowie Doxercalciferol in FCS-reduziertem Kulturmedium gemessen. Mittels zweiseitigem, ungepaarten Student's t-test wurde geprüft, ob signifikante Unterschiede zwischen der Inkubation mit Calcifediol oder der Vitamin D Analoga gegenüber der Inkubation der Lösungsmittelkontrolle EtOH bestehen (n = 3).

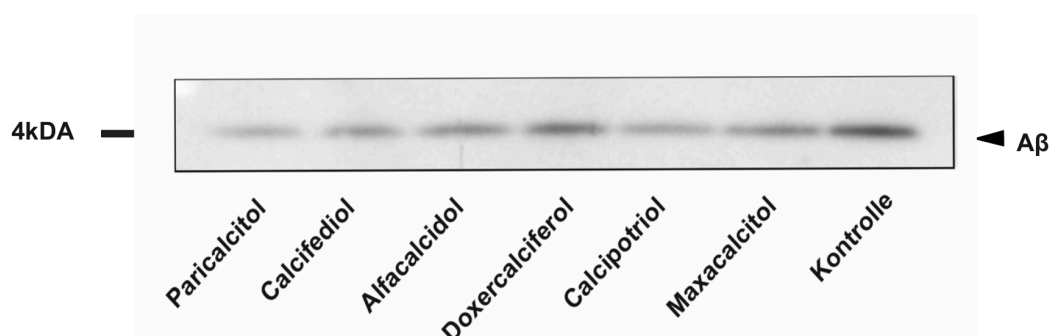
	<b>Zytotoxizität</b> [in % der Lösungsmittelkontrolle]	<b>Signifikanz</b> [zur Lösungsmittelkontrolle]	<b>Standardabweichung des Mittelwertes</b> [%]
Calcifediol	0,45	0,12	0,02
Maxacalcitol	1,18	0,14	0,57
Calcipotriol	0,83	0,06	0,17
Alfacalcidol	0,44	0,22	0,19
Paricalcitol	0,27	0,47	0,23
Doxercalciferol	2,52	0,07	0,98

#### 4.2 Einfluss der Vitamin D Analoga auf das A $\beta$ -Gesamtlevel

Zunächst wurde im Zellkulturmodell der A $\beta$ -Gesamtspiegel nach Inkubation der unterschiedlichen Vitamin D Derivate bestimmt. Verwendet wurden als Modell für Morbus Alzheimer eine humane Neuroblastomzelllinie mit stabiler Expression von humanem APP<sub>695</sub>, der häufigsten in Neuronen vorkommenden Isoform des APP.

Die SH-SY5Y APP Zellen wurden entsprechend Kapitel 3.9.2 mit 100 nM Vitamin D<sub>3</sub> oder den untersuchten Derivaten inkubiert. Nach 24 h wurde das verbleibende A $\beta$  im Zellkulturmedium mittels Immunpräzipitation (Vergleich Kapitel 3.10.3) und Western Blot Analyse (Vergleich Kapitel 3.10.5) unter Verwendung des W02-Antikörpers gemessen.

Abbildung 2 zeigt einen exemplarischen Röntgenfilm nach Fixierung der A $\beta$ -Signale.



**Abbildung 2** Exemplarischer Röntgenfilm nach Western Blot Analyse des A $\beta$ -Gesamtlevels im Medium von SH-SY5Y APP Zellen

Nach 24 h Inkubation von SH-SY5Y APP Zellen mit 100 nM Ethanol, Calcifediol, Maxacalcitol, Calcipotriol, Alfacalcidol, Paricalcitol oder Doxercalciferol wurde das Zellkulturmedium mittels Immunpräzipitation und Western Blot Analyse unter Verwendung des W02 Antikörpers auf den A $\beta$ -Gehalt untersucht. Dargestellt ist ein exemplarischer Röntgenfilm, wobei die Farbintensität der Signale dem jeweiligen A $\beta$ -Gehalt entspricht.

Da in den metabolisch aktiven Zellen parallel Prozesse der A $\beta$ -Produktion und des A $\beta$ -Abbaus ablaufen, stellt der gemessene A $\beta$ -Spiegel die Gesamtheit der Effekte aus Anabolismus und Katabolismus dar.

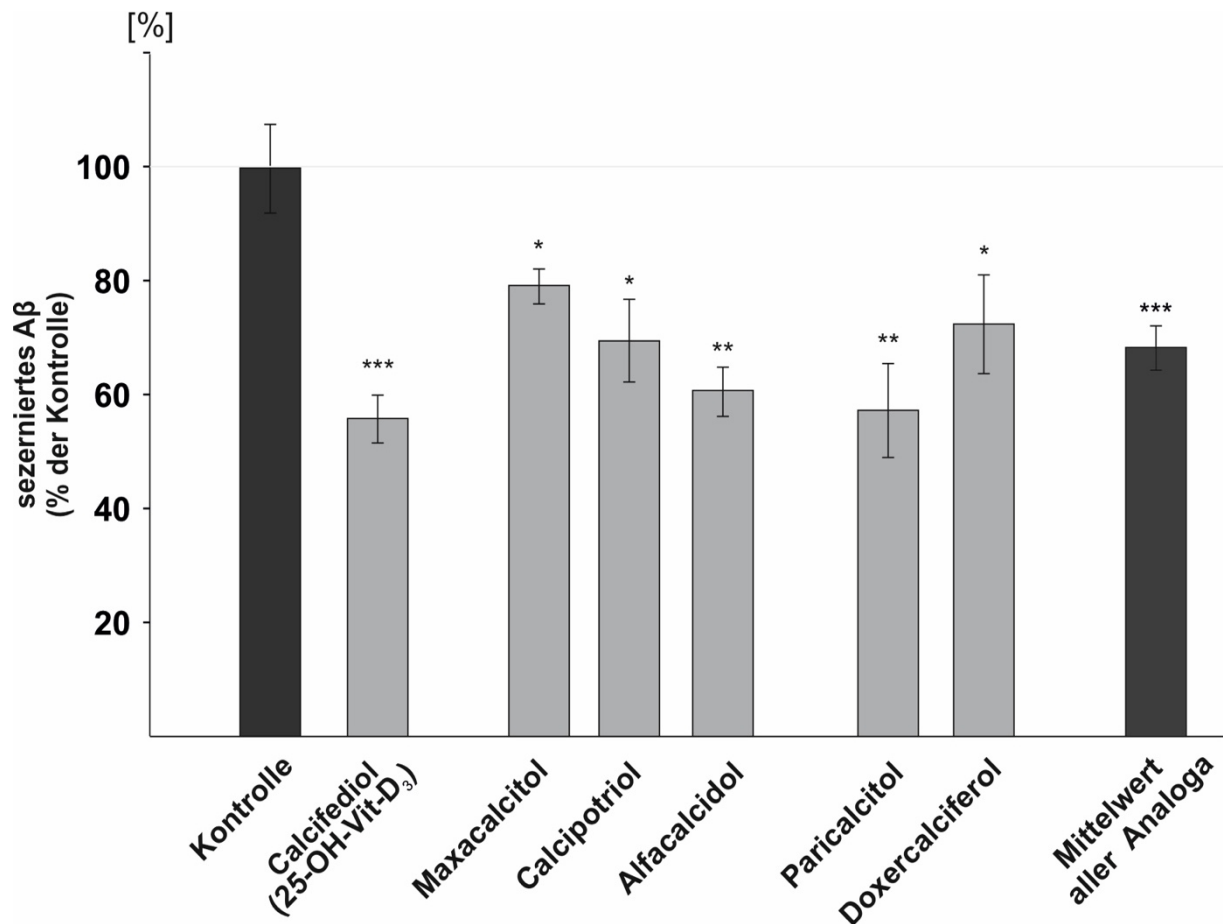
Die Behandlung der Zellen mit Vitamin D Derivaten zeigte für alle Präparate signifikante Effekte auf das gemessene A $\beta$ -Level. Die untersuchten Vitamin D<sub>3</sub> Analoga Maxacalcitol und Calcipotriol senkten den A $\beta$ -Gesamtspiegel verglichen zur EtOH-Kontrolle signifikant um 21,8 % bzw. 31,8 % (Maxacalcitol:  $78,2 \pm 3,1$  %,  $p = 0,031$ ; Calcipotriol:  $68,2 \pm 7,2$  %,  $p = 0,017$ ). Alfacalcidol erzielte eine signifikante A $\beta$ -Abnahme auf 60,2 % (Alfacalcidol:  $60,3 \pm 4,3$  %,  $p = 0,002$ ). Durch das Vitamin D<sub>2</sub> Analogon Paricalcitol gelang die Abnahme des messbaren A $\beta$ -Gehaltes auf 66,8 % (Paricalcitol:  $56,3 \pm 8,2$  %,  $p = 0,005$ ), Doxercalciferol reduzierte den A $\beta$ -Spiegel auf 70,9 % (Doxercalciferol:  $70,9 \pm 8,6$  %,  $p = 0,037$ ).

Durchschnittlich wurde somit durch die Analoga eine hochsignifikante Reduktion des A $\beta$ -Gehaltes auf 66,8 % erreicht (Durchschnitt aller Analoga:  $66,8 \pm 3,9$  %,  $p \leq 0,001$ ). Ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Analoga bestand nach ANOVA Analyse nicht. Die Zellen, die zuvor mit 100 nM Calcifediol inkubiert wurden, zeigten im Vergleich



zu der mit Lösungsmittel behandelten Kontrolle eine signifikante Reduktion des A $\beta$ -Gesamtgehaltes auf 55,1 % (Calcifediol:  $55,1 \pm 4,2$  %,  $p \leq 0,001$ ).

In Abbildung 3 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt.



**Abbildung 3 Einfluss der Vitamin D<sub>3</sub> Analoga auf das A $\beta$ -Gesamtlevel im Medium von SH-SY5Y APP Zellen**

Das Zellmedium der mit 100 nM Calcifediol, Maxacalcitol, Calcipotriol, Alfalcidol, Paricalcitol oder Doxercalciferol inkubierten SH-SY5Y APP Zellen wurde mittels Immunpräzipitation und Western Blot Analyse unter Verwendung des W02 Antikörpers auf den A $\beta$ -Gehalt untersucht. Angegeben sind die prozentualen Anteile des sezernierten A $\beta$  im Vergleich zur Behandlung mit der Lösungsmittelkontrolle. Die Fehlerbalken geben die mittlere Standardabweichung an, die durch Sterne dargestellten Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaarten Student's t-test ermittelt (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ) ( $n = 5$ ) (Abb. modifiziert nach Thiel et al.2017).

### 4.3 Einfluss der Vitamin D Analoga auf den A $\beta$ -Anabolismus

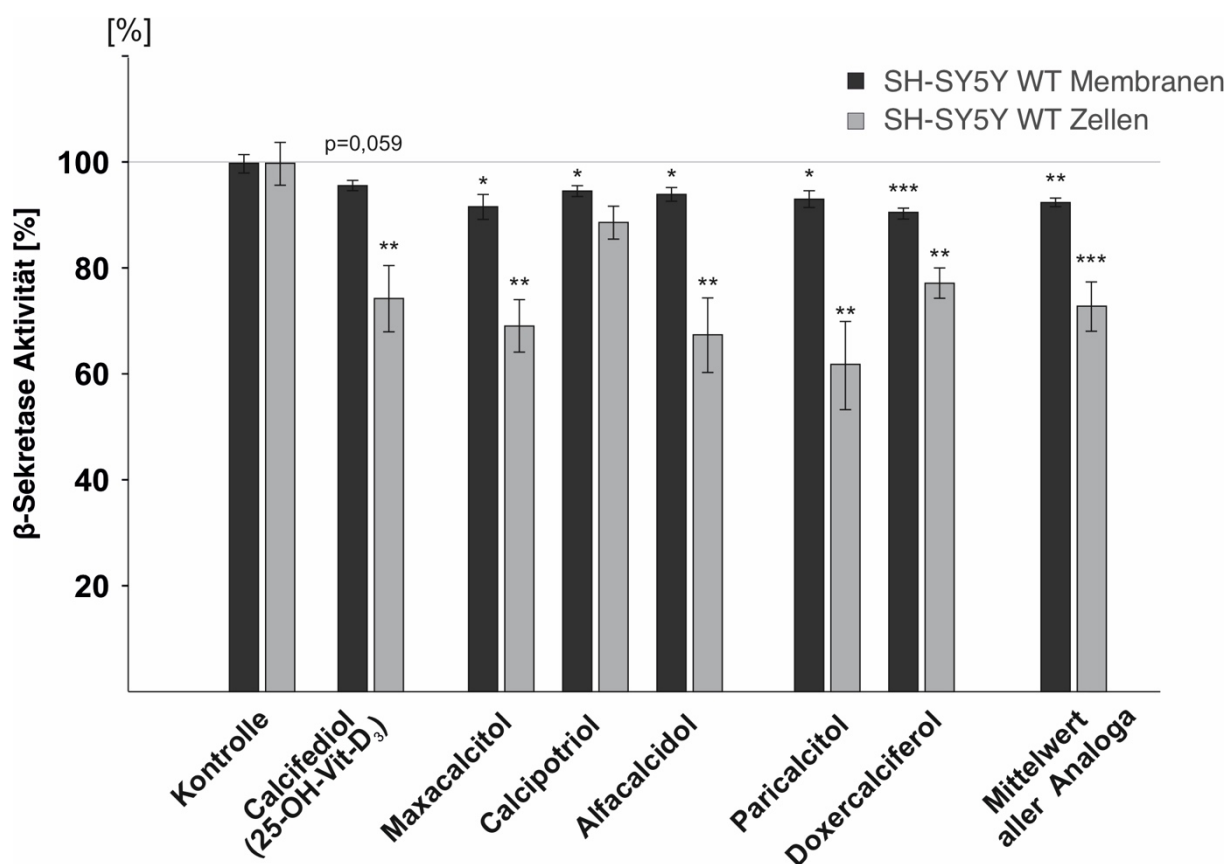
Da die in Kapitel 4.2 dargestellten Effekte auf das A $\beta$ -Gesamtlevel sowohl durch eine Reduktion der A $\beta$ -Produktion als auch durch einen gesteigerten A $\beta$ -Abbau hervorgerufen werden können, wurden im Folgenden Anabolismus und Katabolismus von A $\beta$  getrennt untersucht.

Zunächst wurde der Einfluss auf die amyloidogene APP-Prozessierung und damit die A $\beta$ -Produktion betrachtet. Diese wird durch den Schnitt des APP durch die  $\beta$ -Sekretase initiiert. Hierdurch entsteht das lösliche sAPP $\beta$  und das membranständige  $\beta$ -CTF, welches im Anschluss durch die  $\gamma$ -Sekretase weiter in A $\beta$  und AICD prozessiert wird (ZHANG et al., 2011).

#### 4.3.1 *Effekte der Vitamin D Analoga auf die Aktivität der $\beta$ -Sekretase in SH-SY5Y WT Zellen*

Zunächst wurde der Einfluss der Vitamin D<sub>2</sub> und Vitamin D<sub>3</sub> Analoga auf die Aktivität der  $\beta$ -Sekretase in metabolisch aktiven SH-SY5Y WT Zellen untersucht. Hierzu wurde die in Kapitel 3.10.9 beschriebene fluorometrische FRET-Nachweismethode verwendet.

Wie in Abbildung 4 anhand der grauen Säulen graphisch dargestellt, wurde durch die Behandlung der Zellen mit Calcifediol verglichen mit der reinen Substitution der Lösungsmittelkontrolle eine statistisch signifikante Reduktion der  $\beta$ -Sekretase Aktivität auf 74,4 % erzielt (Calcifediol:  $74,4 \pm 6,3$  %,  $p = 0,009$ ).



**Abbildung 4 Einfluss der Vitamin D Analoga auf die  $\beta$ -Sekretase Aktivität in metabolisch aktiven SH-SY5Y WT Zellen und daraus isolierten Membranen**

Nach 24 h Inkubation von 100 nM Calcifediol, Maxacalcitol, Calcipotriol, Alfacalcidol, Paricalcitol oder Doxercalciferol wurde mittels FRET basierter Nachweismethode die  $\beta$ -Sekretase Aktivität in metabolisch aktiven SH-SY5Y WT Zellen ( $n = 5$ ) und in aus der PNF der SH-SY5Y WT Zellen präparierten Membranen ( $n = 7$ ) gemessen. Dargestellt sind die  $\beta$ -Sekretase Aktivität relativ zur Lösungsmittelkontrolle. Die Fehlerbalken geben die mittlere Standardabweichung an, die durch Sterne dargestellten Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaarten Student's *t*-test ermittelt (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ) (Abb. modifiziert nach Thiel et al.2017).

Durch Substitution der Vitamin D Analoga wurden ebenfalls signifikante Einflüsse auf die  $\beta$ -Sekretase Aktivität erzielt. Die Behandlung der Zellen mit den Vitamin D<sub>3</sub> Analoga Maxacalcitol und Alfacalcidol senkte die Enzymaktivität signifikant auf 69,2 % und 67,5 %. (Maxacalcitol:  $69,2 \pm 5,0$  %,  $p = 0,002$ ; Alfacalcidol:  $67,5 \pm 7,1$  %,  $p = 0,004$ ). Unter der Inkubation mit Calcipotriol zeigte sich eine tendenzielle Abnahme der  $\beta$ -Sekretase auf 88,8 %, welche das Signifikanzniveau nicht erreichte (Calcipotriol:  $88,8 \pm 3,1$  %,  $p = 0,060$ ).

Nach Versetzen des Zellkulturmediums mit den Vitamin D<sub>2</sub> Analoga Paricalcitol und Doxercalciferol konnte die Aktivität der  $\beta$ -Sekretase signifikant auf 61,9 % beziehungsweise

77,3 % verglichen mit der EtOH-Kontrolle reduziert werden (Paricalcitol:  $61,9 \pm 8,4$  %,  $p = 0,003$ ; Doxercalciferol:  $77,3 \pm 2,9$  %,  $p = 0,002$ ).

Insgesamt zeigte sich durch die Inkubation der Vitamin D Analoga durchschnittlich eine Verringerung der  $\beta$ -Sekretase Aktivität in metabolisch aktiven SH-SY5Y WT Zellen auf 72,9 % (Durchschnitt aller Analoga:  $72,9 \pm 4,7$  %,  $p \leq 0,001$ ). Zwischen den einzelnen Vitamin D Analoga konnten wie in Abbildung 4 dargestellt keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

#### 4.3.2 Bestimmung der $\beta$ -Sekretase Aktivität in aus SH-SY5Y WT isolierten Membranen

Im vorherigen Abschnitt wurde ein senkender Effekt der Vitamin D Derivate auf die  $\beta$ -Sekretase Aktivität metabolisch aktiver SH-SY5Y WT Zellen beobachtet. Dieser kann sowohl auf *indirekte* Mechanismen, wie Einwirkungen auf die Genexpression, das Proteinlevel, den intrazellulären Transport oder die Degradation als auch auf *direkte* Einflüsse auf die Enzymaktivität zurückgehen. Um den *direkten* Mechanismus näher zu untersuchen, wurde die  $\beta$ -Sekretase Aktivität im zellfreien System in isolierten Membranen bestimmt. Hierzu wurden SH-SY5Y WT Zellen mit den Vitamin D Analoga inkubiert und im Anschluss wie in Kapitel 3.10.1 beschrieben die PNF präpariert. Aus der PNF wurden isolierte Membranen gewonnen. Mittels fluorometrischer FRET-Nachweismethode wurde die  $\beta$ -Sekretase Aktivität gemessen. Hierdurch wurden die Effekte ausschließlich auf *direkte* Einflüsse auf die Enzymaktivität dezimiert.

Wie in Abbildung 4 anhand der schwarzen Säulen verdeutlicht, wurde durch die Inkubation mit Calcifediol in den isolierten Membranen eine tendenzielle Reduktion der  $\beta$ -Sekretase Aktivität auf 95,8 % ohne statistische Signifikanz nachgewiesen (Calcifediol:  $95,8 \pm 0,97$  %,  $p = 0,059$ ).

Die Behandlung der PNFs mit den Vitamin D Derivaten verringerte die Aktivitäten der  $\beta$ -Sekretase. Die Ergebnisse erreichten für alle Vitamin D Analoga eine statistische Signifikanz. Die Inkubation mit Maxacalcitol senkte die Enzymaktivität durch direkte Effekte signifikant auf 91,7 % (Maxacalcitol:  $91,7 \pm 2,3$  %,  $p = 0,016$ ), die Inkubation von Calcipotriol zeigte eine signifikante  $\beta$ -Sekretase Aktivitätsminderung auf 94,7 % (Calcipotriol:

94,7 ± 1,0 %,  $p = 0,023$ ). Durch die Zugabe des Vitamin D<sub>3</sub> Analogon Alfacalcidol wurde die Enzymaktivität auf 94,1 % herabgesetzt (Alfacalcidol: 94,1 ± 1,3 %,  $p = 0,018$ ).

Nach Behandlung mit den Vitamin D<sub>2</sub> Analoga Paricalcitol und Doxercalciferol konnte in den isolierten Membranen eine Abnahme der Aktivität der  $\beta$ -Sekretase auf 93,2 bzw. 90,7 % gemessen werden (Paricalcitol: 93,2 ± 1,6 %,  $p = 0,013$ ; Doxercalciferol: 90,7 ± 1,0 %,  $p \leq 0,001$ ). Insgesamt wurde durch die Inkubation der Vitamin D Analoga eine durch direkte Effekte erzeugte Senkung der  $\beta$ -Sekretase Aktivität auf 92,5 % (Durchschnitt aller Analoga: 92,5 ± 0,8 %,  $p = 0,004$ ) beobachtet.

Abbildung 4 verdeutlicht, dass durch die Behandlung der Zellen mit den Vitamin D Analoga die Enzymaktivität in metabolisch aktiven Zellen deutlich stärker gesenkt wurde als auf den isolierten Membranen. So reduzierten die Analoga im Durchschnitt die  $\beta$ -Sekretase Aktivität in metabolisch aktiven Zellen auf 72,9 %, während durch direkte Effekte auf den isolierten Zellmembranen eine Senkung auf 92,5 % beobachtet wurde.

Die in Kapitel 4.3.1 beschriebenen Effekte der Vitamin D Analoga auf die  $\beta$ -Sekretase Aktivität in metabolisch aktiven Zellen setzten sich somit sowohl aus direkten als auch aus indirekten Effekten zusammen, wobei der Anteil an indirekten Einflüssen insgesamt überwiegt. Direkte Einflüsse sind im Durchschnitt für 27,5 % der beobachteten Effekte verantwortlich. Bei einzelnen Analoga wie Doxercalciferol und Calcipotriol sind bis zu 40,9 % bzw. 46,9 % der Einflüsse auf die  $\beta$ -Sekretase in metabolisch aktiven Zellen durch direkte Effekte auf das Enzym zu erklären.

In Tabelle 14 sind die direkten und indirekten Effekte prozentual gegenübergestellt.

**Tabelle 14 Anteil der direkten und indirekten Effekte auf die Reduktion der  $\beta$ -Sekretase Aktivität in SH-SY5S WT Zellen**

Nach Inkubation von 100 nM Vitamin D Analoga wurde die  $\beta$ -Sekretase Aktivität mittels FRET basierter Nachweismethode in metabolisch aktiven SH-SY5Y WT Zellen und in isolierten SH-SY5Y WT Membranen vermessen. Während bei der Vermessung der Membranen direkte Effekte der Analoga auf die Enzymaktivität gezeigt werden, spiegelt der Versuch auf metabolisch aktiven Zellen zusätzlich indirekte Effekte wie Einwirkungen auf die Genexpression, das Proteinlevel, den intrazellulären Transport oder die Degradation wider. Eine Verrechnung der Ergebnisse ermöglicht eine Gegenüberstellung, wieviel Prozent der Reduktion der  $\beta$ -Sekretase Aktivität auf indirekte und direkte Effekte zurückzuführen ist.

<b>Vitamin D Analoga</b>	<b>Gesamtreduktion der <math>\beta</math>-Sekretase Aktivität in metabolisch aktiven Zellen [%]</b>	<b>Davon <u>indirekte</u> Effekte [%]</b>	<b>Davon <u>direkte</u> Effekte [%]</b>
<b>Calcifediol</b>	25,59	83,45	16,55
<b>Maxacalcitol</b>	30,80	73,29	26,71
<b>Calcipotriol</b>	11,19	53,09	46,91
<b>Alfacalcidol</b>	32,46	81,88	18,12
<b>Paricalcitol</b>	38,05	82,13	17,87
<b>Doxercalciferol</b>	22,70	59,06	40,94
<b>Durchschnitt aller Analoga</b>	27,04	72,51	27,49

#### 4.3.3 Bestimmung des sAPP $\beta$ -Levels in SH-SY5Y WT Zellen

Zur Verifizierung der FRET-basierten Messmethode der  $\beta$ -Sekretase Aktivität wurde exemplarisch der sAPP $\beta$ -Spiegel nach Inkubation von SH-SY5Y WT mit Calcifediol bestimmt. Hierzu wurde eine Western Blot Analyse unter Verwendung des Mbs492139-Primärantikörpers durchgeführt. sAPP $\beta$  entsteht bei der APP-Prozessierung als Spaltprodukt der  $\beta$ -Sekretase und liegt folglich bei niedriger Enzymaktivität in geringeren Mengen vor (ZHANG et al., 2012a).

Das sAPP $\beta$ -Proteinlevel war wie in Abbildung 5 graphisch dargestellt nach der Inkubation von Calcifediol im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle signifikant auf 76,9 % reduziert (Calcifediol:  $76,9 \pm 1,8$  %,  $p = 0,002$ ).

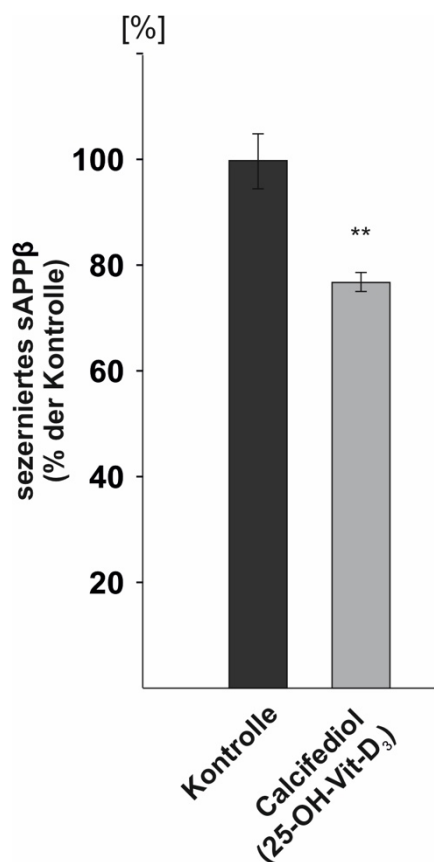


Abbildung 5 sAPP $\beta$ -Proteinspiegel nach 24 h Inkubation von SH-SY5Y WT Zellen mit 100 nM Calcifediol

SH-SY5Y WT Zellen wurden für 24 h mit 100 nM Calcifediol inkubiert, anschließend wurde im Kulturmedium mittels Western Blot Analyse der sAPP $\beta$ -Proteinspiegel bestimmt. Abgebildet ist das relative Ergebnis prozentual zur Kontrolle mit EtOH. Die Fehlerbalken geben die mittlere Standardabweichung an, die Sterne stellen die mittels zweiseitigem, ungepaarten Student's t-test ermittelte Signifikanz dar (\*\* =  $p < 0,01$ ) ( $n = 6$ ) (Abb. modifiziert nach Thiel et al. 2017).

#### 4.3.4 Bestimmung der $\beta$ -Sekretase Aktivität in Maushirnen nach Vitamin D Supplementierung

Die in den vorherigen Versuchen gezeigten direkten Einflüsse auf die  $\beta$ -Sekretase *in vitro* wurden im Folgenden wie in Abbildung 6 verdeutlicht in einer *ex vivo* Situation geprüft. Hierzu wurden wie in Kapitel 3.8 und 3.10 beschrieben Hirnproben von insgesamt fünf Wildtypmäusen gewonnen und mit 100 nM Vitamin D Analoga inkubiert. Mittels FRET-basierter Nachweismethode wurde die  $\beta$ -Sekretase Aktivität vermessen.

Nach der Supplementierung von 100 nM Calcifediol reduzierte sich im Vergleich zur Supplementierung reiner Lösungsmittelkontrolle die  $\beta$ -Sekretase Aktivität statistisch signifikant auf 94,2 % (Calcifediol:  $94,2 \pm 2,2$  %,  $p = 0,028$ ).

Die Zugabe der Vitamin D Derivate ergab insgesamt schwächere Effekte auf die Enzymaktivität. Die Supplementierung der Vitamin D<sub>3</sub> Analoga Maxacalcitol und Alfacalcidol senkte die  $\beta$ -Sekretase Aktivität statistisch signifikant auf 95,6 % bzw. 96,1 % (Maxacalcitol:  $95,6 \pm 1,1$  %,  $p = 0,015$ ; Alfacalcidol:  $96,1 \pm 1,4$  %,  $p = 0,054$ ). Das Vitamin D<sub>3</sub> Analogon Calcipotriol zeigte, ebenso wie die untersuchten Vitamin D<sub>2</sub> Analoga, keine statistisch signifikanten Effekte auf die  $\beta$ -Sekretase Aktivität der murinen Wildtypproben (Calcipotriol:  $99,54 \pm 2,2$  %,  $p = 0,858$ ; Paricalcitol:  $97,6 \pm 1$  %,  $p = 0,182$ ; Doxercalciferol:  $101,5 \pm 2,2$  %,  $p = 0,577$ ).

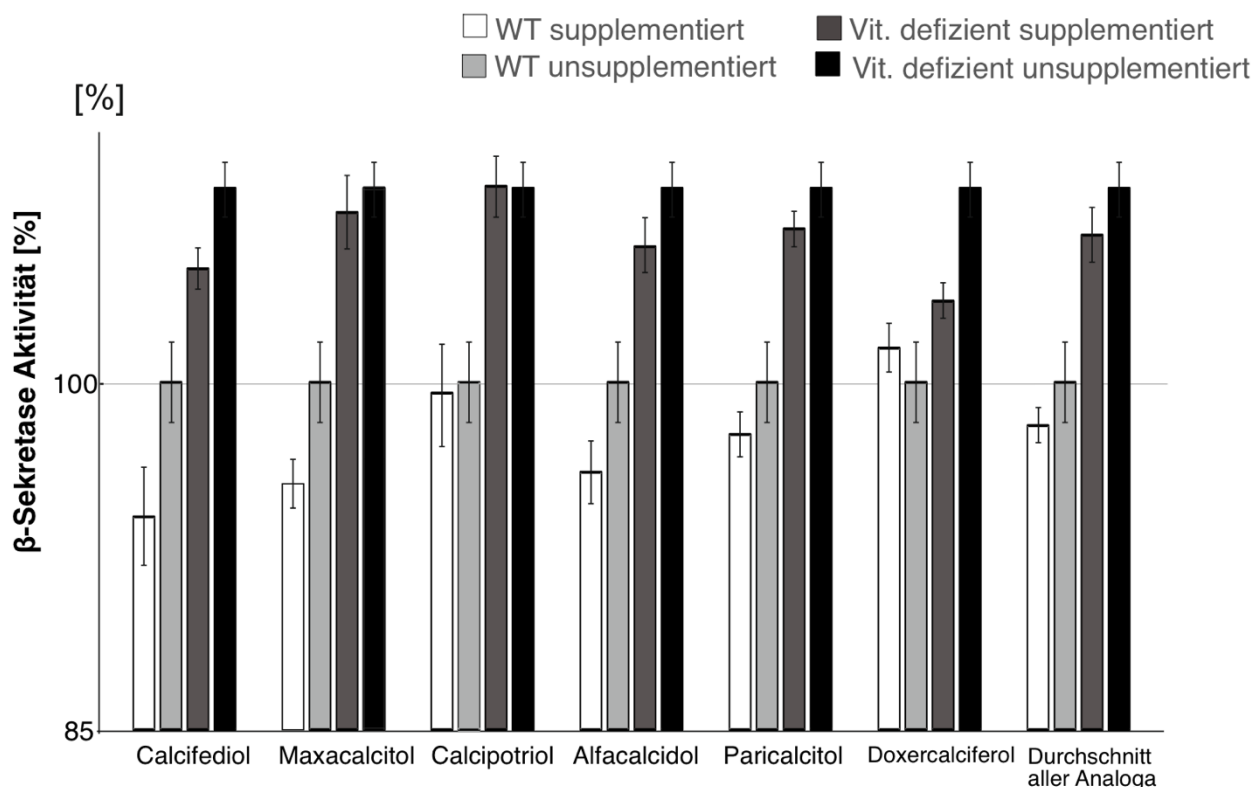
Nach Berechnung des Durchschnittswerts der Effekte der Analoga, bestand eine nicht signifikante Senkung der  $\beta$ -Sekretase Aktivität auf 98,1 % (Durchschnitt aller Analoga:  $98,1 \pm 1,1$  %,  $p = 0,280$ ).

#### **4.3.5 Bestimmung der $\beta$ -Sekretase Aktivität in Vitamin D unterversorgten Maushirnen**

Die in Kapitel 4.3.4 dargelegten Ergebnisse wurden nach Bolus Substitution der Analoga im Wildtypmodell erhoben, wobei davon auszugehen ist, dass der Vitamin D Speicher aufgrund der Vitamin D haltigen Ernährung der Mäuse hinreichend gefüllt war.

Nachfolgend wurden die Effekte einer Vitamin D Substitution ausgehend von einer Vitamin D Mangelsituation betrachtet. Hierzu wurde wie in Kapitel 3.8.1 beschrieben durch Fütterung einer Vitamin D armen Kost eine Hypovitaminose generiert. Wie in *Grimm et. al* beschrieben, enthielt das Hirngewebe einen um 23 % reduzierten zerebralen Calcifediol-Gehalt und einen auf 110,0 % erhöhten A $\beta$ <sub>40</sub> bzw. auf 112,8 % erhöhten A $\beta$ <sub>42</sub>-Spiegel (GRIMM et al., 2014). Signifikante Gewichtsunterschiede, die auf eine Unterernährung der Vitamin D defizienten Mäuse hinweisen könnten, wurden nicht detektiert (Wildtypmäuse:  $27,94 \pm 1,17$  g; Vitamin D defiziente Mäuse:  $27,69 \pm 0,97$  g;  $p = 0,88$ ) (LEHMANN, 2018).





**Abbildung 6  $\beta$ -Sekretase Aktivität nach Vitamin D Analoga Substitution im murinen *ex vivo* Wildtyp- und Vitamin D supprimiertem Modell**

Mittels FRET basierter Enzymmessung wurde die  $\beta$ -Sekretase Aktivität in murinen Hirnproben nach *ex vivo* Substitution von 100 nM Calcifediol, Maxacalcitol, Calcipotriol, Alfacalcidol, Paricalcitol oder Doxercalciferol bestimmt. Vermessen wurden zunächst Proben von fünf Wildtyp (WT) Mäusen. Im Anschluss wurde der Versuch mit fünf Mäusen, in denen zuvor durch Vitamin D arme Fütterung eine Hypovitaminose erzeugt wurde (Vit. defizient) wiederholt. Bei diesem Versuch wurden drei Wildtypkontrollproben mitvermessen. Dargestellt ist die relative  $\beta$ -Sekretase Aktivität nach Substitution im Vergleich zur auf 100% genormten  $\beta$ -Sekretase Aktivität im nicht supplementierten Wildtypmaushirn. Die nicht supplementierten Proben wurden mit dem Lösungsmittel EtOH substituiert. Die Fehlerbalken geben die mittlere Standardabweichung an. Die Signifikanzen sind zur besseren Übersicht in Tabelle 16-16 dargestellt ( $n = 3$ ) (Abb. modifiziert nach Thiel et al. 2017).

Die insgesamt fünf murinen Proben wurden homogenisiert und 100 nM der unterschiedlichen Vitamin D Analoga wurden substituiert. Anschließend wurde die  $\beta$ -Sekretase Aktivität mittels FRET-basierter Enzymmessung ermittelt. Zusätzlich zu den fünf Vitamin D defizienten Mausproben wurden zur Kontrolle drei Wildtypmäuse gemessen.

Die Hirnproben, der mit dem Vitamin D defizienten Futter ernährten Mäuse zeigten im Vergleich zu den Proben der Wildtypmäuse eine auf 108,4 % gesteigerte  $\beta$ -Sekretase Aktivität ( $108,4 \pm 1,2 \%$ ,  $p < 0,001$ ).

Durch Substitution der Vitamin D unterversorgten Hirnproben mit 100 nM Calcifediol konnte die erhöhte  $\beta$ -Sekretase Aktivität wieder signifikant um 3,5 % in Richtung des Wildtypniveaus gesenkt werden (Calcifediol:  $104,9 \pm 0,9 \%$ ,  $p = 0,026$ ).

Nach Substitution der Vitamin D unterversorgten Hirnproben mit dem Vitamin D<sub>2</sub> Analogon Doxercalciferol reduzierte sich die unter der Vitamin D Mangelsituation erhöhte  $\beta$ -Sekretase Aktivität von 108,4 % signifikant auf 103,5 % (Doxercalciferol:  $103,5 \pm 1,9 \%$ ,  $p = 0,040$ ). Ein signifikanter Unterschied zwischen der  $\beta$ -Sekretase Aktivität im Hirn der Vitamin D unterversorgten Mäuse und im nicht substituierten Wildtyphirn bestand nach der Substitution von Doxercalciferol nicht mehr (vgl. Tabelle 15/16).

Die weiteren untersuchten Analoga veränderten die  $\beta$ -Sekretase Aktivität verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle unter den vorliegenden Versuchsbedingungen nicht statistisch signifikant (Maxacalcitol:  $107,4 \pm 1,6 \%$ ,  $p = 0,606$ ; Calcipotriol:  $108,5 \pm 1,3 \%$ ,  $p = 0,964$ ; Alfalcidol:  $105,9 \pm 1,2 \%$ ,  $p = 0,144$ ; Paricalcitol:  $106,6 \pm 0,76 \%$ ,  $p = 0,223$ ).

Gemittelt reduzierten die Analoga die  $\beta$ -Sekretase Aktivität in Vitamin D defizienten Maushirnen von 108,4 % auf 106,4 % (Durchschnitt aller Analoga:  $106,4 \pm 1,9 \%$ ,  $p = 0,181$ ) ohne das Signifikanzniveau zu erreichen.

Um zu überprüfen, ob es signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Effekten der Vitamin D Analoga auf die  $\beta$ -Sekretase Aktivität gab, wurde eine ANOVA mit anschließender Bonferroni-post hoc Testung durchgeführt. Wie in Tabelle 15 dargestellt, bestand kein Unterschied zwischen den einzelnen getesteten Vitamin D Analoga und Calcifediol.

**Tabelle 15 Mittels Bonferroni post-hoc Test ermittelten Signifikanzen beim Vergleich der Effekte von Calcifediol und den Vitamin D Analoga auf die  $\beta$ -Sekretase Aktivitäten in murinen Proben**

Mittels FRET basierter Enzymmessung wurde die  $\beta$ -Sekretase Aktivität in murinen Wildtyp-Hirnproben (WT) und Vitamin D defizienten Hirnen (Defizient) ermittelt. Zuvor wurden 100 nM Lösungsmittelkontrolle, Calcifediol, Maxacalcitol, Calcipotriol, Alfacalcidol, Paricalcitol oder Doxercalciferol substituiert. Mittels ANOVA und post-hoc Testung wurde errechnet, ob signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Vitamin D Analoga sowie Calcifediol bestehen. Angegeben sind die p-Werte des Bonferroni-Testes.

		WT	Defizient
<b>Calcifediol</b>	<b>Alfacalcidol</b>	> 0,999	> 0,999
	<b>Calcipotriol</b>	0,466	0,967
	<b>Doxercalciferol</b>	0,066	> 0,999
	<b>Maxacalcitol</b>	> 0,999	> 0,999
	<b>Paricalcitol</b>	> 0,999	> 0,999
<b>Alfacalcidol</b>	<b>Calcipotriol</b>	> 0,999	> 0,999
	<b>Doxercalciferol</b>	0,515	> 0,999
	<b>Maxacalcitol</b>	> 0,999	> 0,999
	<b>Paricalcitol</b>	> 0,999	> 0,999
<b>Calcipotriol</b>	<b>Doxercalciferol</b>	> 0,999	0,158
	<b>Maxacalcitol</b>	> 0,999	> 0,999
	<b>Paricalcitol</b>	> 0,999	> 0,999
<b>Doxercalciferol</b>	<b>Maxacalcitol</b>	0,316	0,686
	<b>Paricalcitol</b>	> 0,999	> 0,999
<b>Maxacalcitol</b>	<b>Paricalcitol</b>	> 0,999	> 0,999

In Tabelle 16 sind die mittels student's t-test errechneten Signifikanzen bei direkter Gegenüberstellung der Wildtyp- oder der Vitamin D defizienten Hirne nach Inkubation der

Kontrolle oder der Vitamin D Präparate dargestellt. Tabelle 17 zeigt die Signifikanzen, die durch Bonferroni post-hoc Testung ermittelt wurden. Hier wurde im Gegensatz zum student's t-test ein Mehrfachvergleich der Bedingungen vorgenommen.

**Tabelle 16 Mittels student's t-test ermittelte Signifikanzen beim Vergleich der  $\beta$ -Sekretase Aktivität in murinen Proben nach Inkubation von Vitamin D Analoga**

Mittels FRET basierter Enzymmessung wurde die  $\beta$ -Sekretase Aktivität in murinen Hirnproben nach ex vivo Substitution von 100 nM Lösungsmittelkontrolle, Calcifediol, Maxacalcitol, Calcipotriol, Alfacalcidol, Paricalcitol oder Doxercalciferol bestimmt. Die Tabelle fasst die p-Werte der mittels student's t-test ermittelten Signifikanzen zusammen. Die linke Spalte gibt an, welche beiden Ergebnisse miteinander verglichen wurden. „WT +“ kennzeichnet hierbei die mit Vitamin D Analoga substituierten Wildtypmäuse. „Defizient +“ beschreibt die Maushirne der Vitamin D defizienten Mäuse. Welches der Analoga substituiert wurde, ist der jeweiligen Spaltenüberschrift zu entnehmen. Proben, die mit der Lösungsmittelkontrolle behandelt wurden, sind mit „WT -“ bzw. „Defizient -“ gekennzeichnet. Ein p-Wert  $\leq 0,05$  entsprach einem statistisch signifikanten Ergebnis.

		Calcifediol	Alfacalcidol	Calcipotriol	Doxercalciferol	Maxacalcitol	Paricalcitol
<b>WT +</b>	<b>WT -</b>	0,028	0,050	0,858	0,573	0,015	0,179
	<b>Defizient +</b>	< 0,001	< 0,001	0,002	0,499	< 0,001	< 0,001
	<b>Defizient -</b>	< 0,001	0,002	0,002	0,014	< 0,001	< 0,001
<b>WT -</b>	<b>Defizient +</b>	0,005	0,003	< 0,001	0,145	0,001	< 0,001
	<b>Defizient -</b>	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
<b>Defizient +</b>	<b>Defizient -</b>	0,026	0,144	0,964	0,040	0,606	0,223

**Tabelle 17 Mittels Bonferroni post-hoc Test ermittelte Signifikanzen beim Vergleich der  $\beta$ -Sekretase Aktivitäten in murinen Proben nach Inkubation von Vitamin D Analoga**

Mittels FRET basierter Enzymmessung wurde die  $\beta$ -Sekretase Aktivität in murinen Hirnproben nach ex vivo Substitution von 100 nM Lösungsmittelkontrolle, Calcifediol, Maxacalcitol, Calcipotriol, Alfacalcidol, Paricalcitol oder Doxercalciferol bestimmt. Mittels Bonferroni-korrigiertem post-hoc Test wurde errechnet, ob signifikante Unterschiede zwischen den Bedingungen „substituiertes Wildtyp-Hirn (WT+)“, „Lösungsmittelbehandeltes Wildtyp-Hirn (WT-)“, „substituiertes, Vitamin D defizientes Hirn (Defizient+)“ und „Lösungsmittelbehandeltes, Vitamin D defizientes Hirn (Defizient-)“ bestehen. Welches Vitamin D Analoga substituiert wurde, ist in der jeweiligen Spaltenüberschrift angegeben. Ein p-Wert  $\leq 0,05$  entsprach einem statistisch signifikanten Ergebnis.

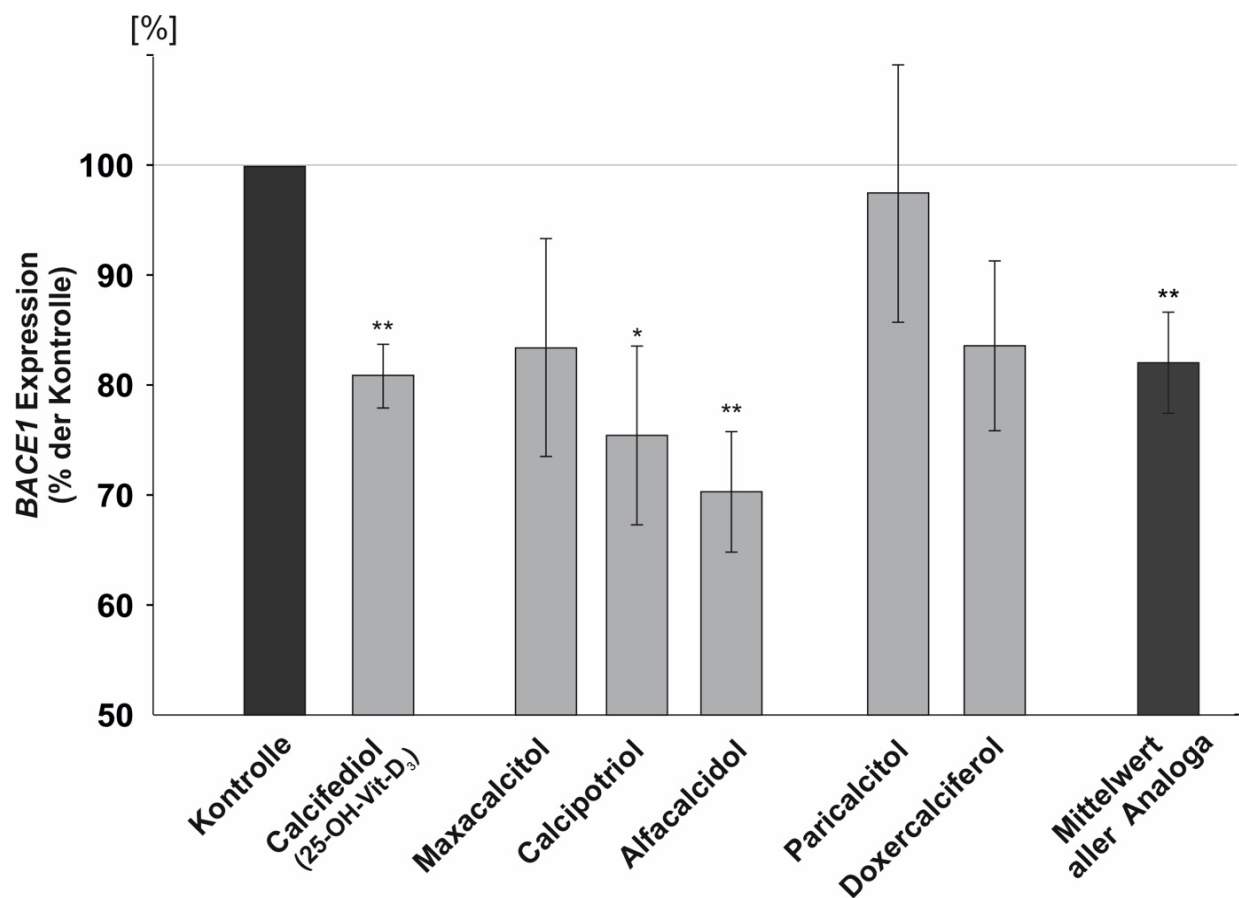
		Calcifediol	Alfacalcidol	Calcipotriol	Doxercalciferol	Maxacalcitol	Paricalcitol
<b>WT +</b>	<b>WT -</b>	0,039	0,239	> 0,999	> 0,999	0,167	0,945
	<b>Defizient +</b>	< 0,001	< 0,001	0,001	> 0,999	< 0,001	< 0,001
	<b>Defizient -</b>	< 0,001	< 0,001	0,001	0,038	< 0,001	< 0,001
<b>WT -</b>	<b>Defizient +</b>	0,099	0,010	0,002	0,873	0,001	< 0,001
	<b>Defizient -</b>	0,001	< 0,001	0,002	0,005	< 0,001	< 0,001
<b>Defizient +</b>	<b>Defizient -</b>	0,450	0,878	> 0,999	0,226	1,000	> 0,999

#### 4.3.6 Messung der BACE1-Expression in SH-SY5Y WT Zellen

Die gezeigte Reduktion der  $\beta$ -Sekretase Aktivität in isolierten SH-SY5Y WT Membranen und im ex vivo Modell zeigt den *direkten* Einfluss der Vitamin D Analoga auf die Enzymaktivität. Da jedoch in metabolisch aktiven Zellen im Vergleich zu den isolierten Membranen eine deutlichere Reduktion der  $\beta$ -Sekretase Aktivität erhoben wurde, müssen auch *indirekte* Faktoren einen Einfluss auf die Aktivitätsänderung nehmen.

Anknüpfend wurde daher die Expression des für die  $\beta$ -Sekretase verantwortlichen Gens *BACE1* untersucht. Hierfür wurden SH-SY5Y WT Zellen mit Vitamin D Analoga inkubiert und im Anschluss die RNS isoliert, in cDNS umgeschrieben und die Genexpression mittels PCR analysiert (siehe Kapitel 3.11).

Wie in Abbildung 7 graphisch dargestellt, wurde durch die Inkubation mit Calcifediol die *BACE1* Genexpression signifikant auf 80,8 % verringert (Calcifediol:  $80,8 \pm 2,9 \%$ ,  $p = 0,003$ ).



**Abbildung 7** *BACE1* Genexpression in SH-SY5Y WT Zellen nach Vitamin D Analoga Inkubation

Aus für 24 h mit 100 nM Calcifediol, Maxacalcitol, Calcipotriol, Alfalcidol, Paricalcitol oder Doxercalciferol inkubierten SH-SY5Y WT Zellen wurde RNS isoliert und in cDNS umgeschrieben. Im Anschluss wurde mittels RT-PCR die Genexpression von *BACE1* bestimmt. Die Fehlerbalken geben die mittlere Standardabweichung an, die durch Sterne dargestellten Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaarten Student's *t*-test ermittelt (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ) ( $n = 3$ ) (Abb. modifiziert nach Thiel et al.2017).

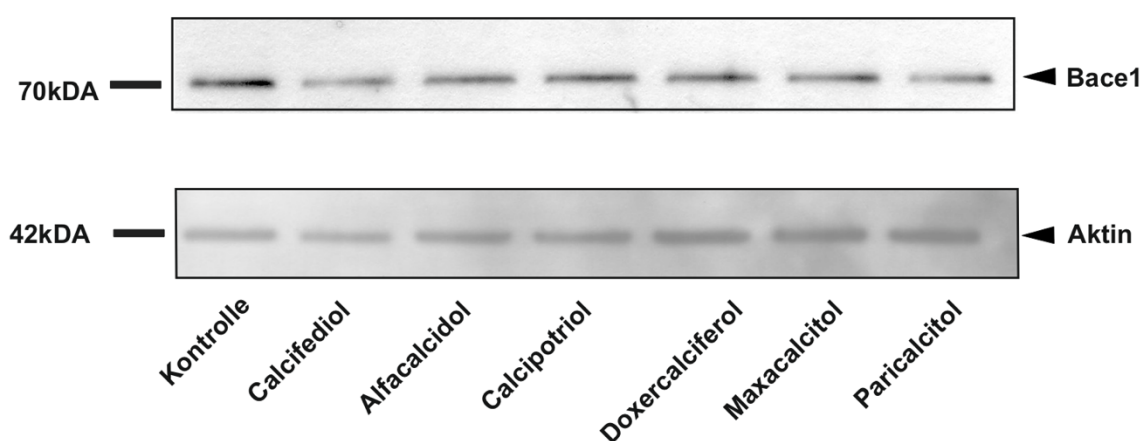
Die Vitamin D<sub>3</sub> Analoga Calcipotriol und Alfacalcidol senkten die Genexpression auf 75,4 % bzw. 70,2 % (Calcipotriol:  $75,4 \pm 8,1\%$ ,  $p = 0,040$ ; Alfacalcidol:  $70,3 \pm 5,4\%$ ,  $p = 0,006$ ). Die übrigen untersuchten Analoga zeigten tendenziell ebenfalls eine Reduktion, erlangten hierbei jedoch keine statistische Signifikanz (Maxacalcitol:  $83,5 \pm 9,9\%$ ,  $p = 0,171$ ; Paricalcitol:  $97,6 \pm 11,7\%$ ,  $p = 0,846$ ; Doxercalciferol:  $83,6 \pm 7,74\%$ ,  $p = 0,102$ ).

Insgesamt erzielten die Analoga im Mittel eine signifikante Reduktion der *BACE1* Genexpression auf 82,1 % (Durchschnitt aller Analoga:  $82,1 \pm 4,6\%$ ,  $p = 0,005$ ). Hierbei konnten durch ANOVA und Bonferroni post-hoc Analyse keine signifikanten Unterschiede zwischen den Effekten der einzelnen Analoga und Calcifediol erhoben werden.

#### 4.3.7 Bestimmung des *BACE1*-Proteinlevels nach Vitamin D Analoga Inkubation

Die in Kapitel 4.3.6 erhobenen Ergebnisse auf Transkriptionsebene wurden im nächsten Schritt auf Proteinebene verifiziert. Hierzu wurde mittels Western Blot Analyse das *BACE1*-Proteinlevel im Zelllysat von SH-SY5Y WT Zellen nach Inkubation der Lösungsmittelkontrolle, Calcifediol oder der Vitamin D Analoga gemessen.

Zur Ladekontrolle wurde auf derselben Nitrozellulosemembran im Anschluss der Aktin Gehalt bestimmt. Abbildung 8 zeigt exemplarisch zwei Röntgenfilme nach *BACE1*-Western Blot

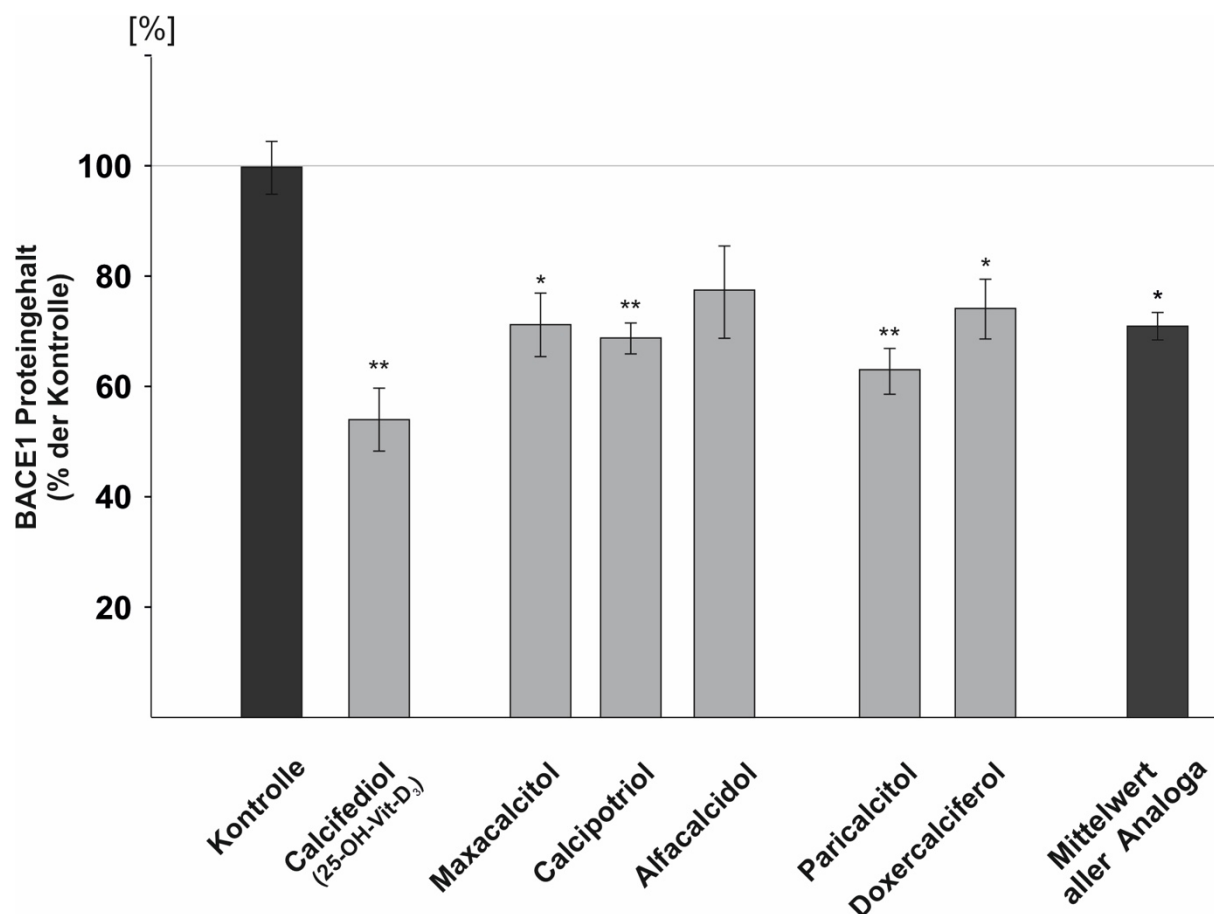


**Abbildung 8** Exemplarische Röntgenfilme nach Western Blot Analyse des *BACE1*- und Aktin-Proteingehaltes im Zelllysat von SH-SY5Y WT Zellen

SH-SY5Y WT Zellen wurden für 24 h mit 100 nM Lösungsmittelkontrolle, Calcifediol, Alfacalcidol, Calcipotriol, Doxercalciferol, Maxacalcitol oder Paricalcitol inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen lysiert und die *Bace1*-Proteinmenge mittels Western Blot Analyse unter Verwendung des W02-Antikörpers bestimmt. Zur Ladungskontrolle wurde die Membran im Anschluss mit einer Reblotlösung gestriipt und der Aktin Gehalt bestimmt.

bzw. Aktin-Western Blot. Die gleiche Signalintensität der Aktinbanden verdeutlicht die korrekte Übertragung der Proteine auf die Nitrozellulosemembran während des Western Blots sowie die gleichmäßige Einstellung der Proteinkonzentration und Ladung der Geltaschen.

Durch vorherige 24 h Inkubation mit 100 nM Calcifediol wurde in SH-SY5Y WT Zellysaten, wie in Abbildung 9 verdeutlicht, eine signifikante Senkung des BACE1 Proteinlevels auf 54,1 % erzielt (Calcifediol:  $54,1 \pm 5,7 \%$ ,  $p = 0,004$ ).



**Abbildung 9 BACE1 Proteinlevel in SH-SY5Y WT Lysat**

Mittels Western Blot Analyse wurde der BACE1 Proteingehalt im Zellysate von zuvor für 24 h mit 100 nM Calcifediol, Maxacalcitol, Calcipotriol, Alfalcidol, Paricalcitol oder Doxercalciferol inkubierter SH-SY5Y WT ermittelt. Die Ergebnisse sind prozentual zur Lösungsmittelkontrolle dargestellt. Die Fehlerbalken geben die mittlere Standardabweichung an, die durch Sterne dargestellten Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaarstem Student's t-test ermittelt (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ) ( $n = 3$ ) (Abb. modifiziert nach Thiel et al. 2017).

Die Vitamin D<sub>3</sub> Analoga Maxacalcitol und Calcipotriol senkten den BACE1 Gehalt signifikant um 20 bis 30 % (Maxacalcitol:  $71,4 \pm 5,8 \%$ ,  $p = 0,020$ ; Calcipotriol:  $68,9 \pm$



2,8 %,  $p = 0,009$ ). Alfacalcidol zeigte ebenfalls einen tendenziell senkenden, wenn auch nicht signifikanten Einfluss (Alfacalcidol:  $77,6 \pm 8,4$  %,  $p = 0,099$ ).

Die Vitamin D<sub>2</sub> Analoga Paricalcitol und Doxercalciferol reduzierten den BACE1 Proteingehalt verglichen zur Lösungsmittelkontrolle auf 63,2 % und 74,3 % (Paricalcitol:  $63,2 \pm 4,2$  %,  $p = 0,005$ ; Doxercalciferol:  $74,3 \pm 5,4$  %,  $p = 0,025$ ).

Im Durchschnitt wurde durch die Analoga eine signifikante Reduktion des BACE1 Levels auf 71,1 % erreicht (Durchschnitt aller Analoga:  $71,1 \pm 2,5$  %,  $p = 0,011$ ), ein signifikanter Unterschied zwischen den Analoga bestand in ANOVA und Post hoc Testung nicht.

#### **4.3.8 Bestimmung der $\gamma$ -Sekretase Aktivität**

Durch den  $\gamma$ -Sekretase Schnitt als zweiten Schritt in der APP-Prozessierung wird  $\beta$ -CTF in das potenziell zytotoxische A $\beta$  und AICD prozessiert (DE STROOPER et al., 1999; HAMPEL et al., 2021). Nachfolgend wurde mittels FRET basierter Nachweismethode in metabolisch aktiven SH-SY5Y WT Zellen die Enzymaktivität der  $\gamma$ -Sekretase nach Inkubation der Analoga bestimmt.

Im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle konnte durch die Behandlung der Zellen mit Calcifediol eine Aktivitätsabnahme der  $\gamma$ -Sekretase auf 85,2 % erzielt werden (Calcifediol:  $85,3 \pm 2,5$  %,  $p \leq 0,001$ ).

Die untersuchten Vitamin D Analoga zeigten bis auf Calcipotriol ebenfalls Einflüsse auf die  $\gamma$ -Sekretase Aktivität. Während das Vitamin D<sub>3</sub> Analoga Maxacalcitol eine signifikante Reduktion auf 91,3 % bewirkte, konnten die  $\gamma$ -Sekretase Aktivität durch Alfacalcidol auf 74,7 % gesenkt werden (Maxacalcitol:  $91,3 \pm 3,0$  %,  $p = 0,039$ ; Alfacalcidol:  $74,7 \pm 3,3$  %,  $p \leq 0,001$ ). Calcipotriol erzielte keine signifikanten Einflüsse (Calcipotriol:  $95,5 \pm 2,9$  %,  $p = 0,227$ ).

Die untersuchten Vitamin D<sub>2</sub> Analoga verringerten die Enzymaktivität ebenfalls signifikant um 20 % (Paricalcitol:  $80,6 \pm 4,0$  %,  $p = 0,0014$ ; Doxercalciferol:  $80,2 \pm 4,3$  %,  $p = 0,0017$ ).

Durchschnittlich wurde die Aktivität der  $\gamma$ -Sekretase durch die Inkubation der Vitamin D Analoga auf 86,1 % herabgesetzt (Mittelwert der Analoga:  $86,1 \pm 3,4$  %,  $p = 0,003$ ). Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 dargestellt.

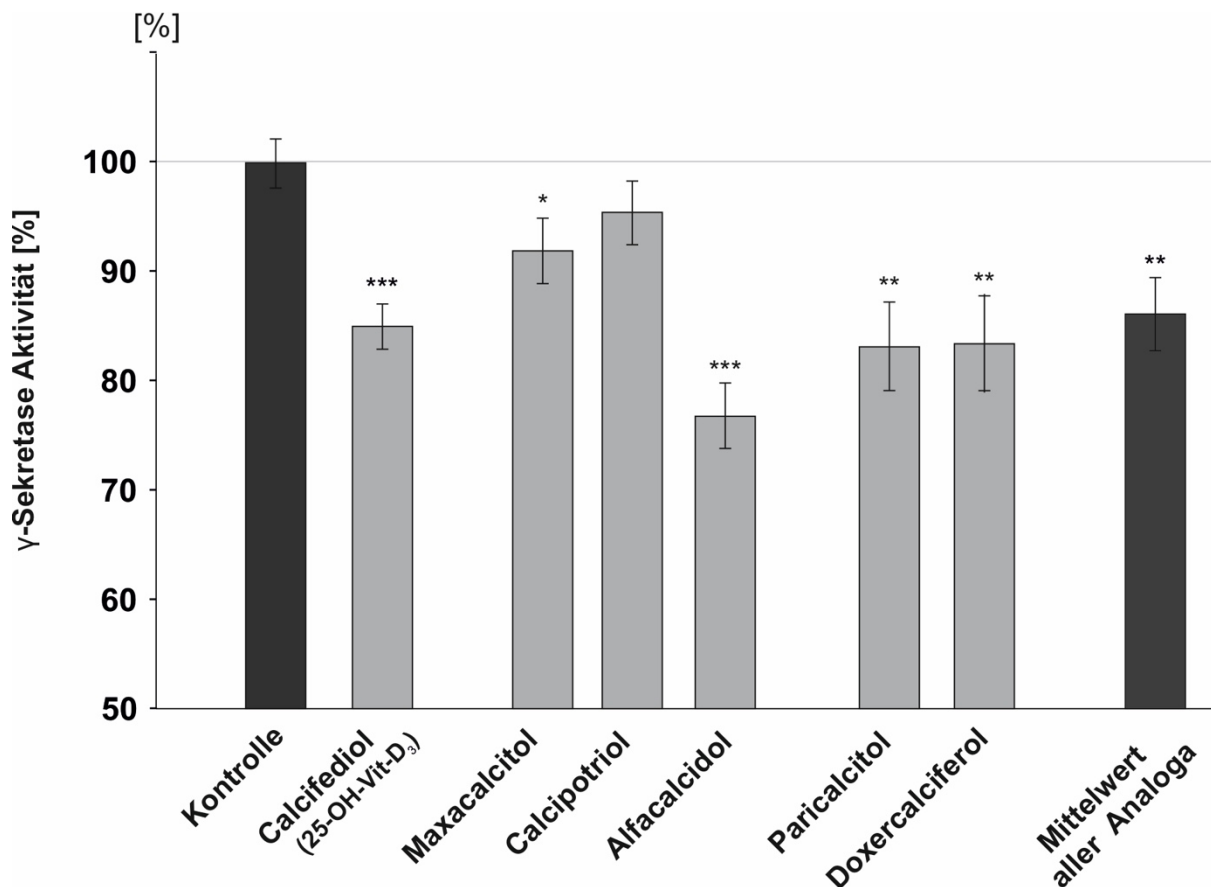


Abbildung 10 Bestimmung der  $\gamma$ -Sekretase Aktivität in metabolisch aktiven SH-SY5Y WT Zellen

Nach 24 h Inkubation mit 100 nM Calcifediol, Maxacalcitol, Calcipotriol, Alfacalcidol, Paricalcitol oder Doxercalciferol wurde die  $\gamma$ -Sekretase Aktivität in metabolisch aktiven SH-SY5Y WT Zellen mittels fluorometrischer Nachweismethode vermessen. Die Ergebnisse sind prozentual zur Lösungsmittelkontrolle dargestellt. Die Fehlerbalken geben die mittlere Standardabweichung an, die durch Sterne dargestellten Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaarten Student's t-test ermittelt (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ) ( $n = 5$ ) (Abb. modifiziert nach Thiel et al. 2017).

#### 4.3.9 Bestimmung der NCSTN-Genexpression

Um die erhobenen Ergebnisse der  $\gamma$ -Sekretase Aktivitätsmessung zu verifizieren, wurde eine Genexpressionsanalyse für Nicastrin als Komponente der  $\gamma$ -Sekretase durchgeführt. Aus zuvor inkubierten SH-SY5Y WT Zellen wurde hierzu die RNS isoliert, in cDNS umgeschrieben und die NCSTN-Genexpression mittels RT-PCR analysiert.

Wie in Abbildung 11 dargestellt, zeigte sich in der cDNS der mit 100 nM Calcifediol behandelten Zellen, verglichen mit den mit reinem Lösungsmittel inkubierten Zellen, eine signifikant auf 83,3 % gesenkte *NCSTN*-Genexpression (Calcifediol:  $83,3 \pm 4,1$  %,  $p = 0,015$ ).

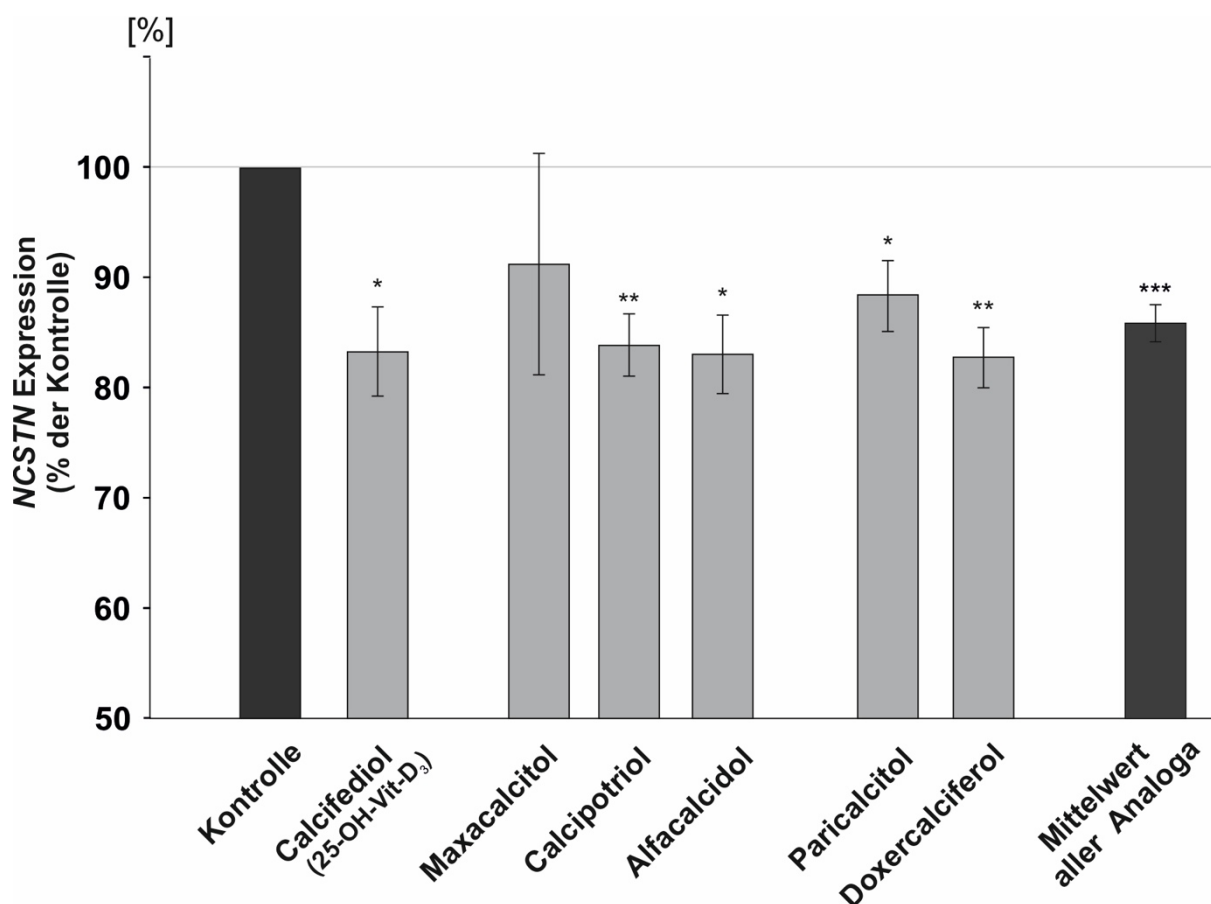


Abbildung 11 *NCSTN* Genexpression nach Inkubation mit 100 nM Vitamin D Analoga

*SH-SY5Y WT* Zellen wurden mit 100 nM Calcifediol, Maxacalcitol, Calcipotriol, Alfacalcidol, Paricalcitol oder Doxercalciferol inkubiert. Nach RNS Isolation und Umschreibung in cDNS wurde mittels RT-PCR die Genexpression von *NCSTN* bestimmt. Die Ergebnisse sind prozentual zur Lösungsmittelkontrolle dargestellt. Die Fehlerbalken geben die mittlere Standardabweichung an, die durch Sterne dargestellten Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaarten Student's *t*-test ermittelt (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ) ( $n = 3$ ) (Abb. modifiziert nach Thiel et al.2017).

Auch nach Behandlung der Zellen mit den Vitamin D Analoga war die Genexpression für *NCSTN* in der vermessenen cDNS signifikant reduziert. Ausnahme bildete hier die Inkubation

mit Maxacalcitol, die verglichen zur Lösungsmittelkontrolle keine Effekte auf die Expression erzielte (Maxacalcitol:  $91,2 \pm 10,1$  %,  $p = 0,435$ ).

Die restlichen Vitamin D<sub>2</sub> und Vitamin D<sub>3</sub> Analoga zeigten ähnliche Effektstärken zwischen 83 % und 88,5 % und erzielten durchschnittlich eine Verringerung der Expression auf 85,9 % (Calcipotriol:  $83,9 \pm 2,8$  %,  $p = 0,005$ ; Alfacalcidol:  $83,1 \pm 3,6$  %,  $p = 0,009$ ; Paricalcitol:  $88,5 \pm 3,2$  %,  $p = 0,023$ ; Doxercalciferol:  $82,8 \pm 2,7$  %,  $p = 0,003$ ; Durchschnitt aller Analoga:  $85,9 \pm 1,7$  %,  $p \leq 0,001$ ).

#### 4.4 Einfluss der Vitamin D Analoga auf die nicht amyloidogene APP-Prozessierung

Durch die nicht amyloidogene APP-Prozessierung kann die A $\beta$ -Bildung verhindert werden. APP wird hierbei durch die  $\alpha$ -Sekretase in der A $\beta$ -Domäne geschnitten, wodurch sAPP $\alpha$  und  $\alpha$ -CTF als Spaltprodukte entstehen (HAMPEL et al., 2021; ZHANG et al., 2011). Zur Ermittlung der Effekte der Vitamin D Analoga auf die nicht amyloidogene A $\beta$ -Prozessierung wurde in metabolisch aktiven SH-SY5Y WT Zellen nach vorheriger Vitamin D Analoga Inkubation die Aktivität der  $\alpha$ -Sekretase gemessen. Dies erfolgte mittels FRET basierter fluorometrischer Nachweismethode.

Nach Inkubation der SH-SY5Y WT Zellen mit 100 nM Calcifediol wurde im Vergleich zur reinen Behandlung mit der Lösungsmittelkontrolle eine signifikante Zunahme der  $\alpha$ -Sekretase Aktivität um 14,5 % ermittelt (Calcifediol:  $114,5 \pm 4,5$  %,  $p = 0,015$ ).

Durch die Inkubation der Zellen mit den Vitamin D Derivaten wurden keine Effekte auf die  $\alpha$ -Sekretase Aktivität beobachtet. Lediglich das Vitamin D<sub>2</sub> Analogon Paricalcitol bewirkte eine Zunahme der  $\alpha$ -Sekretase Aktivität auf 113,9 % (Paricalcitol:  $113,9 \pm 4,7$  %,  $p = 0,023$ ). Durch Alfacalcidol konnte eine tendenzielle, wenn auch nicht signifikante Steigerung der Enzymaktivität beobachtet werden (Alfacalcidol:  $107,58 \pm 2,9$  %,  $p = 0,069$ ). Die restlichen Vitamin D Analoga zeigten im Gegensatz hierzu jedoch keine signifikanten Effekte auf die Enzymaktivität (Maxacalcitol:  $101,94 \pm 5,4$  %,  $p = 0,750$ ; Calcipotriol:  $102,29 \pm 3,7$  %,  $p = 0,616$ ; Doxercalciferol:  $99,58 \pm 2,3$  %,  $p = 0,903$ ). Signifikante Unterschiede zwischen den

einzelnen Analoga ergaben sich nach ANOVA und post-hoc Analyse nicht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 dargestellt.

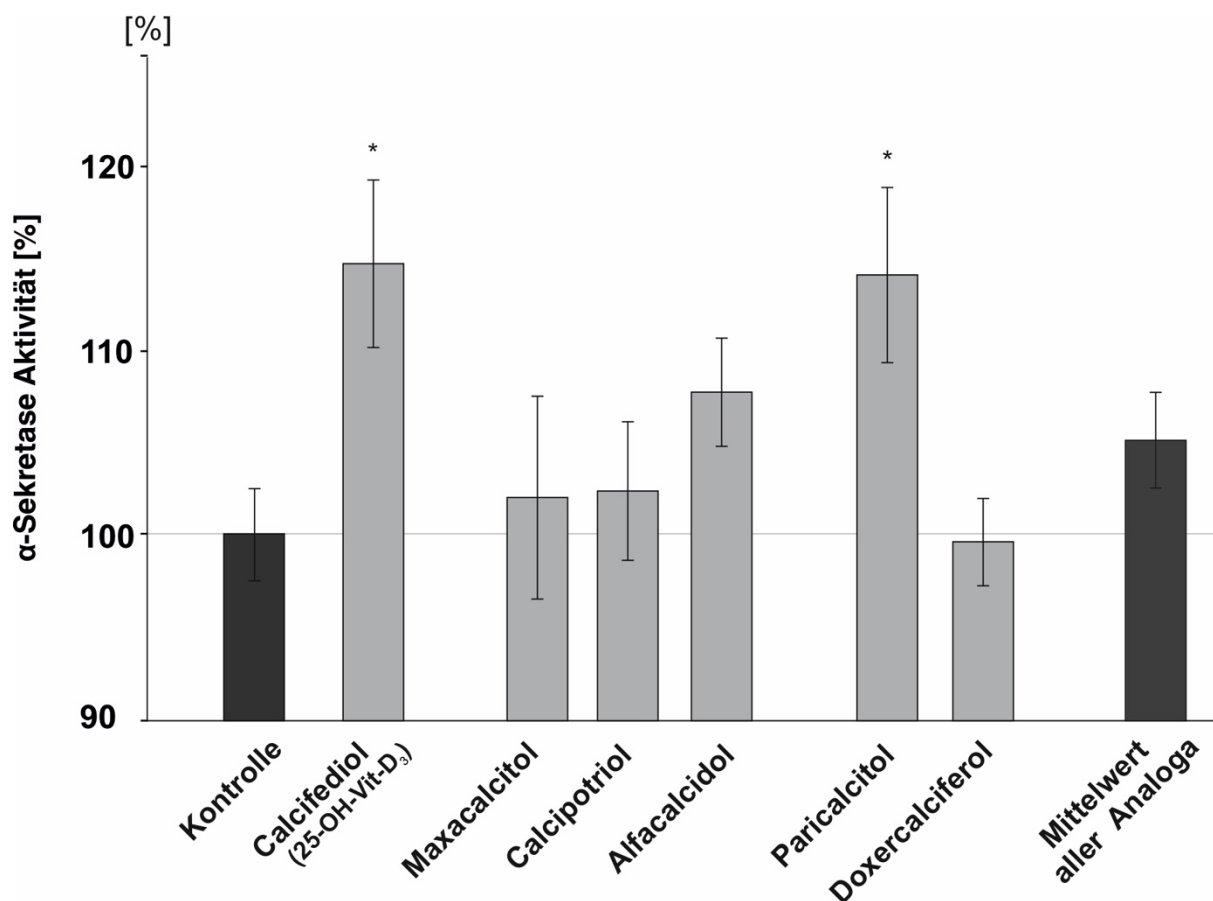


Abbildung 12 Aktivität der  $\alpha$ -Sekretase in metabolisch aktiven SH-SY5Y WT Zellen

Metabolisch aktive SH-SY5Y WT Zellen wurden für 24 h mit 100 nM Calcifediol, Maxacalcitol, Calcipotriol, Alfacalcidol, Paricalcitol oder Doxercalciferol inkubiert. Anschließend wurde mittels FRET basierter fluorometrischer Nachweismethode die  $\alpha$ -Sekretase Aktivität bestimmt. Die Ergebnisse sind prozentual zur Lösungsmittelkontrolle dargestellt. Die Fehlerbalken geben die mittlere Standardabweichung an, die durch Sterne dargestellten Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaarten Student's *t*-test ermittelt (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ) ( $n = 7$ ) (Abb. modifiziert nach Thiel et al. 2017).

## 4.5 Einfluss der Vitamin D Analoga auf den A $\beta$ -Katabolismus

Neben der APP-Prozessierung beeinflusst auch die A $\beta$ -Degradation das A $\beta$ -Level (MAWUENYEGA et al., 2010; ZHANG et al., 2011). Nachfolgend wurden daher die Effekte der Vitamin D Analoga auf den A $\beta$ -Katabolismus näher untersucht.

### 4.5.1 A $\beta$ -Gesamtdegradation in N2a WT-Zellen nach Inkubation mit Vitamin D Analoga

Zunächst wurde im Zellmodell der Einfluss der Vitamin D Analoga auf die Degradation von A $\beta$  analysiert. Hierzu wurden *in vitro* murine Neuroblastomzellen der Zelllinie N2a WT mit den Vitamin D Analoga behandelt und zusätzlich für 6 h mit humanem synthetisiertem A $\beta$ <sub>40</sub> inkubiert.

Im Anschluss wurde mittels Western Blot Analyse der verbleibende A $\beta$ -Spiegel im Kulturmedium bestimmt. Während die N2a Zellen sowohl ihr selbst produziertes murines A $\beta$  als auch das synthetische, humane A $\beta$ <sub>40</sub> abbauen, detektiert der verwendete W02-Primärantikörper ausschließlich das hinzugefügte humane A $\beta$ <sub>40</sub>. Die erhaltene Signalintensität des verbliebenen humanen A $\beta$  korrelierte umgekehrt proportional mit der A $\beta$ -Degradation in den Zellen. Durch die Bestimmung des humanen Peptids in der murinen Umgebung gelang eine Betrachtung der A $\beta$ -Degradation getrennt von der parallel in den Zellen ablaufenden Produktion.

Calcifediol steigerte die A $\beta$ -Degradation verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle signifikant auf 119,6 % (Calcifediol:  $119,6 \pm 4,45$  %,  $p = 0,034$ ). Wie in Abbildung 13 zu sehen, verstärkte die Inkubation mit Vitamin D Analoga den A $\beta$ -Abbau ebenfalls signifikant, im Schnitt erhöhte sie die A $\beta$ -Degradation um 56,1 % (Durchschnitt aller Analoga:  $156,1 \pm 3,2$  %,  $p \leq 0,001$ ). Den stärksten Einfluss zeigte die Behandlung der Zellen mit dem Vitamin D<sub>3</sub> Analogon Calcipotriol, wodurch der A $\beta$ -Abbau verglichen mit der reinen Inkubation mit EtOH mehr als verdoppelt wurde (Calcipotriol:  $202,1 \pm 4,2$  %,  $p = 0,002$ ). Die ebenfalls zur Gruppe der Vitamin D<sub>3</sub> Analoga gehörenden Analoga Maxacalcitol und Alfacalcidol erzielten eine Steigerung der A $\beta$ -Degradation auf 164,5 % bzw. 123,5 % (Maxacalcitol:  $164,5 \pm 6,3$  %,  $p = 0,009$ ; Alfacalcidol:  $123,5 \pm 3,5$  %,  $p = 0,046$ ).

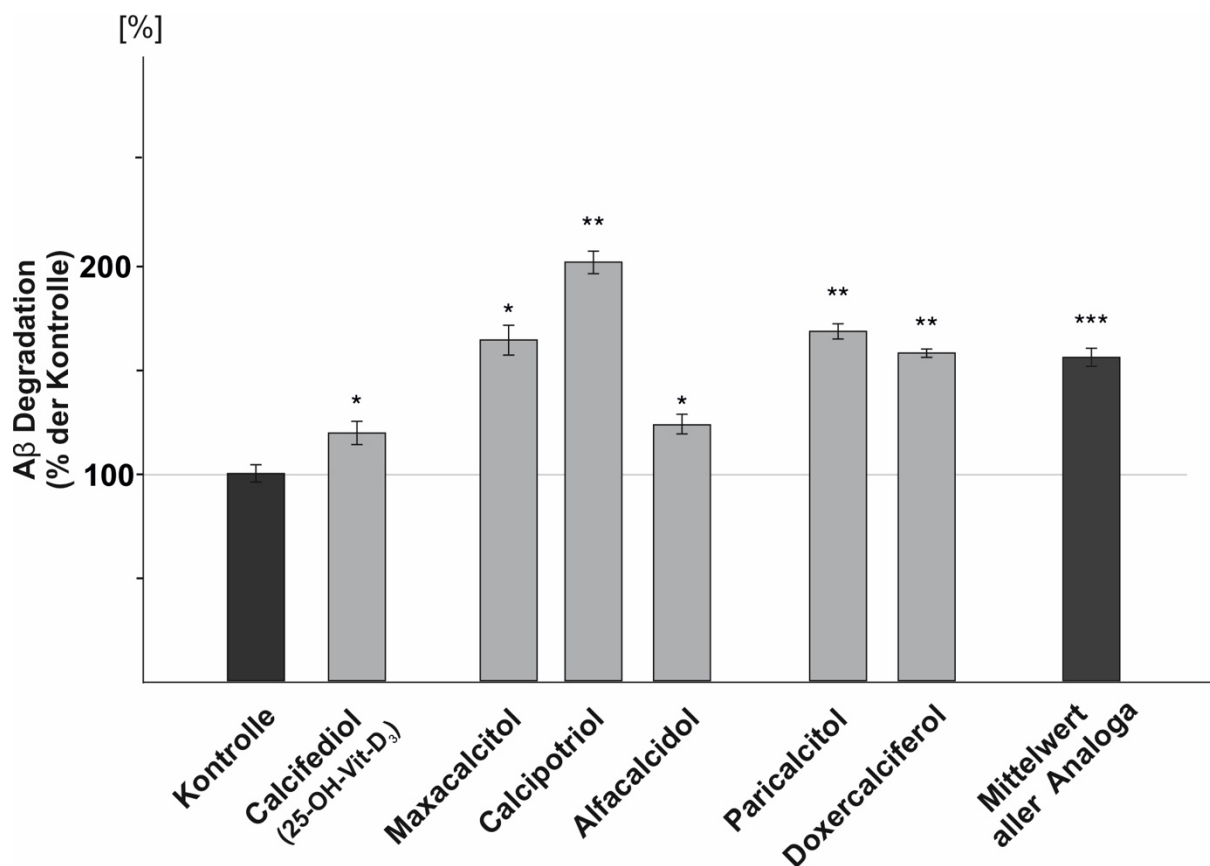


Abbildung 13 Effekte der Vitamin D Analoga auf die A $\beta$ -Degradation in N2a WT Zellen

N2a WT Zellen wurden für 18 h mit 100 nM Calcifediol, Maxacalcitol, Calcipotriol, Alfacalcidol, Paricalcitol oder Doxercalciferol vorbehandelt. Im Anschluss wurde für 6 h zusätzlich 0,5  $\mu$ g/ml humanes, synthetisches A $\beta$ <sub>40</sub> hinzugefügt und danach der verbleibende A $\beta$ -Spiegel im Kulturmedium mittels Western Blot Analyse ermittelt. Dargestellt ist die relative A $\beta$ -Degradation der Analoga prozentual zur Kontrolle mit Lösungsmittel. Die Fehlerbalken geben die mittlere Standardabweichung an, die durch Sterne dargestellten Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaarten Student's t-test ermittelt (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ) ( $n = 3$ ) (Abb. modifiziert nach Thiel et al. 2017).

Auch durch die Inkubation der untersuchten Vitamin D<sub>2</sub> Analoga wurde der Abbau des A $\beta$  deutlich verstärkt. 100 nM Paricalcitol erhöhte die Degradation im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle auf 168,66 %, Doxercalciferol steigerte sie auf 158,20 % (Paricalcitol:  $168,66 \pm 2,6$  %,  $p = 0,002$ ; Doxercalciferol:  $158,2 \pm 2,81$  %,  $p = 0,003$ ).

Signifikante Unterschiede zwischen den Effekten der einzelnen Analoga zeigten sich mittels ANOVA nicht.

Mittels Pearson Korrelation wurde überprüft, ob die in Kapitel 4.2 bestimmten Einflüsse der Vitamin D Derivate auf das A $\beta$ -Gesamtlevel mit den gemessenen Einflüssen auf die  $\beta$ -Sekretase Aktivität und die A $\beta$ -Degradation korrelieren. Es wurde tendenziell eine ausgeprägte, jedoch statistisch nicht signifikante Korrelation ermittelt ( $r = 0,699$ ;  $p = 0,081$ ). Auch das BACE1 Proteinlevel und die A $\beta$ -Degradation korrelierten tendenziell mit dem A $\beta$ -Level ( $r = 0,746$ ;  $p = 0,054$ ).

#### **4.5.2 A $\beta$ -Gesamtdegradation auf Vitamin D unterversorgten Maushirnen**

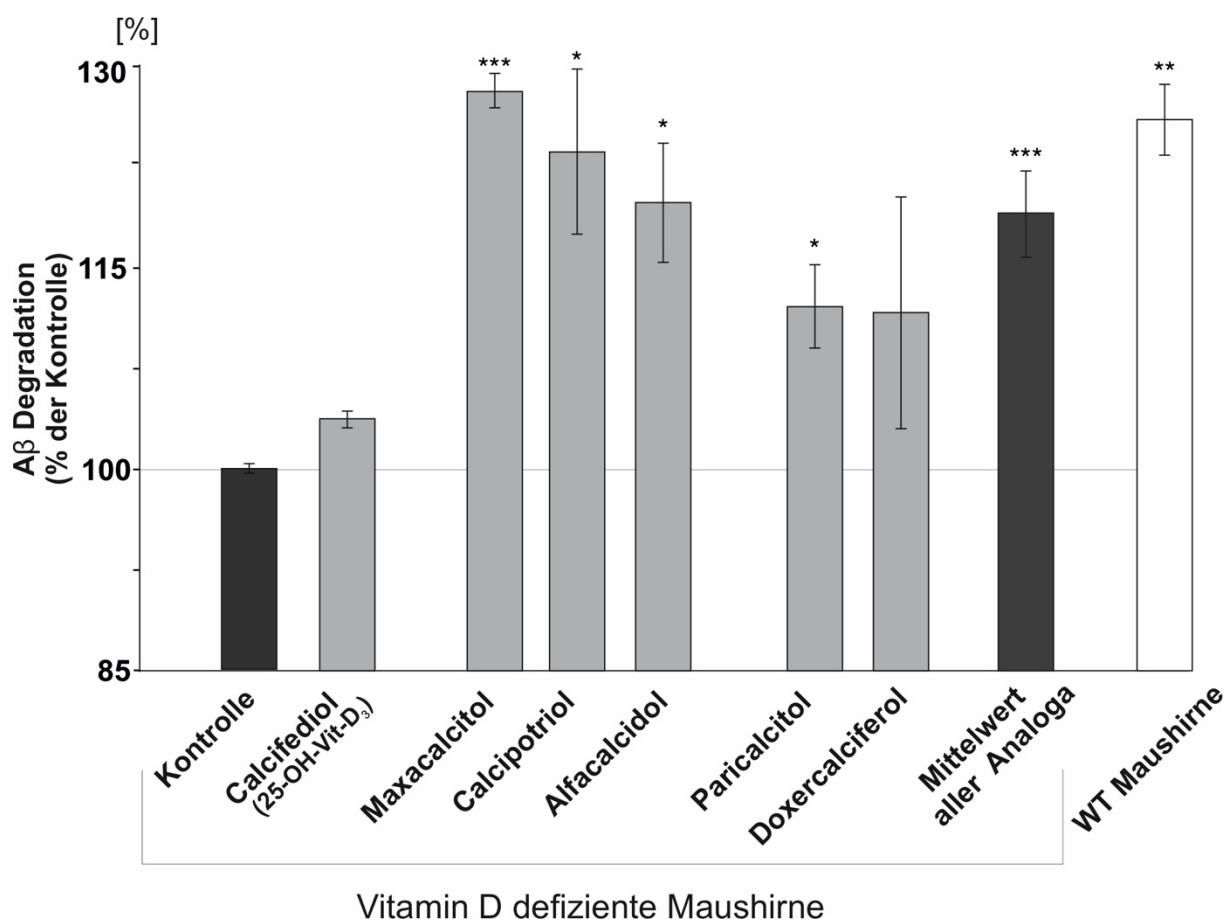
Um weiterführend die Effekte der Vitamin D Analoga auf die A $\beta$ -Degradation auch ausgehend von einem Vitamin D Mangel zu überprüfen, wurde *ex vivo* in Hirnproben von Mäusen mit Vitamin D Mangel die A $\beta$ -Degradation nach Inkubation der Vitamin D Analoga bestimmt. Hierzu wurden die mit 100 nM Vitamin D Analoga behandelten Hirnproben zusätzlich mit humanem A $\beta_{40}$  inkubiert und im Anschluss durch Western Blot Analyse unter Verwendung des W02 Antikörpers der verbleibende A $\beta_{40}$ -Gehalt bestimmt. Zusätzlich zu den Hirnproben von Mäusen mit Vitamin D Mangel wurden als Kontrolle Wildtypmaushirne mitvermessen, in denen ein gesättigter Vitamin D Status vorlag.

Bei reiner Behandlung der Hirnproben mit der Lösungsmittelkontrolle konnte in den Wildtypmaushirnproben signifikant weniger verbleibendes, humanes A $\beta_{40}$  nachgewiesen werden als in den Hirnproben der Mäuse mit Vitamin D Mangel. Unter gesättigten Vitamin D Bedingungen wurde verglichen zur Vitamin D Mangelsituation 26,21 % mehr A $\beta$  degradiert (Wildtyp-Kontrolle:  $126,2 \pm 1,2$  %,  $p = 0,002$ ).

Die Supplementierung der Hirnproben von den Mäusen mit Vitamin D Mangel mit 100 nM Calcifediol erzielte verglichen zur Inkubation der Lösungsmittelkontrolle keine Effekte auf die A $\beta$ -Degradation (Calcifediol:  $103,8 \pm 2,08$  %,  $p = 0,229$ ).



Die Vitamin D Analoga hingegen konnten mit Ausnahme von Doxercalciferol, wie in Abbildung 14 dargestellt, signifikanten Einfluss auf den Abbau von A $\beta$  in den Proben der Mäuse mit Vitamin D Mangel nehmen. Insbesondere die Inkubation der Vitamin D<sub>3</sub> Analoga Maxacalcitol, Calcipotriol und Alfacalcidol senkten im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle den verbleibenden A $\beta$ -Gehalt um 20 bis 28 % (Maxacalcitol:  $128,3 \pm 1,3$  %,  $p = 0,001$ ; Calcipotriol:  $123,8 \pm 6,2$  %,  $p = 0,041$ ; Alfacalcidol:  $120,0 \pm 4,5$  %,  $p = 0,027$ ).



**Abbildung 14** Einfluss der Vitamin D Analoga auf die *ex vivo* A $\beta$ -Degradation Vitamin D defizienter Maushirnhomogenaten

Homogenisierte Hirnproben von fünf Vitamin D unterversorgten Mäusen und einem Wildtypmaushirn wurden *ex vivo* auf Eis für 15min mit 100 nM Calcifediol, Maxacalcitol, Calcipotriol, Alfacalcidol, Paricalcitol, Doxercalciferol oder reiner Lösungsmittelkontrolle inkubiert. Im Anschluss erfolgte für 1h unter ständigem Schütteln bei 37 °C die Inkubation von 1  $\mu$ g/ml humanem, synthetischen A $\beta$ <sub>40</sub> sowie 1  $\mu$ M  $\beta$ -Sekretase Inhibitor und 20  $\mu$ M  $\gamma$ -Sekretase Inhibitor. Mittels Western Blot Analyse wurde unter Verwendung des W02 Antikörpers der verbleibende A $\beta$ -Spiegel bestimmt und die relative A $\beta$ -Degradation verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle errechnet. Die Fehlerbalken geben die mittlere Standardabweichung an, die durch Sterne dargestellten Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaarten Student's t-test ermittelt (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ) ( $n = 3$ ) ( $n = 4$ ) (Abb. modifiziert nach Thiel et al.2017).

Das Vitamin D<sub>2</sub> Analogon Paricalcitol steigerte den A $\beta$ -Abbau auf 112,2 %, während Doxercalciferol keinen signifikanten Einfluss auf die Degradierung nahm (Paricalcitol:  $112,2 \pm 3,1$  %,  $p = 0,043$ ; Doxercalciferol:  $111,8 \pm 8,7$  %,  $p = 0,299$ ). Durchschnittlich erhöhte die Inkubation der Vitamin D Analoga den A $\beta$ -Abbau in den murinen Hirnproben auf 119,2 % (Durchschnitt aller Analoga:  $119,2 \pm 3,2$  %,  $p \leq 0,001$ ). Im Gegensatz zur Behandlung mit Calcifediol steigerte die Behandlung mit Vitamin D Analoga damit mit Ausnahme von Doxercalciferol die A $\beta$ -Degradation in Hirnproben von Mäusen mit Vitamin D Mangel signifikant. Der Ausgleich der Vitamin D Mangelsituation durch die Supplementierung der Analoga konnte mit Ausnahme von Maxacalcitol, die A $\beta$ -Degradation nicht so stark beeinflussen wie ein von vornherein ausreichend gesättigter Vitamin D Status. Durch die Behandlung der Hirnproben von Mäusen mit Vitamin D Mangel mit Maxacalcitol wurde 2,1 % mehr A $\beta$  degradiert als im Wildtyphirn.

#### **4.5.3 Einflüsse der Vitamin D Analoga auf die NEP-Expression**

Die in Kapitel 4.5.2 dargestellten Effekte der Vitamin D Analoga auf die A $\beta$ -Degradation in murinen Hirnproben wurden *ex vivo* ermittelt. Die inkubierten Vitamin D Analoga konnten somit *direkt* auf die homogenisierten Hirnproben Einfluss nehmen, *indirekte* Effekte wie Transkriptions- oder Translationsveränderungen wurden in diesem Modell nicht berücksichtigt. Im Folgenden wurden diese *indirekten* Effekte näher untersucht.

Hierzu wurde zunächst der Effekt der Vitamin D Analoga auf die Genexpression von *NEP*, eines der am A $\beta$ -Abbau beteiligten Enzyme, bestimmt (NALIVAEVA et al., 2020). Mittels RT-PCR wurde die *NEP*-Expression nach Behandlung von SH-SY5Y WT Zellen mit den Vitamin D Analoga gemessen.

Wie in Abbildung 15 verdeutlicht, wurde die *NEP*-Expression in SH-SY5Y WT Zellen durch die vorherige Behandlung mit Calcifediol nicht beeinflusst (Calcifediol:  $102,91 \pm 3,09$  %,  $p = 0,368$ ).

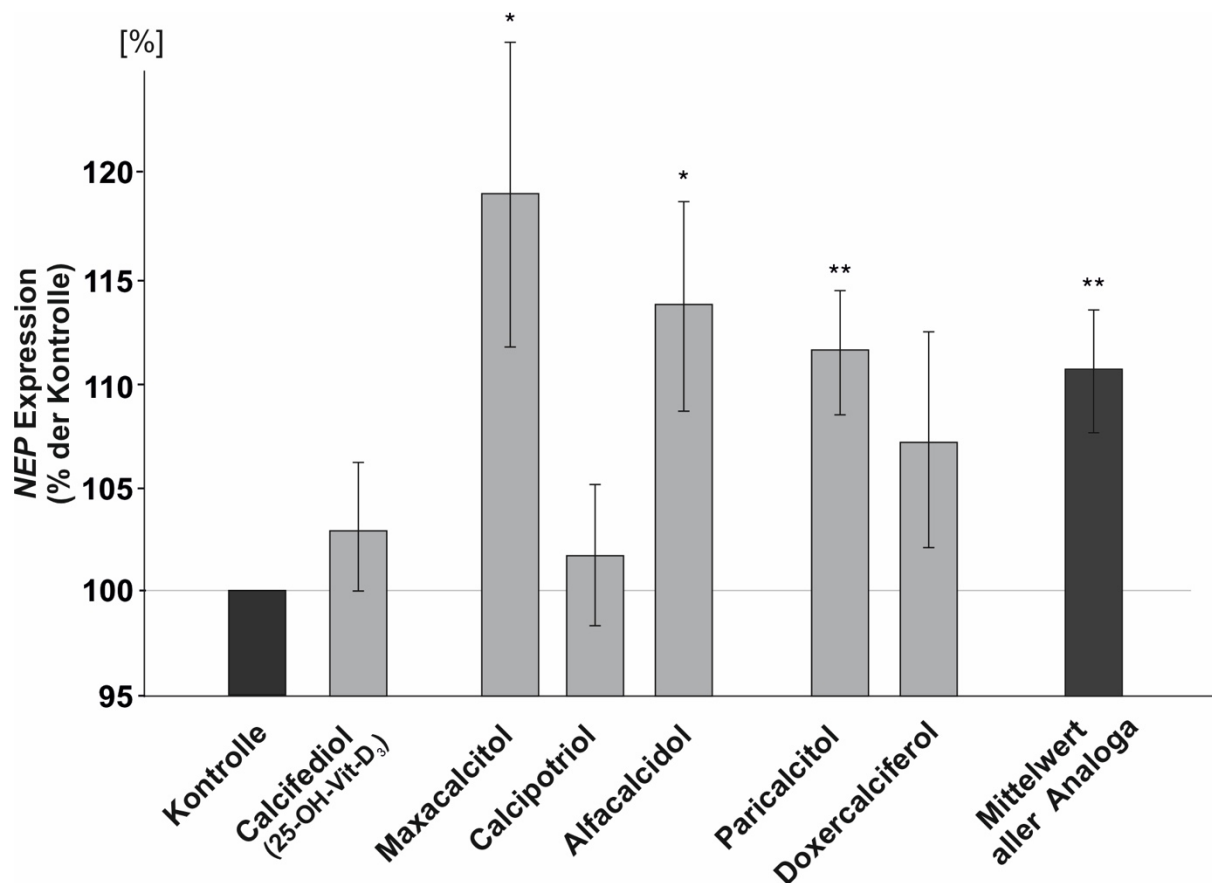


Abbildung 15 *NEP*-Expression in SH-SY5Y WT Zellen nach Inkubation von Vitamin D Analoga

SH-SY5Y WT Zellen wurden mit 100 nM Calcifediol, Maxacalcitol, Calcipotriol, Alfacalcidol, Paricalcitol oder Doxercalciferol inkubiert und im Anschluss RNS isoliert und in cDNS umgeschrieben. Die Bestimmung der Genexpression von *NEP* erfolgte mittels RT-PCR und wurde mit der Lösungsmittelkontrolle verglichen. Die Fehlerbalken geben die mittlere Standardabweichung an, die durch Sterne dargestellten Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaarten Student's *t*-test ermittelt (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ) ( $n = 3$ ) (Abb. modifiziert nach Thiel et al.2017).

Die Vitamin D<sub>3</sub> Analoga Alfacalcidol und Maxacalcitol erhöhten die *NEP*-Expression in den Zellen um 14 bzw. 19 % (Maxacalcitol:  $119,1 \pm 7,3$  %,  $p = 0,026$ ; Alfacalcidol:  $113,8 \pm 5,0$  %,  $p = 0,021$ ). Für Calcipotriol und Doxercalciferol wurden keine statistisch signifikanten Veränderungen der Expression beobachtet (Calcipotriol:  $101,72 \pm 3,4$  %,  $p = 0,622$ ; Doxercalciferol:  $107,15 \pm 5,2$  %,  $p = 0,197$ ).

Durch die Behandlung mit Paricalcitol wurde verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle eine signifikante Zunahme der *NEP*-Expression auf 111,6 % erzielt (Paricalcitol:  $111,6 \pm 3,0$  %,  $p = 0,003$ ).

Im Durchschnitt erhöhten die Vitamin D Analoga die NEP-Expression signifikant auf 110,7 % (Durchschnitt aller Analoga:  $110,7 \pm 2,9$  %,  $p = 0,007$ ). Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Analoga bestanden nach ANOVA-Analyse nicht.

#### **4.5.4 Einflüsse der Vitamin D Analoga auf die Neprilysin Aktivität in SH-SY5Y WT Zellen**

Neben der erhöhten Expression A $\beta$  degradierender Enzyme kann auch eine Aktivitätssteigerung der Enzyme zur Zunahme der A $\beta$ -Degradation führen. Daher wurde mittels FRET-basierter Nachweismethode die NEP-Enzymaktivität in SH-SY5Y WT Zellen nach Inkubation der Vitamin D Analoga bestimmt.

Nach acht Messwiederholungen lagen für Calcifediol verglichen zur Lösungsmittelkontrolle keine statistisch signifikanten Ergebnisse vor, sodass unter den gewählten Versuchsbedingungen keine Aussage zu einer Beeinflussung der Enzymaktivität getroffen werden konnte (Calcifediol:  $124,92 \pm 22,66$  %,  $p = 0,426$ ). Auch die Ergebnisse nach Behandlung der Zellen mit den Vitamin D<sub>3</sub> Analoga Calcipotriol und Maxacalcitol zeigten kein statistisch signifikantes Niveau (Calcipotriol:  $138,52 \pm 23,08$  %,  $p = 0,23$ ; Maxacalcitol:  $134,51 \pm 12,97$  %,  $p = 0,173$ ). Das Vitamin D<sub>2</sub> Analogon Doxercalciferol erhöhte die Enzymaktivität tendenziell auf 158,16 % (Doxercalciferol:  $158,16 \pm 25,16$  %,  $p = 0,093$ ). Nach Inkubation der Zellen mit Alfalcidol wurde verglichen zur Kontrolle eine signifikante Zunahme der NEP-Aktivität um 65,2 % gemessen. Wie in Abbildung 16 zu sehen, verdoppelte die Behandlung der Zellen mit Paricalcitol die Enzymaktivität von NEP (Paricalcitol:  $201,8 \pm 35,3$  %,  $p = 0,029$ ).

Gemittelt steigerten die Vitamin D Analoga die Enzymaktivität auf 159,63 % (Durchschnitt aller Analoga:  $159,63 \pm 5,37$  %,  $p = 0,001$ ).

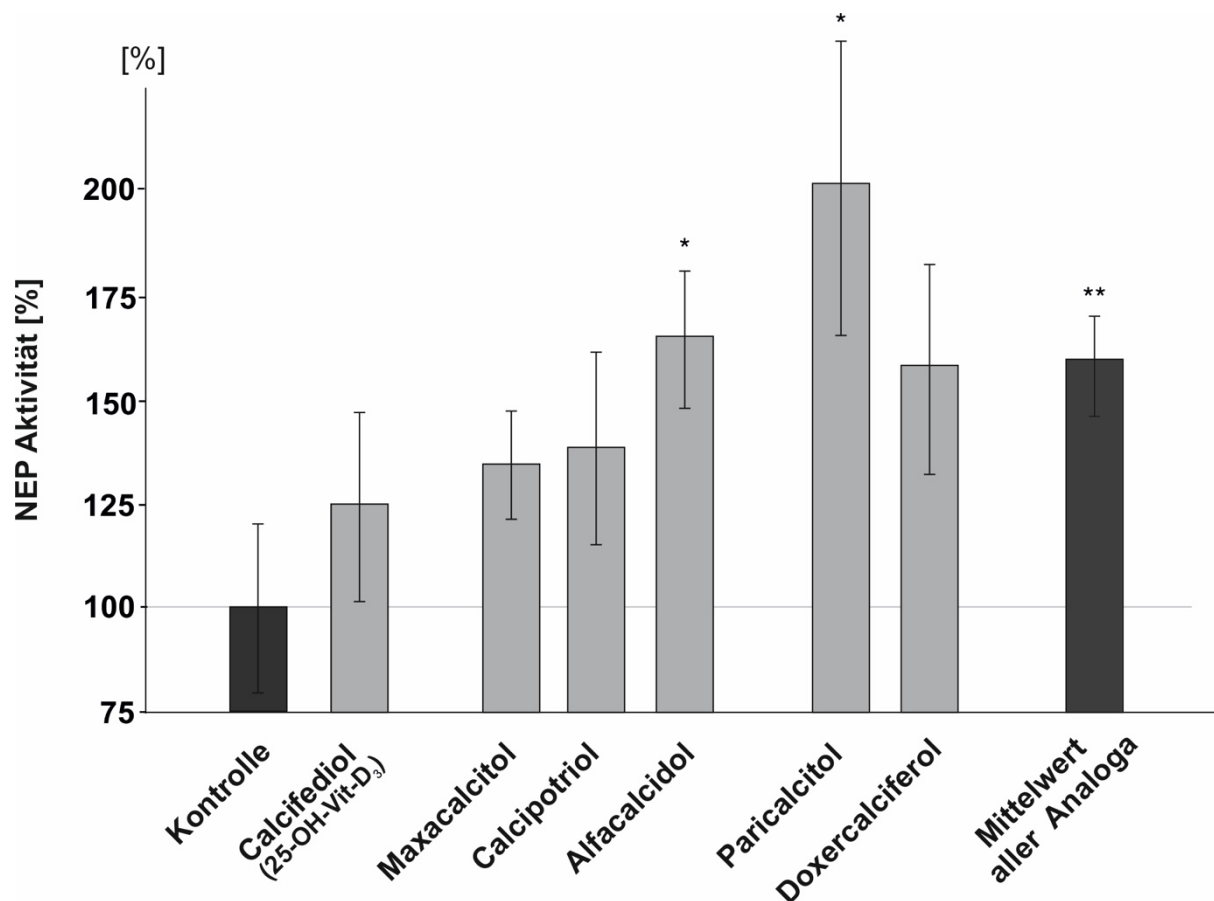


Abbildung 16 Nephilysin-Aktivität in SH-SY5Y WT Zellen nach Inkubation der Vitamin D Analoga

SH-SY5Y WT Zellen wurden 24 h mit 100 nM Calcifediol, Maxacalcitol, Calcipotriol, Alfacalcidol, Paricalcitol oder Doxercalciferol behandelt und im Anschluss fluorometrisch die NEP Aktivität bestimmt. Die Fehlerbalken geben die mittlere Standardabweichung an, die durch Sterne dargestellten Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaarten Student's t-test ermittelt (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ) ( $n = 8$ ) (Abb. modifiziert nach Thiel et al.2017).

#### 4.6 Einfluss der Vitamin D Analoga auf inflammatorische Prozesse

Da bei der Alzheimer-Demenz auch inflammatorische Prozesse eine wichtige Rolle spielen, wurde im Folgenden untersucht, ob eine Behandlung mit Vitamin D Analoga Einfluss auf das Entzündungsgeschehen nimmt. Hierzu wurde mittels ELISA das IL-1 $\beta$ -Level in SH-SY5Y WT Zellen nach Inkubation mit 100 nM Vitamin D Analoga gemessen.

Nach Behandlung der Zellen mit Calcifediol wurde verglichen zur Lösungsmittelkontrolle eine tendenzielle Reduktion des IL-1 $\beta$ -Gehalts beobachtet, das Ergebnis erreichte kein statistisch signifikantes Niveau (Calcifediol:  $84,74 \pm 8,49$  %,  $p = 0,167$ ).

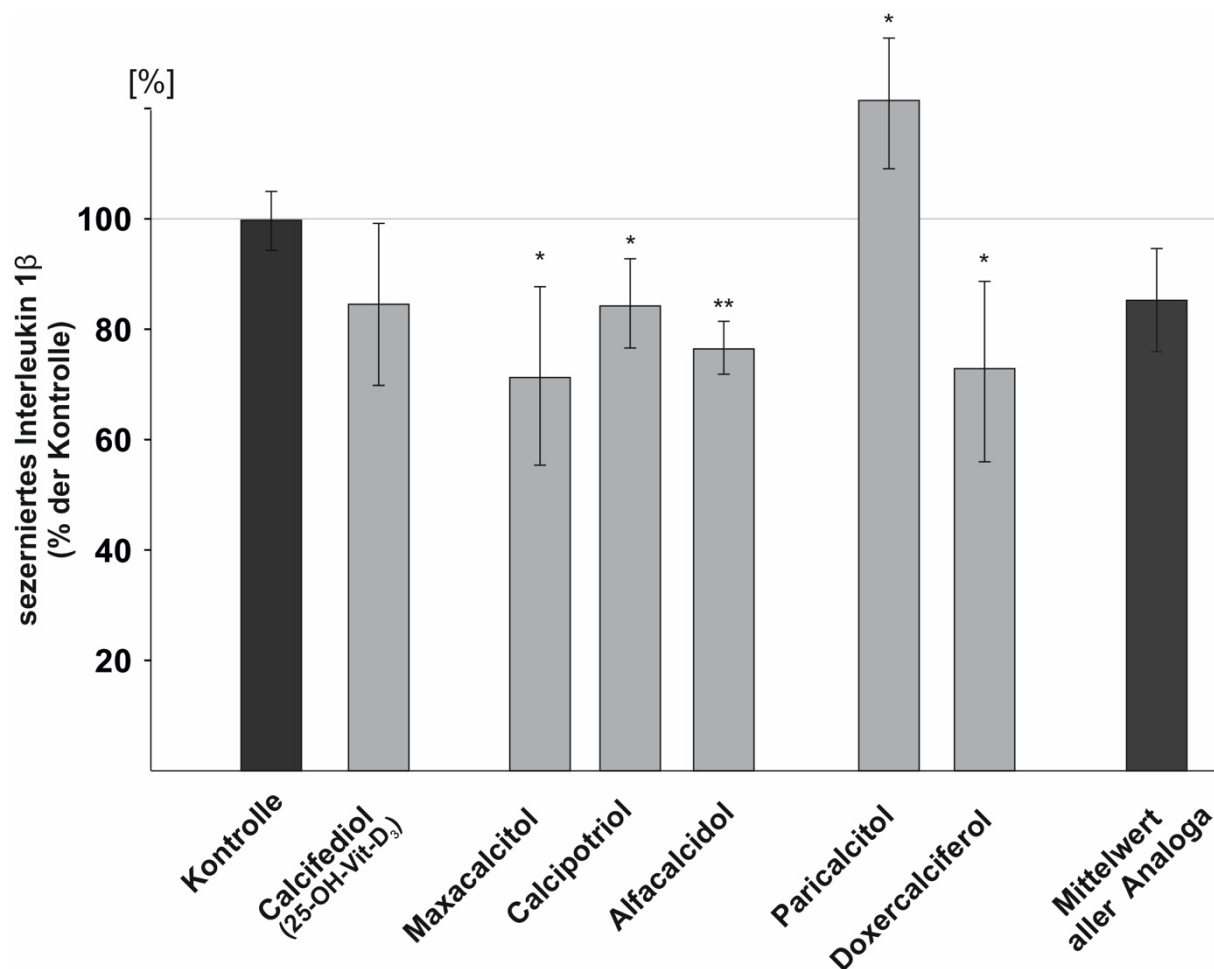


Abbildung 17 IL-1 $\beta$ -Level in SH-SY5Y WT Zellen nach Inkubation mit 100 nM Vitamin D Analoga

Mittels ELISA wurde in für 24 h mit 100 nM Calcifediol, Maxacalcitol, Calcipotriol, Alfacalcidol, Paricalcitol oder Doxercalciferol inkubierten SH-SY5Y WT Zellen der IL-1 $\beta$ -Spiegel gemessen. Dargestellt sind die relativen Messwerte verglichen mit der Behandlung mit der Lösungsmittelkontrolle. Die Fehlerbalken geben die mittlere Standardabweichung an, die durch Sterne dargestellten Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaarten Student's t-test ermittelt (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ) ( $n = 3$ ) (Abb. modifiziert nach Thiel et al.2017).

Wie in Abbildung 17 verdeutlicht, zeigte die Inkubation der Zellen mit den Vitamin D<sub>3</sub> Analoga Maxacalcitol, Calcipotriol und Alfacalcidol eine signifikante Senkung des IL-1 $\beta$ -

Levels um 15,6 % bis 23,4 % verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle (Maxacalcitol:  $71,4 \pm 9,3$  %,  $p = 0,044$ ; Calcipotriol:  $84,4 \pm 4,6$  %,  $p = 0,050$ ; Alfacalcidol:  $76,6 \pm 2,7$  %,  $p = 0,005$ ). Nach der Zugabe des Vitamin D<sub>2</sub> Analogons Doxercalciferol zum Zellmedium verblieb zwar tendenziell weniger IL-1 $\beta$  in den vermessenen Zellen, das Ergebnis erreichte hier kein statistisch signifikantes Niveau (Doxercalciferol:  $73,05 \pm 9,46$  %,  $p = 0,054$ ). Das Vitamin D<sub>2</sub> Analogon Paricalcitol erzeugte eine Steigerung des IL-1 $\beta$ -Levels (Paricalcitol:  $121,7 \pm 6,8$  %,  $p = 0,044$ ).

## 4.7 Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse

Zur Übersicht erfolgt eine tabellarische Zusammenstellung der Ergebnisse.

**Tabelle 18 Zusammenfassung der Ergebnisse**

Die Tabelle gibt einen Überblick über die Ergebnisse aller durchgeführten Versuche. Die Ergebnisse sind prozentual zur Lösungsmittelkontrolle dargestellt, welche auf 100 % normiert wurde. Die Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaarten Student's t-test ermittelt und symbolisch als Stern dargestellt (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; „n.s.“ = nicht signifikant).

Versuch	Calcifediol	Maxacalcitol	Calcipotriol	Alfacalcidol	Paricalcitol	Doxercalciferol	Mittelwert der Analoga	
4.1	Zellviabilität [%] in SH-SY5Y WT Zellen	99,55 (n.s.)	98,82 (n.s.)	99,17 (n.s.)	99,56 (n.s.)	99,73 (n.s.)	97,48 (n.s.)	98,95 (n.s.)
4.2	A $\beta$ -Gesamtlevel [%] in SH-SY5Y APP Zellen	<b>55,07</b> (***)	<b>78,22</b> (*)	<b>68,15</b> (*)	<b>60,33</b> (**)	<b>56,26</b> (**)	<b>70,96</b> (*)	<b>66,78</b> (***)
4.3.1	$\beta$ -Sekretase Aktivität [%] in SH-SY5Y WT Zellen	<b>74,41</b> (**)	<b>69,20</b> (**)	88,81 (n.s.)	<b>67,54</b> (**)	<b>61,95</b> (**)	<b>77,30</b> (**)	<b>72,96</b> (***)
4.3.2	$\beta$ -Sekretase Aktivität [%] in isolierten Membranen	95,76 (n.s.)	<b>91,77</b> (*)	<b>94,75</b> (*)	<b>94,12</b> (*)	<b>93,20</b> (*)	<b>90,71</b> (***)	<b>92,57</b> (**)
4.3.3	sAPP $\beta$ -Proteinlevel [%] in SH-SY5Y WT Zellen	<b>76,91</b> (**)						
4.3.4	$\beta$ -Sekretase Aktivität [%] in murinen WT Hirnen	<b>94,19</b> (*)	<b>95,63</b> (*)	99,54 (n.s.)	<b>96,13</b> (*)	97,76 (n.s.)	101,48 (n.s.)	98,11 (n.s.)
4.3.5	$\beta$ -Sekretase Aktivität [%] in Vitamin D -/- Hirnen	<b>104,91</b> (*)	107,35 (n.s.)	108,47 (n.s.)	105,87 (n.s.)	106,63 (n.s.)	<b>103,51</b> (*)	106,36 (n.s.)



4.3.6	<i>BACE1</i> -Expression [%] in SH-SY5Y WT Zellen	<b>80,95</b> (**)	83,45 (n.s.)	<b>75,48</b> (*)	<b>70,35</b> (**)	97,58 (n.s.)	83,65 (n.s.)	<b>82,10</b> (**)
4.3.7	BACE1-Proteinlevel [%] in SH-SY5Y WT Zellen	<b>54,11</b> (**)	<b>71,37</b> (*)	<b>68,96</b> (**)	77,66 (n.s.)	<b>63,18</b> (**)	<b>74,32</b> (*)	<b>71,10</b> (*)
4.3.8	$\gamma$ -Sekretase Aktivität [%] in SH-SY5Y WT Zellen	<b>85,02</b> (***)	<b>91,93</b> (*)	95,46 (n.s.)	<b>76,78</b> (***)	<b>83,15</b> (**)	<b>83,42</b> (**)	<b>86,1</b> (**)
4.3.9	<i>NCSTN</i> -Expression [%] in SH-SY5Y WT Zellen	<b>83,32</b> (*)	91,27 (n.s.)	<b>83,90</b> (**)	<b>83,09</b> (*)	<b>88,49</b> (*)	<b>82,83</b> (**)	<b>85,9</b> (***)
4.4	$\alpha$ -Sekretase Aktivität [%] in SH-SY5Y WT Zellen	<b>114,45</b> (*)	101,94 (n.s.)	102,29 (n.s.)	107,58 (n.s.)	<b>113,85</b> (*)	99,58 (n.s.)	105,05 (n.s.)
4.5.1	A $\beta$ -Degradation [%] in N2a WT Zellen	<b>119,56</b> (*)	<b>164,50</b> (*)	<b>202,08</b> (**)	<b>123,53</b> (*)	<b>168,66</b> (**)	<b>158,20</b> (**)	<b>156,09</b> (***)
4.5.2	A $\beta$ -Degradation [%] in Vitamin D -/- Hirnen	103,84 (n.s.)	<b>128,31</b> (***)	<b>123,79</b> (*)	<b>120,01</b> (*)	<b>112,22</b> (*)	111,78 (n.s.)	<b>119,2</b> (***)
4.5.3	<i>NEP</i> -Expression [%] in SH-SY5Y WT Zellen	102,91 (n.s.)	<b>119,05</b> (*)	101,72 (n.s.)	<b>113,75</b> (*)	<b>111,57</b> (**)	107,15 (n.s.)	110,7 (n.s.)
4.5.4	NEP Enzymaktivität [%] in SH-SY5Y WT Zellen	124,92 (n.s.)	134,51 (n.s.)	138,51 (n.s.)	<b>165,14</b> (*)	<b>201,78</b> (*)	158,16 (n.s.)	<b>159,62</b> (**)
4.6	Interleukin-1 $\beta$ -Level [%] in SH-SY5Y WT Zellen	84,74 (n.s.)	<b>71,43</b> (*)	<b>84,42</b> (*)	<b>76,62</b> (**)	<b>121,75</b> (*)	<b>73,05</b> (*)	85,45 (n.s.)

#### 4.8 Kooperationsprojekt: Expressionsanalyse Alzheimer-Demenz relevanter Gene bei bestehender Hypovitaminose D

Im folgenden Kapitel sind die Ergebnisse einer Genexpressionsanalyse dargestellt, an der ich kooperativ mitgearbeitet habe.

Die Ergebnisse wurden im *Journal of Nutritional Biochemistry* publiziert:

Grimm MOW\*, Lauer AA.\*, Grösgen S., **Thiel A.**, Lehmann J., Winkler J. Janitschke D., Herr C., Beisswenger C., Bals R., Grimm HS., Hartmann T. (2019) Profiling of Alzheimer's disease related genes in mild to moderate vitamin D hypovitaminosis

\*geteilte Erstautorenschaft

In der Studie wurde die Expression unterschiedlicher Gene, die in Zusammenhang mit der Alzheimer-Demenz stehen, auf eine Beeinflussung durch eine Hypovitaminose D untersucht. Ziel der Studie war es, die kausale Verknüpfung zwischen Vitamin D Mangel und der Alzheimer-Demenz näher zu analysieren.

Hierzu wurde im murinen Modell, wie in Kapitel 3.8.1 beschrieben, eine milde bis moderate Hypovitaminose D erzeugt und die Maushirne *post mortem*, wie in Kapitel 3.10 beschrieben, vorbereitet. In den Hirnproben der Mäuse mit Vitamin D Mangel wurde mittels RT-PCR die Expression verschiedener Gene bestimmt. Zum Vergleich diente ein Wildtyp Mausmodell. Die untersuchten Gene stehen über die APP-Homöostase, oxidativen Stress, Neuroinflammation, den Lipid- oder Energiestoffwechsel, G-Protein vermittelte Signale, Neurogenese oder Transkriptionsregulation mit der multifaktoriellen Alzheimer-Demenz in Verbindung.

Zunächst wurde in vier Wildtyp- und vier Hirnen von Mäusen mit Vitamin D Mangel die Expression von 117 Genen vermessen. Als *Housekeeping* Gen wurde *Aktin beta (Actb)* verwendet. 25 Gene zeigten unter dem Vitamin D Mangel verglichen zur Wildtypprobe eine signifikant veränderte Expression, wobei die Signifikanzgrenze auf  $p \leq 0,1$  festgelegt wurde.

Diese 25 signifikant beeinflussten Gene wurden in einer weiteren, unabhängigen Mauskoorte bestehend aus drei Wildtyp- und drei Mäusen mit Vitamin D Mangel untersucht.

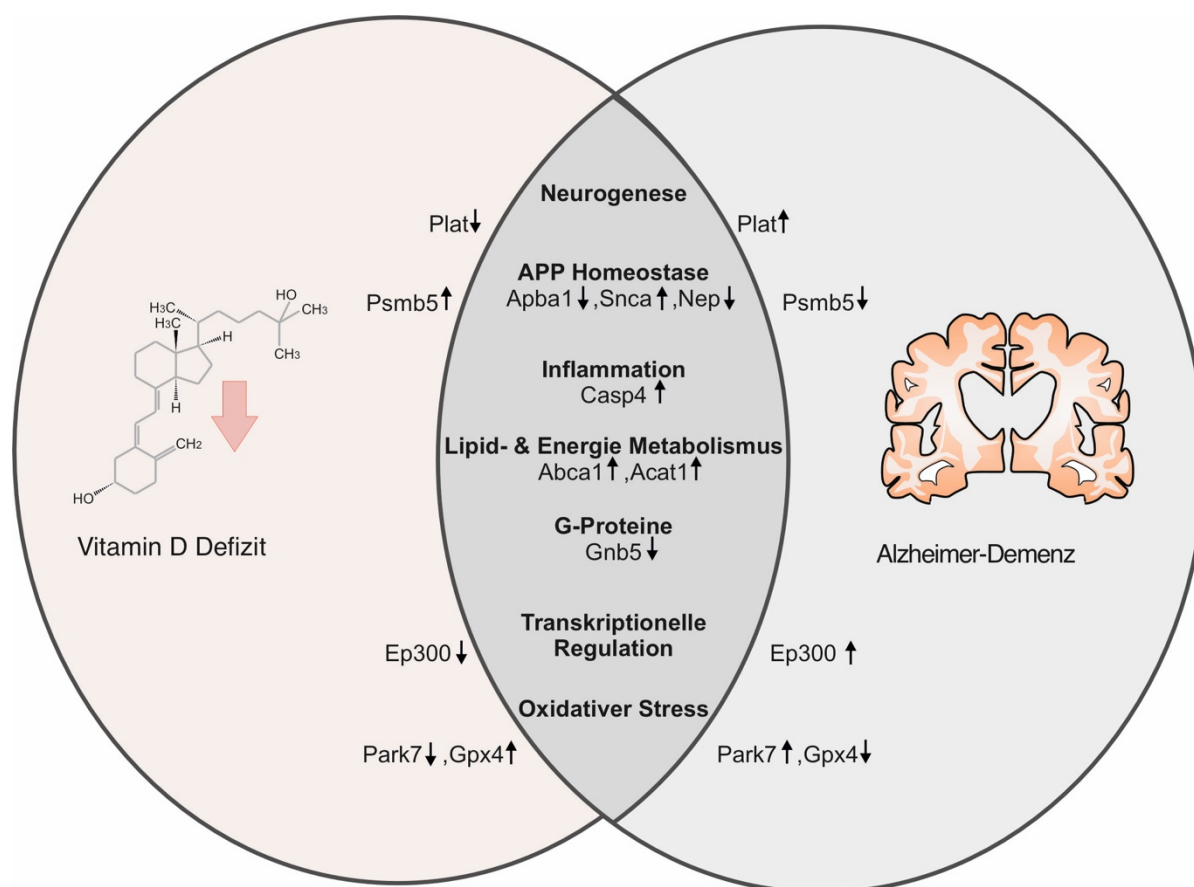


Abbildung 18 Durch Hypovitaminose D regulierte Alzheimer-Demenz relevante Gene

In der Abbildung sind unterschiedliche Gene aufgezählt, die mit der Alzheimer-Demenz in Verbindung stehen und deren Expression sich durch eine Hypovitaminose D beeinflusst zeigte (Abb. modifiziert nach Grimm et. al 2019)

Elf Genexpressionen zeigten sich sowohl in der ersten als auch in der zweiten Mauskoorte verändert. Die Expression von *Acat1*, *Psm5*, *Casp4*, *Snca* und *Abca1* stieg unter der Hypovitaminose D signifikant an, während *Nep*, *Plat*, *Ep300*, *Park7*, *Gnb5* und *Apba1* eine verringerte Expression aufwiesen. Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden die Gene, die in beiden Mauskoorten signifikant veränderte Expressionen aufwiesen, gegen weitere *Housekeeping* Gene ausgewertet. Hierzu wurden die drei *Housekeeping* Gene *Atp5b*, *Mprip* und *Polr2f* genutzt. Von den elf Genen, für die in beiden Mauskoorten signifikant veränderte Expressionen gemessen wurden, zeigten acht Gene auch in der Auswertung gegen die weiteren *Housekeeping* Gene signifikant beeinflusste Expressionen.

**Tabelle 19 Durch Vitamin D Mangel beeinflusste, Alzheimer relevante Gene**

Mittels RT-PCR wurde die Genexpressionen von *Plat*, *Gnb5*, *Psmb5*, *Casp4*, *Snca*, *Acat1*, *Nep* und *Park7* in Hirnproben von Mäusen mit Vitamin D Mangel und Wildtypmäusen bestimmt. Es wurden zwei unabhängige Mauskohorten vermessen. Die Ergebnisse wurden gegen die vier Housekeeping Gene *Actb*, *Atp5b*, *Mprp* und *Polr2f* ausgewertet. Dargestellt sind Ergebnisse der Proben der Mäuse mit Vitamin D Mangel prozentual zur Wildtypkontrolle, die auf 100 % genormt wurde, sowie die mittlere Standardabweichung. Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem, ungepaarten Student's t-test ermittelt und sind in der letzten Spalte dargestellt.

Gen	Actb [%]	Atp5b [%]	Mprp [%]	Polr2f [%]	Durchschnitt [%]	t-Test
<b>Plat</b>	<b>75,05</b> ± 8,23	<b>65,83</b> ± 6,52	<b>75,80</b> ± 9,81	<b>64,93</b> ± 5,34	<b>70,40</b> ± 2,91	0,0001
<b>Gnb5</b>	<b>78,94</b> ± 10,20	<b>74,73</b> ± 21,66	<b>86,10</b> ± 25,17	<b>69,86</b> ± 15,03	<b>77,44</b> ± 3,44	0,0006
<b>Psmb5</b>	<b>164,04</b> ± 24,53	<b>155,92</b> ± 30,05	<b>166,48</b> ± 33,06	<b>209,14</b> ± 80,91	<b>173,90</b> ± 11,96	0,0008
<b>Casp4</b>	<b>154,69</b> ± 24,24	<b>188,86</b> ± 49,24	<b>231,84</b> ± 88,30	<b>203,69</b> ± 39,23	<b>194,77</b> ± 16,06	0,0011
<b>Snca</b>	<b>274,22</b> ± 63,29	<b>139,15</b> ± 22,89	<b>157,74</b> ± 39,70	<b>188,99</b> ± 65,07	<b>160,19</b> ± 10,43	0,0012
<b>Acat1</b>	<b>274,22</b> ± 63,29	<b>173,44</b> ± 67,33	<b>226,12</b> ± 116,62	<b>182,46</b> ± 56,49	<b>214,06</b> ± 23,12	0,0026
<b>Nep</b>	<b>77,91</b> ± 6,80	<b>76,19</b> ± 7,41	<b>84,79</b> ± 15,14	<b>96,03</b> ± 23,06	<b>83,73</b> ± 4,50	0,0112
<b>Park7</b>	<b>80,66</b> ± 9,34	<b>81,14</b> ± 13,59	<b>95,51</b> ± 26,04	<b>95,10</b> ± 15,76	<b>88,10</b> ± 4,16	0,0288

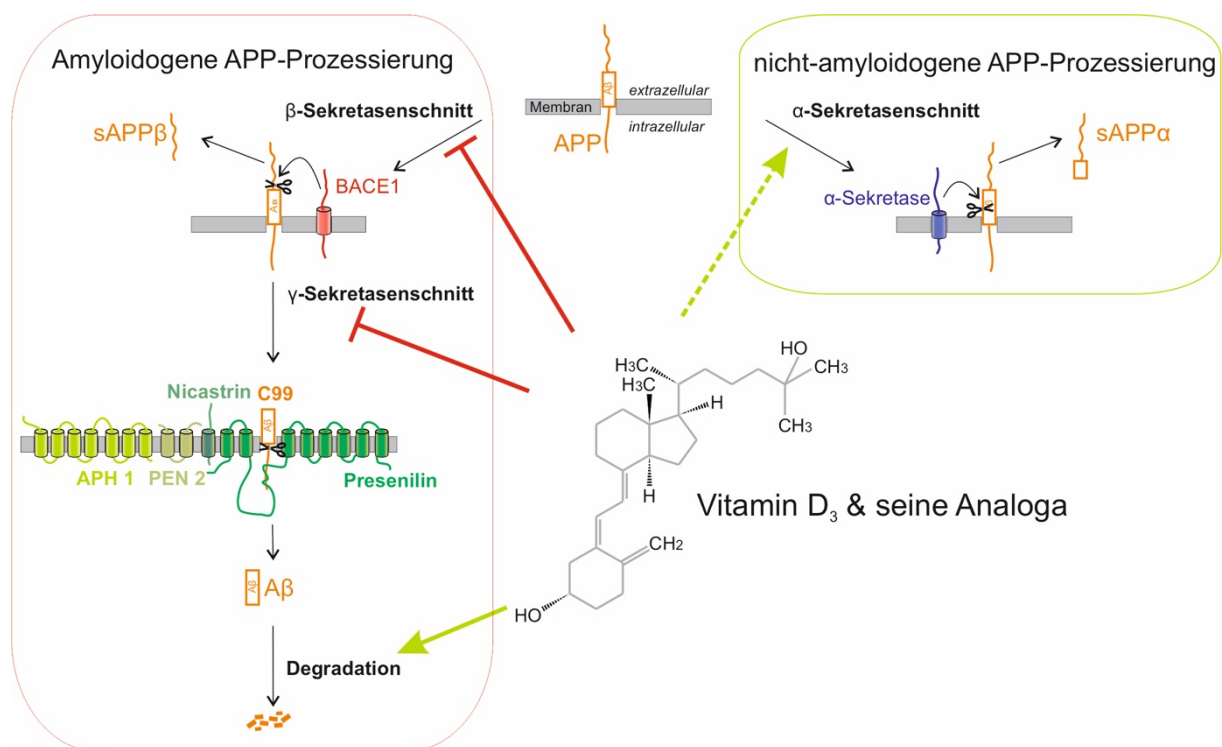
Insgesamt wurde in den murinen Hirnproben durch den Vitamin D Mangel ein signifikanter Einfluss auf die Expression von acht Genen nachgewiesen. Dieser Einfluss bestand sowohl in zwei unabhängigen Mauskohorten als auch nach Auswertung gegen insgesamt vier unterschiedliche *Housekeeping* Gene. Abbildung 18 stellt die Ergebnisse graphisch dar und Tabelle 19 zeigt die veränderten Genexpressionen, der acht Alzheimer-Demenz relevanten Gene, die sich in unserer Studie durch die Hypovitaminose D signifikant veränderten.

## 5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Effekte ausgewählter Vitamin D Analoga auf die in der Alzheimer-Demenz relevante A $\beta$ -Homöostase und Entzündungsparameter am Beispiel des IL-1 $\beta$ -Levels.

In Zellkulturen und murinen Hirnproben wurden die Effekte einer Inkubation der Vitamin D<sub>2</sub> Analoga Paricalcitol und Doxercalciferol und der Vitamin D<sub>3</sub> Analoga Maxacalcitol, Calcipotriol und Alfacalcidol auf die Genexpression, Sekretase Aktivität und die Proteinebene unterschiedlicher Enzyme analysiert, die an der A $\beta$ -Produktion und Degradation beteiligt sind. Die Analyse der molekularen Prozesse zwischen den Vitamin D Analoga und A $\beta$  trägt zum Verständnis bei, inwiefern diese Vitamin D Analoga das Potenzial zur Prävention und Therapie von Morbus Alzheimer besitzen. Dies ist von hoher klinischer Relevanz, da bisher in Deutschland keine zugelassene medikamentöse Behandlung existiert, die sich gegen die grundlegenden Mechanismen von Morbus Alzheimer, die amyloiden Ablagerungen, richtet.

Zusammenfassend verdeutlichen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die Vitamin D Analoga das A $\beta$ -Gesamtlevel beeinflussen und reduzierten. Dies konnte, wie in Abbildung 19 graphisch dargestellt, auf eine Inhibition der an der amyloidogenen APP-Prozessierung beteiligten Sekretasen und einer Steigerung der A $\beta$ -Degradation zurückgeführt werden. Zudem zeigte sich eine Steigerung der  $\alpha$ -Sekretase Aktivität, die die nicht amyloidogene Prozessierung einleitet. Darüber hinaus wurde das IL-1 $\beta$ -Level durch alle Vitamin D Analoga außer Paricalcitol signifikant gesenkt, sodass auch eine Regulation inflammatorischer Prozesse aufgezeigt wurde. Die Effektstärken der untersuchten Vitamin D Analoga unterschieden sich hierbei untereinander und in Bezug zu Calcifediol nicht signifikant. Des Weiteren wurden sowohl bei bestehender Hypovitaminose D als auch bei gesättigtem Vitamin D Status Effekte gleicher Effektstärken verzeichnet.



**Abbildung 19** Übersicht über die identifizierten Einflüsse von Vitamin D und seinen Analoga auf die APP-Prozessierung

Vitamin D und die untersuchten, synthetischen Vitamin D Analoga Maxacalcitol, Calcipotriol, Alfacalcidol, Paricalcitol und Doxercalciferol beeinflussten im Zellmodell das Aβ-Gesamtlevel durch Inhibition der an der amyloidogenen APP-Prozessierung beteiligten Sekretasen und Steigerung der Aβ-Degradation. Zudem konnte ein steigender Effekt auf die α-Sekretase beobachtet werden, die die nicht amyloidogene Prozessierung einleitet. Ein therapeutischer Nutzen von Vitamin D und seinen Analoga bei der Alzheimer Krankheit sollte daher diskutiert werden (Abb. modifiziert nach Thiel et al.2017).

In den folgenden Kapiteln 5.1, 5.2 und 5.3 werden die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse in die aktuelle Literatur und epidemiologische Studienlage eingeordnet. Da kein signifikanter Unterschied zwischen den Effektstärken der untersuchten Vitamin D Analoga bestand, könnte die Auswahl, welches Vitamin D Analogon für welchen Patienten empfohlen wird, anhand anderer Kriterien erfolgen. Kapitel 5.4 geht daher näher auf die strukturellen Unterschiede und die daraus resultierenden klinischen Vorteile der Vitamin D Analoga insbesondere bei multimorbiden, geriatrischen Patienten ein. Zuletzt soll in Kapitel 5.5 ein Ausblick gegeben werden, über welche weiteren Therapieansätze Vitamin D und seine Analoga die Alzheimer-Demenz präventiv und therapeutisch beeinflussen könnten, worin weitere Unterschiede liegen könnten und worauf sich kommende Studien daher stärker konzentrieren sollten.

## 5.1 Molekulare Wirkmechanismen der Vitamin D Analoga auf die A $\beta$ -Homöostase

### 5.1.1 Molekulare Wirkmechanismen der Vitamin D Analoga auf das Gesamt-A $\beta$

Das A $\beta$ -Protein wird in der Pathologie der Alzheimer-Demenz als Hauptkorrelat diskutiert (ASHRAFIAN et al., 2021; MC DONALD et al., 2010). Die Reduktion des A $\beta$ -Spiegels gilt als potenzieller Therapieansatz. In europäischen Zulassungsverfahren getestete Inhibitoren, die sich gegen die Sekretasen der APP-Prozessierung richten oder Antikörper, die die Aggregation von A $\beta$  verhindern oder den Abbau von A $\beta$  fördern, scheiterten jedoch aufgrund hoher Nebenwirkungsprofile (FERRIS et al., 2009; MAY, 2021; VAN DYCK et al., 2023). Vorangegangene Studien der Arbeitsgruppe der experimentellen Neurologie der Universität des Saarlandes zeigten, dass Calcifediol im murinen System das Potenzial besitzt, mit der A $\beta$ -Homöostase zu interagieren und den A $\beta$ -Spiegel signifikant zu reduzieren. Die Inkubation von 100 nM Calcifediol senkte den A $\beta$ -Spiegel in murinen Neuroblastomzellen um 13 % (GRIMM et al., 2014). Auch weitere Studien belegten in murinen *in vitro* und *in vivo* Experimenten, dass der A $\beta$ -Gehalt durch eine Vitamin D Supplementierung beeinflussbar ist (FAN et al., 2019; SAAD EL-DIN et al., 2020). Durch eine Vitamin D Überschussernährung wurde in einer APP/PS1 transgenen Mauslinie eine Halbierung der A $\beta_{40}$ - und A $\beta_{42}$ -Proteinspiegel im Hirngewebe beobachtet. Zudem reduzierte sich die Anzahl und Größe der A $\beta$ -Plaques und die kognitiven Fähigkeiten der Mäuse nahmen zu (YU et al., 2011).

In der vorliegenden Arbeit senkten Calcifediol und die untersuchten Vitamin D Analoga den A $\beta$ -Proteinspiegel im Medium von SH-SY5Y Zellen mit stabiler Expression von humanem APP<sub>695</sub>, der häufigsten in Neuronen vorkommende Isoform des APP, signifikant (siehe Kapitel 4.2). Damit wurden die A $\beta$ -reduzierenden Eigenschaften von Calcifediol in humanen Neuroblastomzellen reproduziert, sodass die Übertragbarkeit der Ergebnisse für Calcifediol in eine humane Zellreihe gezeigt wurde.

100 nM Calcifediol erzielte in humanen Neuroblastomzellen (SH-SY5Y APP<sub>695</sub>) stärkere Effekte auf den A $\beta$ -Gehalt als in murinen Neuroblastomzellen (N2a) (SH-SY5Y APP<sub>695</sub> 44,9 % / N2a 13 %). Hier ist anzumerken, dass sich neben der analysierten

Zelllinie auch die Inkubationszeit und das experimentelle Design unterschied. Während in dieser Arbeit ein Einmal-Impuls in stabil transfizierten Zellen simuliert wurde, wurden die N2a Zellen transient transfiziert und über vier Wochen mit Calcifediol behandelt (GRIMM et al., 2014). Der Stellenwert des Einnahmerhythmus von Calcifediol auf die Effektstärke bleibt unklar und muss in weiteren Studien überprüft werden. *In vivo* Experimente bestätigten die A $\beta$  senkenden Eigenschaften von Calcifediol auch in einer transgenen APP/PS1-Mauslinie. Hierbei bestanden stärkere Effekte auf das A $\beta$ -Level als in den oben beschriebenen *in vitro* Experimenten (A $\beta$ <sub>40</sub> - 48 %, A $\beta$ <sub>42</sub> - 46 %) (YU et al., 2011).

Die Effektstärken, mit denen die Vitamin D Analoga den A $\beta$ -Spiegel senkten, unterschieden sich zwischen den einzelnen Analoga oder zwischen den Analoga und Calcifediol nicht signifikant. Verglichen mit dem Phytosterin Stigmasterol, welches ebenso wie Vitamin D strukturelle Ähnlichkeit zu Cholesterin aufweist und ebenso wie die Vitamin D<sub>2</sub> Analoga eine Doppelbindung zwischen Kohlenstoffatom C<sub>22</sub> und C<sub>23</sub> trägt, weisen die Vitamin D Analoga stärkere Effekte auf. Burg *et al.* untersuchten den Einfluss von Stigmasterol auf den A $\beta$ -Gehalt im identischen Versuchsaufbau (Inkubationsschema 8 h + 16 h von 10  $\mu$ M Stigmasterol bzw. 100 nM Vitamin D/Vitamin D Analoga) und in der gleichen Zelllinie (SH-SY5Y APP<sub>695</sub>) wie in der vorliegenden Arbeit, was den Vergleich der Effektstärken ermöglicht. Die Inkubation von 10  $\mu$ M Stigmasterol reduzierte den A $\beta$ -Proteinspiegel um 38,0 %. Vitamin D und seine Analoga erzielten somit in einer 100-fach geringeren Konzentration ähnlich starke Effekte wie Stigmasterol (BURG et al., 2013). Dies deutet darauf hin, dass Vitamin D anders als Stigmasterol eine Rezeptor-vermittelte Wirkungsweise aufweisen könnte.

Die Grenzen der hier verwendeten Methode zur Bestimmung des Gesamt-A $\beta$  liegen darin, dass keine Aussage über die reduzierte A $\beta$ -Spezies oder die Anzahl an A $\beta$ -Oligomeren getroffen werden kann, da der alternative  $\beta$ -Schnitt nicht detektiert wird. Der in diesem Versuch verwendete W02 Antikörper detektiert das Gesamt-A $\beta$ . Die Bestimmung des Gesamt-A $\beta$  ist eine etablierte Methode, um Effekte auf die A $\beta$ -Homöostase abzuschätzen. Insbesondere die Reduktion des zur Aggregation neigenden A $\beta$ <sub>42</sub> würde sich positiv auf die in der Pathologie der Alzheimer-Demenz relevante A $\beta$ -Oligomerisierung auswirken, da A $\beta$ -Oligomere als Hauptverursacher der Neurotoxizität diskutiert werden (CLINE et al., 2018; MC DONALD et al., 2010). Eine Folgestudie, die auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit



Bezug nimmt, untersuchte die Einflüsse von Paricalcitol auf die A $\beta$ -Homöostase in APP-transgenen Mäusen. Unter anderem wurden die Einflüsse von Paricalcitol auf A $\beta$ -Oligomere untersucht (FAN et al., 2019). 200 ng/kg Körpergewicht (KG) Paricalcitol wurden den Mäusen über 15 Wochen jeden zweiten Tag intraperitoneal injiziert. Hierdurch reduzierte sich das Level der A $\beta$ -Oligomere signifikant um 35 %. Im Hippocampus der Mäuse, die mit Paricalcitol behandelt wurden, zeigte sich signifikant weniger lösliches und unlösliches A $\beta$ <sub>40</sub> und A $\beta$ <sub>42</sub> mit deutlich stärkeren Effekten auf die A $\beta$ <sub>42</sub>-Reduktion (FAN et al., 2019). Im Vergleich dazu bestand nach der Behandlung mit natürlich vorkommendem Vitamin D in der *in vivo* Studie von Yu et al. eine Reduktion von A $\beta$ <sub>40</sub> und A $\beta$ <sub>42</sub>, ohne dass sich das Verhältnis signifikant veränderte (YU et al., 2011). Daher könnte Paricalcitol potenter als natürlich vorkommendes Vitamin D die Aggregation von A $\beta$  reduzieren. Zu beachten ist jedoch, dass Paricalcitol intraperitoneal injiziert wurde, während in der Studie von Yu et al. mit einer Vitamin D angereicherten Ernährung gearbeitet wurde. Daher könnte auch die Applikationsform Einfluss auf die Potenz der Wirkstoffe nehmen.

Eine weitere Folgestudie testete das Vitamin D Analogon Maxacalcitol an Ratten, in denen zuvor durch die Injektion von Lipopolysacchariden (LPS) die Pathologie der Alzheimer-Demenz simuliert wurde. Den Ratten wurde über vier Wochen zweimal täglich intraperitoneal 1  $\mu$ g/kg KG Maxacalcitol appliziert. Im Anschluss wurde mittels ELISA die A $\beta$ -Konzentration im Hirngewebe bestimmt. Die A $\beta$ -Konzentration der mit LPS behandelten Ratten war signifikant höher als die der Kontrollgruppe und konnte durch die anschließende 4 wöchige Injektion von Maxacalcitol halbiert werden. Auch die kognitive Leistung der mit Maxacalcitol behandelten Ratten besserte sich signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe (SAAD EL-DIN et al., 2020).

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Einflüsse der Vitamin D Analoga auf das Gesamt-A $\beta$  konnten somit für Paricalcitol und Maxacalcitol *in vivo* reproduziert werden (FAN et al., 2019; SAAD EL-DIN et al., 2020). Neben der Reduktion des Gesamt-A $\beta$  ist davon auszugehen, dass die Vitamin D Analoga auch die Aggregation von A $\beta$  inhibieren. Für Paricalcitol konnte dies bereits *in vivo* demonstriert werden (FAN et al., 2019). Für das Vitamin D Analogon Calcipotriol wurde der Effekt auf die Aggregationsfähigkeit von A $\beta$  bisher nicht untersucht, jedoch demonstrierte eine Studie hemmende Effekte von Calcipotriol

auf das Protein  $\alpha$ -Synuclein.  $\alpha$ -Synuclein ist ebenso wie A $\beta$  ein fehlgefaltetes Protein, welches in der Pathologie von Morbus Parkinson eine wichtige Rolle spielt. Die Aggregation von  $\alpha$ -Synuclein wird unter anderem durch oxidativen Stress und ein erhöhtes intrazelluläres Kalzium gefördert. In humanen SH-SY5Y WT Neuroblastomzellen konnte mittels Immunfluoreszenz und Western-Blot-Analyse demonstriert werden, dass Calcipotriol die kalziumabhängige Aggregation von  $\alpha$ -Synuclein hemmt. Zurückgeführt wurde dies auf transkriptioneller Ebene auf eine Induktion der Expression des Kalzium-Pufferproteins *Calbindin-D28k* durch Calcipotriol (RCOM-H'CHEO-GAUTHIER et al., 2017). Dieser Effekt hat auch in Bezug auf Morbus Alzheimer eine Relevanz, da unter anderem bekannt ist, dass bei Alzheimer-Dementen die *Calbindin-D28k*-Expression erniedrigt ist (MCLACHLAN et al., 1987). Insgesamt könnte auch für die restlichen Vitamin D Analoga eine aggregationshemmende Wirkung in Bezug auf A $\beta$  bestehen.

Neben den Effekten auf die A $\beta$ -Homöostase bestanden in den zuvor beschriebenen Folgestudien von Fan *et al.* und Saad El-Din *et al.* bei den mit Paricalcitol oder Maxacalcitol behandelten Versuchstieren signifikante Verbesserungen der kognitiven Fähigkeiten im Morris-Wasserlabyrinth, einer Versuchsapparatur zur Verhaltenstestung von Nagetieren (FAN et al., 2019; SAAD EL-DIN et al., 2020). Dies unterstreicht die klinische Relevanz der im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse bezüglich der molekularen Wirkmechanismen von Vitamin D und seinen Derivaten auf die A $\beta$ -Homöostase.

### **5.1.2 Molekulare Wirkmechanismen der Vitamin D Analoga auf die $\beta$ -Sekretase**

Die  $\beta$ -Sekretase leitet die amyloidogene APP-Prozessierung ein (HAMPEL et al., 2021). Ihre Aktivität ist bei Alzheimer-Dementen erhöht (FUKUMOTO et al., 2002). Eine Studie zeigte, dass Patienten mit einer Punktmutation im APP-Gen vor dem Schnitt der  $\beta$ -Sekretase geschützt sind und gleichzeitig nicht an Morbus Alzheimer erkranken (JONSSON et al., 2012). Dies unterstützt die Hypothese, dass die Inhibition des  $\beta$ -Sekretase Schnitts protektiv gegen die Alzheimer-Demenz wirken kann. Einhergehend damit bestanden bei Mäusen mit einem *Bace1 knock-out* keine A $\beta$ -Ablagerungen und weniger Gedächtnisdefizite (JIA et al., 2019; LAIRD et al., 2005).

Aus früheren Studien ist bekannt, dass Vitamin D über unterschiedliche Mechanismen mit der  $\beta$ -Sekretase interagiert. Beispielsweise führte eine 48 h Calcitriol-Inkubation in Primärneuronen zur signifikanten Reduktion der *BACE1*-mRNS (GEZEN-AK et al., 2017). Gealterte Ratten, denen über 21 Tage subkutan Calcifediol injiziert wurde, zeigten ein um 24 % reduziertes BACE1 Proteinlevel im Vergleich zu Kontrolltieren (BRIONES, DARWISH, 2012). 2019 erschien zudem eine randomisierte, Placebo-kontrollierte Studie, welche den Einfluss einer Vitamin D Supplementierung auf relevante Biomarker bei Morbus Alzheimer untersuchte. 210 Teilnehmer mit Alzheimer-Demenz erhielten über ein Jahr täglich 800 IE Vitamin D. Nach dem Beobachtungszeitraum bestanden signifikant niedrigere BACE1-Plasma- und mRNS-Spiegel bei den Studienteilnehmern (JIA et al., 2019).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Wirkmechanismen der Vitamin D Analoga auf die  $\beta$ -Sekretase in humanen Neuroblastomzellen sowie in einem *ex vivo* Mausmodell näher untersucht.

Durch die Inkubation von Calcifediol und allen Vitamin D Analoga außer Calcipotriol reduzierte sich die  $\beta$ -Sekretase Aktivität in metabolisch aktiven SH-SY5Y WT Zellen signifikant. Die Ergebnisse konnten für Calcifediol, Maxacalcitol und Alfacalcidol *ex vivo* verifiziert werden, indem murine Hirnproben *post mortem* mit den Vitamin D Analoga inkubiert und die  $\beta$ -Sekretase Aktivität bestimmt wurde. Zur Überprüfung der Ergebnisse wurde zudem der sAPP $\beta$ -Spiegel nach Calcifediol-Inkubation gemessen. sAPP $\beta$  ist das Spaltprodukt, das nach dem  $\beta$ -Sekretase Schnitt nach extrazellulär freigegeben wird (HAMPEL et al., 2021). Die Konzentration von sAPP $\beta$  war nach Inkubation von Calcifediol in der gleichen Größenordnung reduziert wie die  $\beta$ -Sekretase Aktivität (sAPP $\beta$ : 74,41 %;  $\beta$ -Sekretase Aktivität: 76,91 %), sodass die Ergebnisse auf unabhängige Weise reproduziert werden konnten.

Neben den Hirnproben von Wildtyp-Mäusen wurden auch Hirne von Mäusen vermessen, in denen zuvor durch eine Vitamin D arme Ernährung ein Vitamin D Mangel generiert wurde. In diesen Hirnproben bestand eine signifikant höhere  $\beta$ -Sekretase Aktivität (siehe Kapitel 4.3.4.). Dies deckt sich mit Beobachtungen aus früheren Studien, die ebenfalls zeigten, dass eine Hypovitaminose D die  $\beta$ -Sekretase stimuliert. Beispielsweise wurde durch

Supprimierung der *VDR*-Expression in Primärneuronen das *BACE1*-mRNS Level signifikant erhöht (GEZEN-AK et al., 2017; GRIMM et al., 2014).

Nach Inkubation von Calcifediol und Doxercalciferol auf die Hirnproben der Vitamin D defizienten Mäusen näherte sich die  $\beta$ -Sekretase Aktivität wieder signifikant der physiologischen Aktivität an (siehe Kapitel 4.3.4). Insgesamt zeigte sich, dass nicht nur der Ausgleich eines Vitamin D Mangels, sondern auch die Supplementierung bei suffizienten Vitamin D Leveln die A $\beta$ -Pathologie günstig beeinflusst. Hieraus könnte abgeleitet werden, dass die Vitamin D Analoga unabhängig vom Vitamin D Status eingesetzt werden können. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen muss jedoch in weiteren Studien verifiziert werden.

In weiteren Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Vitamin D Analoga die  $\beta$ -Sekretase Aktivität insbesondere durch *indirekte* Einflüsse auf die Proteinstabilität und die Genexpression reduzieren, jedoch auch *direkt* mit dem  $\beta$ -Sekretase Enzym interagieren. Um die *direkten* Effekte auf das Enzym darzustellen, wurde die  $\beta$ -Sekretase Aktivität im zellfreien System in isolierten Membranen gemessen. Durchschnittlich 27,49 % der beobachteten Effekte auf die  $\beta$ -Sekretase Aktivität konnten auf *direkte* Mechanismen zurückgeführt werden, der überwiegende Anteil setzt sich aus *indirekten* Effekten zusammen (Vergleich Tabelle 14). Um diese *indirekten* Effekten näher zu untersuchen, wurde einerseits der Proteinspiegel und andererseits die Genexpression nach Inkubation der Vitamin D Analoga bestimmt. Nach Inkubation von Calcifediol sowie allen untersuchten Analoga außer Alfacalcidol reduzierte sich in der Western Blot Analyse der BACE1-Proteinspiegel signifikant auf durchschnittlich 71,1 %. Paricalcitol senkte den BACE1-Proteinspiegel in den SH-SY5Y WT Zellen um 36,8 % (siehe Kapitel 4.3.7). In der bereits erwähnten Studie von Fan *et al.*, in der Paricalcitol nach Veröffentlichung dieser Ergebnisse an Mäusen getestet wurde, konnten die Ergebnisse für Paricalcitol *in vivo* reproduziert werden. In mit Paricalcitol behandelten Mäusen war der BACE1-Proteinspiegel um 46 % niedriger als in der Kontrollgruppe (FAN et al., 2019).

*Indirekte* Effekte auf die *BACE1*-Genexpression wurden für Calcifediol, Calcipotriol und Alfacalcidol nachgewiesen. Die restlichen Vitamin D Analoga erreichten keine statistische

Signifikanz. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen konnten auch Fan *et al.* in ihrer *in vivo* Studie keine signifikanten Effekte auf die *BACE1*-mRNS sehen, was auf eine posttranskriptionelle Regulation der  $\beta$ -Sekretase durch Paricalcitol deutet (FAN et al., 2019).

Im Durchschnitt reduzierten die Vitamin D Analoga die Genexpression von *BACE1* auf 82,1 % und das Proteinlevel auf 71,1 %. Die stärkeren Effekte auf das Proteinlevel könnten sich dadurch erklären, dass das Proteinlevel, anders als die Genexpression, durch weitere Mechanismen, wie die Proteinstabilität und den Proteintransport, beeinflusst werden. Einhergehend damit zeigten Fan *et al.*, dass Paricalcitol in N2a Zellen die Halbwertszeit der  $\beta$ -Sekretase reduziert (FAN et al., 2019). Als Mechanismus wurde dabei ein erhöhter lysosomaler Abbau von *BACE1* dargestellt. Paricalcitol interagiert mit dem Protein SREBP2 (*engl. sterol regulatory element-binding protein*), einem Transkriptionsrepressor des Lipoproteinrezeptor-verwandten Proteins 1 (*engl. low density lipoprotein receptor-related protein 1*, LRP1), welches wiederum den lysosomalen Abbau von *BACE1* fördert (FAN et al., 2019). Auch natürlich vorkommendes Vitamin D korreliert mit LRP1 (PATEL, SHAH, 2017). Neben der Förderung des lysosomalen Abbaus ist auch eine Förderung des proteasomalen Abbaus von *BACE1* durch die Vitamin D Analoga denkbar. Calcitriol interagiert mit dem Ubiquitin-Proteasom-System, welches die proteasomale *BACE1*-Degradation beeinflusst (ALVAREZ-DIAZ et al., 2010; ZHANG et al., 2012b).

Wenn die  $\beta$ -Sekretase als Angriffspunkt in der Therapie der Alzheimer-Demenz genutzt wird, muss berücksichtigt werden, dass sie auch physiologische Funktionen reguliert. Eine Studie identifizierte in primären Neuronen insgesamt 34 Substrate, die durch die  $\beta$ -Sekretase prozessiert werden (KUHN et al., 2012). *BACE1* wird unter anderem mit der Regulation des axonalen Wachstums, der Synthese der Muskelspindel und Funktionen des neuronalen Netzwerks in Verbindung gebracht (ORTEGA, VENTURA, 2013). Zulassungsstudien von *BACE1*-Inhibitoren scheiterten bisher an erhöhten Nebenwirkungsraten. Eine Studie des *BACE1*-Hemmers *Verubecestat* mit 1.454 Patienten musste vorzeitig abgebrochen werden, da das getestete Medikament die kognitive Leistung im Vergleich zur Placebo-Gruppe reduzierte (EGAN et al., 2019). Auch *BACE1 knock-out* Mäuse zeigten klinische Veränderungen, wie Schizophrenie- und Depression-assoziiertes Verhalten oder eine erhöhte Anfälligkeit für epileptische Anfälle (HITT et al., 2010; HU et al., 2013; SAVONENKO et al., 2008). Eine Studie an Mäusen mit einem heterozygoten *Bace1 knock-out* verdeutlichte, dass eine partielle

Reduktion der BACE1-Enzymaktivität ausreicht, um die A $\beta$ -Pathologie zu beeinflussen (MCCONLOGUE et al., 2007). Daher ist eine partielle BACE1-Inhibition in Kombination mit anderen Mechanismen potenziell sinnvoller und besser verträglich, als eine vollständige Blockierung der  $\beta$ -Sekretase (DISLICH, LICHTENTHALER, 2012). Damit sind die Vitamin D Analoga, die neben BACE1 auch andere Angriffspunkte der A $\beta$ -Pathologie modulieren, potenziell nebenwirkungsärmer als BACE1-Inhibitoren. Sie könnten gegebenenfalls auch in Ergänzung zu BACE1-Inhibitoren appliziert werden, um deren Dosierung und Nebenwirkungen zu minimieren.

### ***5.1.3 Molekulare Wirkmechanismen der Vitamin D Analoga auf die $\gamma$ -Sekretase***

Die APP-Prozessierung verläuft als sequenzielle Proteolyse, bei der das membranständige Schnittprodukt der  $\beta$ -Sekretase,  $\beta$ -CTF, weiter durch die  $\gamma$ -Sekretase prozessiert wird. Hieraus resultiert das potenziell pathogene A $\beta$ -Peptid, welches nach extrazellulär sezerniert wird (HAMPEL et al., 2021). Wie in der Einleitung in Kapitel 2.1.2 beschrieben, kann die  $\gamma$ -Sekretase  $\beta$ -CTF mehrfach an unterschiedlichen Schnittstellen in der Transmembranregion spalten, wodurch A $\beta$ -Produkte unterschiedlicher Länge entstehen (XU, 2009). Die  $\gamma$ -Sekretase wird als Enzymkomplex aus mindestens vier Untereinheiten gebildet. Hierzu zählen entweder PS1 oder PS2, die als katalytisches Zentrum fungieren, APH1a oder APH1b, sowie als essentieller Bestandteil Nicastrin und PEN2 (HAASS, 2004; KIMBERLY et al., 2003). Funktionsverlustmutationen in den für PS1 oder PS2 codierenden Genen sind mit der frühen, familiären Form der Alzheimer-Demenz assoziiert und führen zu einer verstärkten Bildung der pathogenen A $\beta$ -Spezies A $\beta$ <sub>42</sub> (CITRON et al., 1997; KELLEHER, SHEN, 2017). In APP transgenen Mäusen konnte durch den  $\gamma$ -Sekretase Inhibitor DAPT die A $\beta$ -Produktion signifikant reduziert werden, weshalb auch die  $\gamma$ -Sekretase analog zur  $\beta$ -Sekretase als potenziell therapeutischer Angriffspunkt der Alzheimer-Demenz diskutiert wird (DOVEY et al., 2001; HUR, 2022; SERNEELS et al., 2023).

Die bisherige Literaturlage lässt keine eindeutigen Aussagen zu, inwiefern die  $\gamma$ -Sekretase durch Vitamin D reguliert wird (GEZEN-AK et al., 2017; KANG et al., 2022). Während in einer vorangegangenen Studie der Arbeitsgruppe für experimentelle Neurologie der Universität des Saarlandes ein Vitamin D Mangel in Mäusen die  $\gamma$ -Sekretase Aktivität oder

den Nicastrin-Proteinspiegel nicht signifikant veränderte, führte in einer *in vitro* Studie die Simulation eines Vitamin D Mangels durch die Reduktion der *VDR*-Expression zu signifikant erhöhten Genexpressions- und Proteinlevel von Nicastrin. Eine Supplementierung von Vitamin D führte zu einer signifikant niedrigeren Genexpression von *Nicastrin*. Nach einer 24 – 48 h Inkubation von Calcitriol auf Primärneuronen war die Expression von *Nicastrin* zeit- und dosisabhängig supprimiert. Die Expression von PS1 und PS2 unterschied sich hingegen nicht von der Kontrolle oder stieg je nach Dosis und Inkubationszeit der Calcitriol Behandlung signifikant an (GEZEN-AK et al., 2017; GRIMM et al., 2014).

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwiefern Calcifediol und die Vitamin D Analoga die  $\gamma$ -Sekretase Aktivität in SH-SY5Y WT Zellen beeinflussen und ob sich die Effekte auf eine Expressionsänderung von *Nicastrin* zurückführen lassen. Mit Ausnahme von Calcipotriol reduzierten alle Analoga und Calcifediol die  $\gamma$ -Sekretase Aktivität signifikant um 24,1 %. Passend zu diesen Ergebnissen und den oben beschriebenen Effekten von Calcitriol auf Primärneurone, reduzierten auch Calcifediol und alle untersuchten Vitamin D Analoga außer Maxacalcitol die Expression von *Nicastrin* um durchschnittlich 23,9 %. Signifikante Unterschiede zwischen Calcifediol und den Vitamin D Analoga bestanden nicht (Vergleich Kapitel 4.3.8).

Die vorliegende Arbeit konzentrierte sich auf die transkriptionelle Regulation von *Nicastrin* durch die Vitamin D Analoga. Neben der transkriptionellen Regulation wurde kürzlich ein weiterer potenzieller Mechanismus beschrieben, über den Vitamin D mit Nicastrin in Verbindung steht. So wurde der VDR auf neuronalen Membranen und auch auf der Plasmamembran von SH-SY5Y Zellen detektiert und es wurde eine Ko-Lokalisierung von VDR und *Nicastrin* und begrenzt auch von VDR und PS1 nachgewiesen. Mittels der *In-silico*-Methode FpClass wurden im Anschluss potenzielle Protein-Protein-Interaktionen zwischen dem VDR und Nicastrin bestimmt. Hier fanden sich keine Hinweise auf eine direkte Interaktion zwischen dem VDR und Nicastrin (DURSUN, GEZEN-AK, 2017). Weitere Arbeiten könnten daher überprüfen, inwiefern die Vitamin D Analoga Nicastrin neben der transkriptionellen Regulation durch weitere *indirekte* oder *direkte* Effekte beeinflussen. Dies könnte erklären, wieso Maxacalcitol die  $\gamma$ -Sekretase Aktivität reguliert, ohne die Genexpression von *Nicastrin* zu verändern und wieso Calcipotriol trotz der transkriptionellen

Regulierung von *Nicastrin* keinen Effekt auf die  $\gamma$ -Sekretase Aktivität ausübt (Vergleich Kapitel 4.3.8 und 4.3.9).

Die  $\gamma$ -Sekretase schneidet wie die  $\beta$ -Sekretase neben APP noch weitere Proteine, die teilweise wichtige physiologische Funktionen haben (HUR, 2022). Eine vollständige Inhibition der  $\gamma$ -Sekretase würde damit zwar das A $\beta$ -Level reduzieren, jedoch auch die Konzentrationen dieser wichtigen Proteine beeinflussen. Derzeit sind mehr als 90 Substrate der  $\gamma$ -Sekretase bekannt, darunter überwiegend Transmembranproteine vom Typ I, die durch die  $\gamma$ -Sekretase proteolytisch aktiviert werden (HAAPASALO, KOVACS, 2011).

Eines dieser Substrate ist Megalin, das zur LDL-Rezeptor Superfamilie gehört und unter anderem den Transport unterschiedlicher Moleküle reguliert (ZOU et al., 2004). Es ist beispielsweise an der Aufnahme von Calcifediol in die Zelle beteiligt. In Mäusen mit einer Null-Mutation von *Megalin* wurde entsprechend ein Vitamin D Mangel gemessen. Des Weiteren unterstützt Megalin den A $\beta$ -Abtransport über die Blut-Hirn-Schranke, eine Barriere zwischen zentralem Nervensystem und Blutstrom (ALVIRA-BOTERO, CARRO, 2010; NYKJAER et al., 1999).

Ein weiteres Transmembranprotein, das durch die  $\gamma$ -Sekretase proteolytisch aktiviert wird, ist Notch. Durch den Schnitt der  $\gamma$ -Sekretase wird die genregulatorisch aktive, intrazelluläre Notch-Domäne (engl. *notch intracellular domain*, NICD) freigesetzt (DE STROOPER et al., 1999). Der Notch-Signalweg greift in unterschiedliche zelluläre Prozesse ein, darunter die Zelldifferenzierung, Proliferation oder Apoptose. Notch besitzt daher unter anderem einen Stellenwert in der Embryologie, Tumorentstehung oder Hämatopoese (KONTOMANOLIS et al., 2018; VARNUM-FINNEY et al., 1998). Im Gehirn wird Notch mit der Neurogenese, dem neuritischen Wachstum sowie der synaptischen Plastizität und dem Langzeitgedächtnis in Verbindung gebracht (WOO et al., 2009; ZHANG et al., 2018a). Eine Null-Mutation von *Notch1* in Mäusen ging mit Beeinträchtigungen des räumlichen Lernens und Gedächtnisses einher (COSTA et al., 2003).

Eine vollständige Inhibition der  $\gamma$ -Sekretase beeinflusst somit neben der APP-Prozessierung unter anderem die Signalwege von Megalin und Notch. Die  $\gamma$ -Sekretase ist damit zwar ein



potenziell therapeutischer Angriffspunkt der Alzheimer-Demenz, eine komplette Inhibition führt jedoch analog zur vollständigen  $\beta$ -Sekretase Inhibition zu unerwünschten Nebenwirkungen, die insbesondere durch die fehlende Spaltung von Notch, aber auch durch die fehlende Spaltung von Megalin vermittelt sein könnten (LEWIS et al., 2003; SELKOE, 2001).

Ein Beispiel für einen  $\gamma$ -Sekretase Inhibitor, der mit einer erhöhten Rate an Notch-vermittelten Nebenwirkungen, einherging ist *Semagacestat* (DOODY et al., 2013). Zwar unterscheidet sich seine mittlere inhibitorische Konzentration für APP und Notch um mehr als das Dreifache (APP  $IC_{50}$  = 15 nM, Notch  $EC_{50}$  = 49 nM), eine Phase 3 Studie an Patienten mit Morbus Alzheimer musste jedoch früher abgebrochen werden, da die Einnahme von *Semagacestat* mit einer erhöhten Rate an unerwünschten Ereignissen, darunter Infektionen und das vermehrte Auftreten von Hautkrebs, einherging. Im Vergleich zur Placebo-Gruppe wurden zudem durch die Behandlung mit dem  $\gamma$ -Sekretase Inhibitor keine kognitiven Änderungen festgestellt (DOODY et al., 2013; HENLEY et al., 2014; IMBIMBO, GIARDINA, 2011). Dies könnte darauf zurückgeführt werden, dass neben der proteolytischen Spaltung von APP auch die proteolytische Spaltung von Notch verhindert wurde, sodass protektive Effekte durch weniger toxisches A $\beta$  durch das parallele Fehlen von NICD aufgehoben wurden. Aktuell wird daher an  $\gamma$ -Sekretase Modulatoren geforscht, die die  $\gamma$ -Sekretase beeinflussen, ohne in den Notch-Signalweg einzugreifen (FOLCH et al., 2016). Inwiefern Vitamin D und seine Analoga potenzielle  $\gamma$ -Sekretase Modulatoren sind und den Notch-Signalweg regulieren, sollte daher in weiteren Studien untersucht werden. In Glioblastom-Zelllinien oder Keratinozyten führte eine Calcitriol Inkubation zu keiner signifikanten Modulation der Expression von *Notch* oder dem Notch-Liganden Jagged (REICHRATH et al., 2010; REICHRATH, REICHRATH, 2012). Auch die hohe Verträglichkeit der Vitamin D Analoga *in vivo* spricht gegen klinisch relevante, unerwünschte Nebenwirkungen der Vitamin D Analoga, die durch die Regulation von Notch vermittelt werden. In anderen Geweben wurden hingegen Interaktionen zwischen Vitamin D Analoga und Proteinen aus dem Notch-Signalweg beschrieben. Beispielsweise regulierte Paricalcitol in renalen Epithelzellen das Protein- und mRNA-Level des Notch-Liganden Jagged (NOLAN et al., 2015; SHAN et al., 2017).

#### **5.1.4 Molekulare Wirkmechanismen der Vitamin D Analoga auf die nicht-amyloidogene APP-Prozessierung**

Die nicht-amyloidogene APP-Prozessierung wird durch den Schnitt der  $\alpha$ -Sekretase eingeleitet, die APP in seiner pathogenen Peptidsequenz schneidet und dadurch der Bildung von A $\beta$  entgegenwirkt. Die Hauptvertreter bilden ADAM10 und ADAM17 (EDWARDS et al., 2008). Patienten mit Alzheimer-Demenz weisen eine reduzierte ADAM10-Konzentration in den synaptischen Membranen des Hippocampus auf (MARCELLO et al., 2012). Umgekehrt führte eine Überexpression von *ADAM10* in APP transgenen Mäusen zur reduzierten Bildung von A $\beta$ , zu weniger A $\beta$ -Plaques und zu einer Wiederherstellung von kognitiven Fähigkeiten (POSTINA et al., 2004).

Inwiefern die  $\alpha$ -Sekretase durch Vitamin D reguliert wird, wird kontrovers diskutiert (GEZEN-AK et al., 2017; TIPPMANN et al., 2009). In Mäusen, die eine Vitamin D reiche Ernährung erhielten, stieg die zerebrale sAPP $\alpha$ -Konzentration um 30 % an (YU et al., 2011). In einer weiteren Studie wurden SH-SY5Y Zellen, die mit humanen oder murinen ADAM10-Promotor-Luciferase-Vektoren transient-transfiziert wurden, mit Calcitriol inkubiert. Im Anschluss wurden die Einflüsse auf die ADAM10-Promotoraktivität untersucht. Eine 48 h Inkubation mit 25 nM Calcitriol führte zu einer signifikanten Zunahme der ADAM10-Promotoraktivität, jedoch veränderte sich weder der ADAM10-Proteingehalt noch die Konzentration an sezerniertem sAPP $\alpha$  und sAPP $\beta$ . Die Autoren führten dies daher auf eine kurzfristige Regulation der Promotoraktivität, die zügig gegenreguliert wird, zurück (TIPPMANN et al., 2009). In einer weiteren Studie wurde die *ADAM10* mRNA Konzentration in Primärneuronen nach Inkubation mit unterschiedlichen Dosen Calcitriol bestimmt. Während 100 nM Calcitriol nach 12 h einen signifikanten Anstieg des *ADAM10* mRNA-Levels bewirkten, wurden nach 24 – 48 h keine Effekte mehr beobachtet. Eine Inkubation mit 10 nM Calcitriol führte hingegen zunächst nach 24 h zu einer signifikanten Abnahme der *ADAM10* mRNA und nach 48 h zu einem signifikanten Anstieg (GEZEN-AK et al., 2017). Zusammenfassend besteht somit eine inhomogene Literaturlage hinsichtlich der Frage, inwiefern Vitamin D die  $\alpha$ -Sekretase reguliert, die auf einen komplexen Zusammenhang hindeutet.

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob Calcifediol sowie die Vitamin D Analoga die  $\alpha$ -Sekretase Aktivität beeinflussen. Nach der Inkubation von SH-SY5Y WT Zellen mit Calcifediol und Paricalcitol konnte eine erhöhte  $\alpha$ -Sekretase Aktivität nachgewiesen werden, während die restlichen Vitamin D Analoga keine Effekte zeigten (Vergleich Kapitel 4.4).

In der bereits beschriebenen Folgestudie von Fan *et al.*, in der Auswirkungen von Paricalcitol auf die APP-Prozessierung *in vivo* untersucht wurden, veränderte Paricalcitol das ADAM10 Proteinlevel in APP/PS1 transgenen Mäusen nicht signifikant (FAN et al., 2019). Denkbar wäre, dass die Vitamin D Analoga, insbesondere Paricalcitol, überwiegend den ADAM17-Proteinspiegel regulieren, während der ADAM10-Proteinspiegel unbeeinflusst bleibt. Dies würde sich mit den Ergebnissen einer vorangegangenen Studie der Arbeitsgruppe für experimentelle Neurologie der Universität des Saarlandes decken, in der ein Vitamin D Mangel lediglich den ADAM17-Proteinspiegel erhöhte, während die ADAM10-Proteinspiegel sowie die  $\alpha$ -Sekretase Aktivität durch den Vitamin D Mangel nicht beeinflusst wurden (GRIMM et al., 2014).

Ebenso wie die  $\beta$ - und die  $\gamma$ -Sekretase besitzt die  $\alpha$ -Sekretase neben APP mehr als 40 weitere Substrate, darunter ebenfalls Notch-Liganden sowie an zerebralen Entzündungsreaktionen beteiligte Zytokine wie IL-6 oder den Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (PRUESSMEYER, LUDWIG, 2009). Eine Inhibition der  $\alpha$ -Sekretase greift somit in multiple Stoffwechselwege ein und beeinflusst nicht nur das A $\beta$ -Level. Die Beeinflussung der  $\alpha$ -Sekretase Aktivität könnte daher potenziell mit Nebenwirkungen einhergehen. Denkbar wäre, dass Patienten, bei denen keine Aktivitätsminderung der  $\alpha$ -Sekretase besteht, daher eher von einem Vitamin D Analogon profitieren, welches die  $\alpha$ -Sekretase nicht beeinflusst. Der Einsatz von Paricalcitol oder Calcifediol könnte für die Patienten vorbehalten bleiben, deren Pathologie sich in einer eingeschränkten nicht amyloidogene APP-Prozessierung begründet. Diese Hypothese und die Ableitung von Therapieempfehlungen muss jedoch in weiteren Studien überprüft werden.

### 5.1.5 Molekulare Wirkmechanismen der Vitamin D Analoga auf den A $\beta$ -Katabolismus

Der zerebrale Gesamt-A $\beta$ -Gehalt wird neben den geschilderten Effekten auf die A $\beta$ -Produktion auch durch den A $\beta$ -Abbau bestimmt. Eine Studie zeigte, dass Patienten mit Alzheimer-Demenz bis zu 30 % niedrigere A $\beta$ -Abbauraten aufweisen, während sich die A $\beta$ -Produktionsraten gegenüber der Kontrollgruppe nicht signifikant unterschieden (MAWUENYEGA et al., 2010). Die Förderung des A $\beta$ -Abbaus ist damit ein wichtiger therapeutischer Ansatzpunkt der Alzheimer-Demenz (NALIVAEVA, TURNER, 2019).

Aus früheren Studien ist bekannt, dass natürlich vorkommendes Vitamin D den A $\beta$ -Abbau steigern kann. Beispielsweise stieg die Konzentration des A $\beta$  degradierenden Enzyms NEP in Ratten an, denen über mehrere Tage natürlich vorkommendes Vitamin D injiziert wurde (BRIONES, DARWISH, 2012).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass neben Calcifediol auch die Vitamin D Analoga die Degradation von A $\beta$  in N2a-Zellen signifikant steigern (Vergleich Kapitel 4.5.1). Um die Effekte auch ausgehend von einem Vitamin D Mangel zu überprüfen, wurde *ex vivo* in Hirnen von Mäusen mit Vitamin D Mangel die A $\beta$ -Degradation nach Inkubation der Vitamin D Analoga bestimmt. Bis auf Doxercalciferol erhöhten alle Vitamin D Analoga die A $\beta$ -Degradation signifikant. Teilweise konnten die Effekte auf die A $\beta$ -Degradation für Maxacalcitol, Alfalcidol und Paricalcitol auf eine signifikante Steigerung der Genexpression von *Nep* zurückgeführt werden. Alfalcidol und Paricalcitol erhöhten zudem die NEP-Enzymaktivität signifikant (Vergleich Kapitel 4.5.4).

Aus Studien an Alzheimer-Mausmodellen ist bekannt, dass durch Steigerung der *NEP*-Expression der zerebrale A $\beta$ -Gehalt und neurodegenerative Veränderungen im Kortex signifikant minimiert werden (NALIVAEVA et al., 2020). Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass NEP neben A $\beta$  diverse weitere Peptide enzymatisch spaltet, was zu veränderten Wirkspiegeln und unerwünschten Nebenwirkungen führen könnte. Beispielsweise baut NEP neben A $\beta$  auch natriuretische Peptide ab, die durch Regulation des Wasser-Elektrolyt-Haushaltes günstige hämodynamische Effekte aufweisen (GALO et al., 2021). Die Erhöhung der Konzentration der natriuretischen Peptide ist ein Ansatzpunkt in der Therapie der

schweren Herzinsuffizienz. Seit der PARADIGM-HF Studie ist hierzu der NEP-Inhibitor *Sacubitril* zugelassen, der als Kombinationspräparat mit *Valsartan* unter dem Handelsnamen *Entresto* verfügbar ist. Langzeitstudien zur Beurteilung der kognitiven Dysfunktion im Rahmen der *Sacubitril/Valsartan*-Therapie stehen noch aus. Es ist jedoch festzuhalten, dass der therapeutische Ansatzpunkt bezüglich NEP in Hinblick auf die Therapie der Herzinsuffizienz und Morbus Alzheimer zueinander im Gegensatz stehen (GALO et al., 2021). In Bezug auf den Einsatz der Vitamin D Analoga sollte daher in Folgestudien überprüft werden, ob durch eine Steigerung der NEP-Aktivität oder -Expression eine Herzinsuffizienz befördert wird und ob Patienten, welche bereits eine Herzinsuffizienz aufweisen oder unter einer Therapie mit einem NEP-Inhibitor stehen, insbesondere von den Vitamin D Analoga profitieren, die keine signifikanten Effekte auf NEP zeigten.

Die Vitamin D Analoga, die NEP nicht signifikant beeinflussten, könnten verstärkt andere A $\beta$ -Abbauprozesse fördern. Neben der proteolytischen Spaltung kann A $\beta$  unter anderem über den Ubiquitin-Proteasom-Weg, den Autophagie-Lysosom-Weg oder den Endosom-Lysosom-Weg eliminiert werden (SEHAR et al., 2022). Darüber hinaus existieren Transportprozesse z.B. über die Blut-Hirn- oder Blut-Liquor Schranke oder über das lymphatische System, über die A $\beta$  aus dem Gehirn exportiert wird, um an anderer Stelle wie in der Niere oder der Leber abgebaut zu werden (TARASOFF-CONWAY et al., 2015). Für natürlich vorkommendes Vitamin D ist bekannt, dass es auch auf diese Eliminationsprozesse Einfluss nimmt. Beispielsweise stieg die Eliminierung von A $\beta$  über die Blut-Hirn-Schranke in Mäusen 24 h nach der Injektion von Calcitriol um das 1,3-fache an, verglichen zur Kontrollgruppe (ITO et al., 2011). Passend hierzu erhöhte eine achtwöchige Vitamin D Substitution in einer Placebo kontrollierten, klinischen Studie an Erwachsenen mit Vitamin D Mangel den A $\beta$ <sub>40</sub>-Plasmaspiegel signifikant, was auf einen geringeren A $\beta$ -Gehalt im Gehirn schließen ließ (MILLER et al., 2016). Darüber hinaus wurde durch Vitamin D die bei Alzheimer-Dementen eingeschränkte Phagozytosefähigkeit der Makrophagen verbessert, wodurch vermehrt A $\beta$  phagozytiert wurde und weniger A $\beta$  akkumulierte (MASOUMI et al., 2009; MIZWICKI et al., 2013; MIZWICKI et al., 2012).

## 5.2 Molekulare Wirkmechanismen der Vitamin D Analoga auf neuroinflammatorische Prozesse anhand des Beispiels Interleukin-1 $\beta$

Neben A $\beta$  spielen neuroinflammatorische Prozesse eine relevante Rolle in der Pathologie der Alzheimer-Demenz und stehen mit der A $\beta$ -Homöostase in engem Zusammenhang (BRADBURN et al., 2019; HENEKA et al., 2015; LENG, EDISON, 2021). Das proinflammatorische Zytokin IL-1 $\beta$ , das von Mikroglia freigesetzt wird, wenn diese durch A $\beta$  stimuliert wird, kann seinerseits zu erhöhten A $\beta$ -Spiegeln beitragen, indem es zu einer erhöhten APP-Expression führt und Schritte der APP-Prozessierung fördert (HENEKA et al., 2015). Die Konzentration von IL-1 $\beta$  ist bei Alzheimer-Dementen in Serum und Hirngewebe signifikant erhöht. Die höchsten Konzentrationen bestanden dabei in *post mortem* Hirnproben des frontalen Kortex und des Hippocampus, also den durch die Pathologie der Alzheimer-Demenz am stärksten betroffenen Hirnregionen (CACABELOS et al., 1994; COLMAN, 1986; SWARDFAGER et al., 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde für alle untersuchten Vitamin D Analoga mit Ausnahme von Paricalcitol eine signifikant senkende Wirkung auf den IL-1 $\beta$ -Gehalt in SH-SY5Y WT Zellen gezeigt (Vergleich Kapitel 4.6).

Die Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen einer Studie, die die Auswirkungen von Vitamin D<sub>2</sub> auf die entzündliche Aktivität von Mikrogliazellen untersuchte. In dieser Studie wurde in Mikrogliazellen durch A $\beta$ <sub>25-35</sub> eine Entzündungsreaktion induziert. Zellen, die mit Vitamin D<sub>2</sub> vorbehandelt wurden, setzten dabei signifikant weniger proinflammatorische Zytokine wie IL-1 $\beta$ , IL-6 oder TNF- $\alpha$  frei (RAHA et al., 2016).

Die Reduktion des IL-1 $\beta$ -Gehalts durch die Vitamin D Analoga könnte neuroprotektiv wirken, denn eine Studie zeigte, dass die Hemmung des IL-1-Rezeptors im Alzheimer-Mausmodell zu einer Milderung kognitiver Defizite und einer Reduktion bestimmter fibrillärer und oligomerer A $\beta$ -Formen führte (KITAZAWA et al., 2011). Gestützt wird diese These durch eine Studie an Ratten, die den Einfluss von Calcitriol auf den altersbedingten kognitiven Verfall untersuchte (BRIONES, DARWISH, 2012). 20 Monate alte Ratten wiesen im Vergleich zu sechs Monate alten Ratten signifikant höhere IL-1 $\beta$ -Spiegel auf und

signifikant reduzierte Spiegel des antiinflammatorischen IL-10. Zudem bestanden bei den älteren Ratten signifikante Lern- und Gedächtnisstörungen. Die Differenzen schwächten sich ab, wenn die Tiere zuvor für drei Wochen subkutan Calcitriol injiziert bekamen. Das erhöhte IL-1 $\beta$ -Level der älteren Ratten nahm nach der Behandlung signifikant ab, der IL-10-Spiegel stieg an und die Gedächtnisleistung verbesserte sich. Bei jungen Ratten beeinflusste Calcitriol die IL-1 $\beta$ - und IL-10-Level oder die Gedächtnisleistung nicht (BRIONES, DARWISH, 2012).

Insgesamt ist die Rolle von IL-1 $\beta$  in der Neuropathogenese von Morbus Alzheimer allerdings noch nicht vollständig verstanden und in der Literatur werden sowohl neurotoxische als auch neuroprotektive Eigenschaften von IL-1 $\beta$  beschrieben (MENDIOLA, CARDONA, 2018; MISHRA et al., 2012). Matousek *et. al* untersuchten beispielsweise in einem transgenen Alzheimer-Mausmodell, inwiefern die Überexpression von *IL-1 $\beta$*  das Ausmaß der A $\beta$ -Plaques und die Apoptose der Neuronen beeinflusste. Die transgen veränderten Mäuse, die *IL-1 $\beta$*  überexprimierten, wiesen in histochemischen Untersuchungen nach drei bis zwölf Monaten signifikant weniger A $\beta$ -Plaques auf als die Kontrollgruppe, die *IL-1 $\beta$*  nicht überexprimierte. Hierbei zeigten sich keine Veränderungen in der APP-Produktion oder -Prozessierung, sodass die Autoren am ehesten eine Verstärkung der A $\beta$ -Clearance-Mechanismen durch die *IL-1 $\beta$* -Überexpression vermuteten. Trotz anhaltender Neuroinflammation durch die *IL-1 $\beta$* -Überexpression bestand keine Erhöhung der Apoptose oder eine cholinerge Axondegeneration (MATOUSEK et al., 2012). Auch Cherry *et al.* sahen in einem Alzheimer-Mausmodell nach *IL-1 $\beta$* -Überexpression eine signifikante Abnahme der A $\beta$ -Plaques und führten dies auf eine Hochregulierung der Mikroglia zurück. Hierzu wurde APP/PS1-Mäusen über einen Adeno-assoziierten Virus in eine Hemisphäre des Hippocampus humane IL-1 $\beta$ -komplementäre DNS injiziert, während die andere Hemisphäre Kontrollinjektionen erhielt. Nach vier Wochen wurde die Immunreaktion ausgewertet und die Hemisphäre, in der die IL-1 $\beta$ -komplementäre DNS eingebracht wurde, wies weniger A $\beta$ -Plaques und eine höhere Anzahl an Mikroglia auf (CHERRY et al., 2015). Möglicherweise könnte ein Schwellenwert für IL-1 $\beta$  existieren, der die paradoxe Wirkungsweise erklärt. So könnte bei bestimmten IL-1 $\beta$  Konzentrationen der neurotoxische Effekt überwiegen, bei dem IL-1 $\beta$  zur vermehrten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine führt und die A $\beta$ -Pathologie hierdurch verstärkt; bei anderen IL-1 $\beta$ -Konzentrationen könnten entzündungshemmende Wirkungen überwiegen, indem

durch IL-1 $\beta$  z.B. die Mikroglia und dadurch die Phagozytose von A $\beta$  hochreguliert wird (MENDIOLA, CARDONA, 2018).

In der vorliegenden Arbeit erhöhte Paricalcitol den IL-1 $\beta$ -Gehalt in SH-SY5Y WT Zellen signifikant und verhielt sich damit gegensätzlich zu den Effekten der anderen untersuchten Vitamin D Analoga (Vergleich Kapitel 4.6). Die bereits erwähnte Studie von Fan *et al.*, die die Auswirkungen einer Paricalcitol Substitution im Alzheimer-Mausmodell untersuchte, kam hingegen zu dem Ergebnis, dass Paricalcitol den IL-1 $\beta$ -Gehalt signifikant reduziert (FAN *et al.*, 2019). Die Ergebnisse sind nur bedingt vergleichbar, da in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von Paricalcitol unter physiologischen Bedingungen betrachtet wurde, während die *in vivo* Studie Paricalcitol im Alzheimer-Mausmodell untersuchte. Weitere Studien sind daher notwendig, um die Effekte von Paricalcitol auf den IL-1 $\beta$ -Gehalt näher zu analysieren. Hierbei sollte berücksichtigt werden, dass Briones *et al.* altersabhängige Effekte für Calcitriol detektierte, was ggf. auch auf die Effekte der Vitamin D Analoga zutrifft (BRIONES, DARWISH, 2012).

Um zu überprüfen, ob die Vitamin D Analoga in Alzheimer-Demenz relevante inflammatorische Prozesse eingreifen, wurde sich in der vorliegenden Arbeit exemplarisch das IL-1 $\beta$ -Level angeschaut. Die Studie von Saad El-Din *et al.*, welche die Effekte einer Maxacalcitol-Behandlung im Rattenmodell analysierte, konnte weitere pro- und antiinflammatorische Zytokine ausfindig machen, die durch das Vitamin D Analogon beeinflusst werden (SAAD EL-DIN *et al.*, 2020). In der Studie bestanden im Serum der Ratten, in denen eine Alzheimer-Demenz simuliert wurde, im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant erhöhte TNF $\alpha$ - und reduzierte IL-10-Werte. Durch die Behandlung mit Maxacalcitol verringerten sich die TNF $\alpha$ -Serumwerte und der IL-10-Serumwert stieg signifikant an, was als Abnahme der Neuroinflammation gewertet wurde. Das IL-1 $\beta$ -Level wurde in dieser Versuchsreihe nicht mitbestimmt (SAAD EL-DIN *et al.*, 2020).

Eine weitere Studie, die nach Veröffentlichung der in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse erschien, analysierte die Applikation von Calcipotriol bzw. Calcipotriol in Kombination mit dem Antidiabetikum *Sitagliptin*, einem Dipeptidyl-Peptidase-4 Inhibitor, in einem Alzheimer-Mausmodell (KABEL *et al.*, 2019). Auch diese Studie detektierte Effekte



auf proinflammatorische Zytokine. Die Pathologie der Alzheimer-Demenz wurde in der Studie durch eine einmalige Injektion von LPS simuliert. Ein Teil der Mäuse erhielt zwei Wochen vor der LPS-Injektion täglich 20 µg/kg KG Calcipotriol über eine orale Magensonde. Ein anderer Teil erhielt 10 µg/kg KG Sitagliptin, eine weitere Gruppe erhielt sowohl Sitagliptin als auch Calcipotriol. Verglichen wurden die Ergebnisse mit einer Kontrollgruppe, die nur das Lösungsmittel erhielt. Im Anschluss wurden Verhaltenstests durchgeführt und mittels ELISA der transformierende Wachstumsfaktor-β1 (*engl. transforming growth factor*, TGF-β1), der TNFα-, und der IL-6-Spiegel bestimmt. Die LPS-Injektion führte zu einem signifikanten Anstieg der untersuchten proinflammatorischen Zytokine, der sich durch die vorherige Applikation von Calcipotriol, Sitagliptin oder deren Kombination signifikant reduzieren ließ. Auch die Erinnerungsfähigkeit der Tiere verbesserte sich in den durchgeführten Verhaltenstests signifikant. Die stärksten Effekte erzielte hierbei jeweils die Kombination beider Medikamente (KABEL et al., 2019).

Ebenso interagiert Calcitriol mit weiteren Zytokinen, beispielsweise reguliert es dosis- und zeitabhängig die Expression von IL-34 in neuronalen SH-SY5Y Zellen (ZHANG et al., 2017). IL-34 ist ein neuroprotektiv wirkendes Zytokin, das eine zentrale Rolle in der Neurodegeneration spielt (ZHANG et al., 2017).

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Vitamin D Analoga neben der Aβ-Pathologie auch Alzheimer-Demenz relevante inflammatorische Prozesse beeinflussen und damit über multiple Mechanismen in die Pathogenese von Morbus Alzheimer eingreifen.

### **5.3 Epidemiologische Studienlage bezüglich Vitamin D und Vitamin D Analoga in Bezug auf Morbus Alzheimer**

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Analyse der molekularen Prozesse zwischen den Vitamin D Analoga, der Aβ- und IL-1β-Pathologie deutete auf ein hohes präventives und therapeutisches Potenzial der Vitamin D Analoga hin. Im Folgenden soll daher die aktuelle epidemiologische Studienlage zu Morbus Alzheimer, einem Vitamin D Mangel und einer Substitution dargestellt werden.

### 5.3.1 Assoziation von Vitamin D Mangel und Morbus Alzheimer

Alzheimer-Demente wiesen in unterschiedlichen Studien, darunter mindestens drei Metaanalysen, signifikant niedrigere Vitamin D Serumspiegel auf, als die Allgemeinbevölkerung (ANNWEILER et al., 2013a; BALION et al., 2012; LOPES DA SILVA et al., 2014; ZHAO et al., 2013).

Ein manifester Vitamin D Mangel ist laut *NIH* ab einem Calcifediol Serumwert unter 30 nmol/l (12 ng/ml) definiert. Konzentrationen zwischen 30 – 50 nmol/l (12 – 20 ng/ml) gelten als unzureichend, Konzentrationen über 50 nmol/l (20 ng/ml) werden als adäquate Vitamin D Versorgung gewertet (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2022). Auch der Vitamin D Liquorspiegel war in einer Pilotstudie an Patienten mit Morbus Alzheimer signifikant geringer als bei der Kontrollgruppe (JOHANSSON et al., 2013). Zudem zeigte sich bei bestehendem Vitamin D Mangel das Risiko zur Entwicklung einer Demenz um 50 % erhöht. Das Risiko zur Entwicklung einer Alzheimer-Demenz war um bis zu 20 % erhöht (CAO et al., 2016; SHEN, JI, 2015; SOMMER et al., 2017). Tabelle 20 gibt einen Überblick über die einzelnen Studienergebnisse (CAO et al., 2016; CHAI et al., 2019; JAYEDI et al., 2019; SHEN, JI, 2015; SOMMER et al., 2017).

**Tabelle 20** Überblick über Metaanalysen, die die Assoziation zwischen Vitamin D, Alzheimer oder Demenz untersuchen

Autor	Anzahl Studien	Zielsetzung	Ergebnis
(BALION et al., 2012)	4	Vitamin D Spiegel bei AD im Vergleich zur Kontrolle	um 6,2 nmol/l (95 % KI – 10,6 bis – 1,8) reduziert
(ANNWEILER et al., 2013a)	7	Vitamin D Spiegel bei AD im Vergleich zur Kontrolle	um 1,4 SMD (95 % KI 0,26 bis 2,54) reduziert
(ZHAO et al., 2013)	6	Vitamin D Spiegel bei AD im Vergleich zur Kontrolle	um 1,39 SMD (95 % KI – 2,79 bis 0,01) reduziert
(LOPES DA SILVA et al., 2014)	5	Vitamin D Spiegel bei AD im Vergleich zur Kontrolle	tendenziell, aber nicht signifikant reduziert (p = 0,075)

(SHEN, JI, 2015)	3	Risiko zur Entwicklung einer Alzheimer-Demenz bei Hypovitaminose D (< 50 nmol/l) im Vergleich zu Vitamin D Suffizienz (> 50 nmol/l)	um 21 % erhöht (OR: 1,21, 95 % KI 1,01 – 1,40)
(CAO et al., 2016)	3	Demenzrisiko bei Hypovitaminose im Vergleich zu Vitamin D Suffizienz (nicht näher angegeben)	um 52 % erhöht (RR: 1,52, 95 % KI 1,17 – 1,98, p = 0,002)
(SOMMER et al., 2017)	5	Demenzrisiko bei Hypovitaminose (< 25 nmol/l) im Vergleich zu Vitamin D Suffizienz (> 50 nmol/l)	um 54 % erhöht (RR: 1,54, 95 % KI 1,19 – 1,99)
(CHEN et al., 2018)	10	Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen Vitamin D Spiegeln und Demenz- und Alzheimerisiko	Lineare Dosis-Wirkungs-Beziehung, die zeigte, dass pro 10 nmol/l höheren Vitamin D Spiegeln das Demenzrisiko um 5 % (RR: 0,95, 95 % KI: 0,93-0,98, p = 0,000) und das Alzheimerisiko um 7 % (RR: 0,93, 95 % KI: 0,89 – 0,97, p = 0,001) abnahm.
(JAYEDI et al., 2019)	8	Demenzrisiko bei Vitamin D Mangel (10-20 ng/ml und Vitamin D Mangel (< 10 ng/ml) im Vergleich zu Vitamin D Suffizienz  Alzheimerisiko bei Vitamin D Mangel (10-20 ng/ml und Vitamin D Mangel (< 10 ng/ml) im Vergleich zu Vitamin D Suffizienz  Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen Vitamin D Spiegeln und Alzheimerisiko	Demenz/Mangel: HR 1,09 (95% KI: 0,95-1,24) Demenz/Mangel: HR 1,33(95% KI: 1,08-1,58) AD/ Mangel HR 1,19 (95% KI:0,98-1,65) AD/ Mangel: HR 1,31 (95% KI:0,98-1,65)  Kontinuierliche Abnahme des Alzheimerrisikos bei Anstieg des Vitamin D Serumspiegels bis 35 ng/ml. Danach keine signifikante Assoziation.
(CHAI et al., 2019)	6	Demenzrisiko bei Vitamin D Mangel (< 20ng/ml) im Vergleich zu Vitamin D Suffizienz  Alzheimerisiko bei Vitamin D Mangel (< 20ng/ml) im Vergleich zu Vitamin D Suffizienz	HR 1,32 (95% KI: 1,16-1,52)  HR 1,34 (95% KI: 1,13-1,60)
(YANG et al., 2019)	6	Alzheimerisiko bei Vitamin D Mangel (25-50nmol/l) im Vergleich zu Vitamin D Suffizienz	Keine signifikante Assoziation (p = 0,07)
(KALRA et al., 2020)	5	Alzheimerisiko bei Vitamin D Mangel (<25 nmol/l) im Vergleich zu Vitamin D Mangel (25-50nmol/l) und Vitamin D Suffizienz (>50nmol/l)	1,33 (95 % KI: 1,15 – 1,54) 1,87 (95 % KI: 1,03 – 3,41)

Auch radiologisch sind Assoziationen zwischen Vitamin D Mangel und demenziellen Veränderungen nachzuweisen. So zeigen Kernspintomographien des Kopfes bei Patienten mit einem Vitamin D Mangel gehäuft bilaterale Veränderungen der weißen Gehirns substanz, die als Leukoaraiosis bezeichnet werden. Diese Leukoaraiosis deutet auf eine flächige Demyelinisierung der Neuronen hin und tritt signifikant gehäuft bei dementiellen Erkrankungen auf (ANNWEILER et al., 2015).

Darüber hinaus zeigten Metaanalysen und longitudinal angelegte Kohortenstudien eine Assoziation zwischen niedrigen Vitamin D Spiegel n und kognitiven Einbußen, welche als typisches klinisches Symptom von Morbus Alzheimer gelten (AGUILAR-NAVARRO et al., 2019; BANKS et al., 1989; CAO et al., 2016; ETGEN et al., 2012; MILLER et al., 2015; VAN DER SCHAFT et al., 2013; VAN SCHOOR et al., 2016). Hierbei reduzierte sich durch einen Vitamin D Mangel insbesondere die kognitive Verarbeitungsgeschwindigkeit und die visuell-räumliche Vorstellungskraft, während die Gedächtnisleistung weniger betroffen zu sein schien (AGUILAR-NAVARRO et al., 2019; ANNWEILER et al., 2013b; GOODWILL, SZOEKE, 2017; KUEIDER et al., 2016). In einer Querschnittstudie mit 5.598 Teilnehmern erzielten diese signifikant geringere kognitive Leistungen, wenn die wöchentliche Vitamin D Zufuhr unter 35 µg lag, verglichen zu einer Zufuhr über 35 µg pro Tag (ANNWEILER et al., 2010). Eine Metaanalyse, die insgesamt acht Studien einschloss, berichtete, dass Teilnehmer mit Calcifediol-Serumwerten unter 50 nmol/l im MMST durchschnittlich 1,2 Punkte weniger erreichten als Teilnehmer mit Calcifediol-Serumwerten über 50 nmol/l (95 % KI 0,5 – 1,9; p = 0,002). Der MMST ist ein kognitiver Test mit maximal 30 Punkten, der in der Diagnostik von Morbus Alzheimer verwendet wird (BALION et al., 2012; CREAVIN et al., 2016).

Dennoch existieren auch aktuelle Studien ohne signifikanten Zusammenhang zwischen den Vitamin D Spiegel n, der Alzheimer-Demenz und der kognitiven Funktion (CARVALHO et al., 2019; PALACIOS et al., 2020). Anzumerken ist, dass sich diese Studien zum Teil auf eine geringe Teilnehmerzahl und einen kurzen Beobachtungszeitraum berufen oder ausschließlich an Männern durchgeführt wurden, wodurch die Ergebnisse nur eingeschränkt auf die überwiegend weiblichen Betroffenen der Alzheimer-Demenz übertragbar sind.

Zu diskutieren bleibt, inwiefern eine Assoziation oder eine direkte Kausalität zwischen Vitamin D Mangel und Morbus Alzheimer besteht und inwiefern ein Vitamin D Mangel Ursache oder Konsequenz der Alzheimer-Demenz ist.

Für einen kausalen Zusammenhang zwischen Vitamin D Mangel und erhöhtem Risiko an einer Alzheimer-Demenz zu erkranken, spricht die erhöhte Demenzinzidenz unter maximalpigmentierten Menschen verglichen zu Menschen mit anderen Hauttypen (GLEASON et al., 2022). Pigmentierte Haut weist aufgrund der höheren Melaninkonzentration grundsätzlich eine geringere Vitamin D Syntheseleistung auf (AMES et al., 2021). Maximalpigmentierte Menschen leiden daher häufiger unter einem relevanten Vitamin D Mangel und gleichzeitig zeigt sich eine signifikant erhöhte Demenzinzidenz in dieser Personengruppe (MAYEDA et al., 2016). Darüber hinaus lässt sich eine geographische Verteilung der Sterbefälle Alzheimer-Dementer beobachten. Länder mit niedriger Sonneneinstrahlung und dementsprechend auch niedrigerer exogener Vitamin D Synthese weisen eine signifikant erhöhte Rate an Sterbefällen aufgrund von Morbus Alzheimer auf (CAMARA et al., 2018). Zudem konnte gezeigt werden, dass der  $A\beta_{42}$ -Liquorspiegel ebenso wie der Vitamin D Spiegel saisonalen Schwankungen unterliegt. Sonnenreiche Sommermonate waren in einer Studie mit hohen Vitamin D Spiegeln, hohen  $A\beta_{42}$ -Spiegeln, und vergrößertem Hirnvolumen assoziiert. Ein hoher  $A\beta_{42}$ -Liquorspiegel entspricht einem geringeren Risiko, an Alzheimer-Demenz zu erkranken (HOOSHMAND et al., 2014; LIM et al., 2018). Zudem bestehen genetische Assoziationen, die die These eines kausalen Zusammenhangs zwischen Vitamin D Mangel und erhöhtem Risiko an einer Alzheimer-Demenz zu erkranken stützen. So wurden in einer Studie unterschiedliche Einzelnukleotid-Polymorphismen identifiziert, die zu genetisch bedingten reduzierten Vitamin D Spiegeln führen und gleichzeitig mit einem erhöhten Risiko zur Entwicklung einer Alzheimer-Demenz assoziiert waren (KUZMA et al., 2018; MOKRY et al., 2016). Darüber hinaus bestehen unterschiedliche Polymorphismen im *VDR*-Gen, die mit einem erhöhten Risiko zur Entwicklung von Morbus Alzheimer assoziiert sind (GENG et al., 2020; GEZEN-AK et al., 2007; LEE et al., 2014; LEHMANN et al., 2011). Eine in der Arbeitsgruppe für experimentelle Neurologie der Universität des Saarlandes durchgeführte Studie zeigte, dass in Gehirnproben von Mäusen, die eine milde bis moderate Hypovitaminose D aufweisen, bereits signifikante Veränderungen in der Expression von Genen bestehen, die an der APP-Homöostase,

oxidativem Stress, Entzündungsreaktionen, dem Lipidstoffwechsel oder der Neurogenese beteiligt sind (GRIMM et al., 2019).

Neben diesen ursächlichen Einflüssen eines Vitamin D Mangels auf das Risiko der Entwicklung einer Alzheimer-Demenz könnte der Vitamin D Mangel auch Konsequenz der Alzheimer-Demenz sein, da Demente häufig eine erhöhte Pflegebedürftigkeit aufweisen. Hieraus resultieren häufig neben der Unterbringung in Heimen mit wenig Möglichkeit zur Sonnenexposition eine unausgewogene Ernährung, da beispielsweise die Nahrungsaufnahme nur mit Unterstützung funktioniert. Dies impliziert letztlich eine unzureichende exogene und endogene Vitamin D Synthese (AUTIER et al., 2017).

Berücksichtigt werden sollten auch unabhängige gemeinsame Einflussfaktoren wie das Alter. Mit zunehmendem Alter steigt das Risiko zur Entwicklung einer Alzheimer-Demenz, gleichzeitig sinkt die Vitamin D Synthese im Alter unter anderem aufgrund der reduzierten kutanen 7-DHC Konzentration signifikant. Sie beträgt beispielsweise im 70. Lebensjahr nur noch 25 % der ursprünglichen Syntheseleistung (BREIJYEH, KARAMAN, 2020; HOLICK, 2007).

Insgesamt bleibt festzuhalten, dass weitere Studien notwendig sind, um die Frage der Assoziation oder Kausalität zwischen Vitamin D Mangel und dem Risiko, an einer Alzheimer-Demenz zu erkranken abschließend zu klären. Aus der aktuellen Datenlage kann diesbezüglich kein endgültiges Fazit gezogen werden, was auch in einer Übersichtsarbeit zur Evidenz der bis 2017 erschienenen Studien deutlich wird, da die Übersichtsarbeit die Qualität der aktuellen Studienlage als gering bewertet. Die Studie kritisiert insbesondere die uneinheitlichen Messmethoden des Vitamin D Serumstatus und die unzureichende Berücksichtigung von Störfaktoren wie Jahreszeit, Ernährungszustand oder Sonnenexposition (AGHAJAFARI et al., 2018). Seit dieser Übersichtsarbeit sind jedoch mindestens vier weitere Metaanalysen erschienen, die noch nicht Bestandteil der Evidenzprüfung waren (CHEN et al., 2018; JAYEDI et al., 2019; KALRA et al., 2020; YANG et al., 2019). Auch diese Arbeiten zeigten teils kontroverse Ergebnisse. Während Yang *et al.* nach Auswertung von sechs prospektiven Kohortenstudien keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen Vitamin D Serumwerten und dem Risiko, an einer Alzheimer-Demenz zu erkranken, sahen, zeigten Jayedi *et al.* in ihrer Arbeit, die insgesamt sieben Kohortenstudien mit 28.354 Teilnehmer

einschloss, dass das Risiko, an einer Alzheimer-Demenz zu erkranken bis zu Vitamin D Serumwerten von 35 ng/ml kontinuierlich abnahm, bei höheren Vitamin D Serumwerten jedoch keine signifikante Assoziation mehr bestand (JAYEDI et al., 2019; YANG et al., 2019). Auch in diesen aktuelleren Metaanalysen wird auf Störfaktoren wie Jahreszeit, Ernährungszustand oder Messmethode nicht eingegangen. Somit sind insgesamt weitere Studien nötig, um die Evidenzlage zu erhöhen und eine eindeutige Aussage über den Zusammenhang zwischen Vitamin D Mangel und Alzheimer-Risiko treffen zu können.

Im Gegensatz zur klinischen Studienlage scheint die These, dass ein Vitamin D Mangel mit einem erhöhten Risiko der Alzheimer-Demenz einhergeht, auf molekularer Ebene wahrscheinlich. In der vorliegenden Arbeit bestanden bei Vitamin D defizienten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte  $\beta$ -Sekretase Aktivität und eine reduzierte A $\beta$ -Degradation (Vergleich Kapitel 4.3.5 und Kapitel 4.5.2). Damit wurde gezeigt, dass sich ein Vitamin D Mangel sowohl auf den A $\beta$ -Anabolismus als auch auf den A $\beta$ -Katabolismus auswirkt. In vorangegangenen Studien wurde bereits dargestellt, dass der A $\beta_{40}$  und A $\beta_{42}$ -Spiegel in Vitamin D defizienten Mäusen signifikant höher ist (GRIMM et al., 2014).

### ***5.3.2 Supplementierung von Vitamin D oder Analoga bei Morbus Alzheimer***

Eine Minderversorgung mit Vitamin D ist ein potenzieller Risikofaktor der Alzheimer-Demenz. Es stellt sich daher die Frage, inwiefern der Ausgleich des Vitamin D Mangels präventiv vor einer Alzheimer-Demenz schützt und inwiefern Vitamin D in der Therapie von Morbus Alzheimer zum Einsatz kommen kann. Im Folgenden soll die epidemiologische Studienlage zur Vitamin D Supplementierung bei Morbus Alzheimer erläutert werden.

Die DGE empfiehlt zur optimalen Bedarfsdeckung abhängig von der Jahreszeit eine tägliche Sonnenlichtbestrahlung von 5-20 min. Hierbei sollte ein Viertel der Körperoberfläche durch Mittagssonne exponiert werden. Bei Sonnenlichtbestrahlung am Vor- oder Nachmittag sollte die Bestrahlung verdoppelt werden. Bei eingeschränkter endogener Synthese, beispielsweise aufgrund einer geringeren Sonnenexposition wie es bei bettlägerigen Patienten vorkommt, wird eine Nährstoffzufuhr von 20  $\mu$ g Vitamin D (= 800 IE) empfohlen. Hierzu ist die Ergänzung von Vitamin D Präparaten notwendig, da mit der Ernährung nur durchschnittlich

2 – 4  $\mu\text{g}$  ( 80 – 160 IE) täglich aufgenommen werden (DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR ERNÄHRUNG, 2012).

In einer Placebo kontrollierten Studie an Patienten mit Vitamin D Mangel wurde durch eine zweimonatige Vitamin D Behandlung mit 50.000 IE pro Woche (entspricht 1,25 mg) eine signifikante Erhöhung des  $\text{A}\beta_{1-40}$ -Plasmaspiegels erzielt, was mit einem erniedrigten Risiko zur Entwicklung von Morbus Alzheimer einhergeht (MILLER et al., 2016). Auch bei Patienten mit bereits bestehender MCI konnte der  $\text{A}\beta_{1-40}$ -Plasmaspiegel durch eine sechsmonatige Vitamin D Supplementierung günstig beeinflusst werden. Die Studie konnte keine Effekte einer Vitamin D Supplementierung auf den  $\text{A}\beta_{1-40}$ -Plasmapiegel bei Patienten mit bereits manifester Alzheimer-Demenz verzeichnen (SANMARTIN et al., 2018). Dies könnte an der geringen Teilnehmerzahl und der nur sechsmonatigen Supplementierung liegen. Eine weitere randomisierte Studie an Alzheimer-Dementen zeigte, dass nach einjähriger Vitamin D Supplementierung von 800 IE/d die Plasmaspiegel für  $\text{A}\beta_{42}$ , APP und BACE1- sowie die APP- und BACE1-mRNS positiv beeinflusst wurden (JIA et al., 2019). Dies steht im Einklang mit den im Rahmen der vorliegenden Arbeit generierten Ergebnissen, da auch hier Einflüsse von Vitamin D auf die  $\beta$ -Sekretase detektiert wurden (Vergleich Kapitel 4.3.1 bis 4.3.7). Die zitierte Studie zeigte neben laborchemisch messbaren Effekten auch klinische Besserungen der Alzheimersymptomatik. So wurde die kognitive Fähigkeit zu Beginn, nach sechs Monaten und nach einem Jahr mittels der chinesischen Version des *Wechsler-Intelligenztestes* erhoben. Dies ist ein weltweit eingesetzter Intelligenztest mit unterschiedlichen Unterkategorien (MERZ et al., 2021). Die Teilnehmer, die Vitamin D substituierten, schnitten nach einem Jahr in den Kategorien Information, Arithmetik, Ziffernbreite, Vokabular, Blockdesign und Bilderanordnung signifikant besser ab als die Placebo-Gruppe (JIA et al., 2019). Auch in einer über fünf Jahre laufenden Longitudinalstudie an 1.231 gesunden Teilnehmern zwischen 30 und 64 Jahren führte eine Vitamin D Supplementierung zu einer langsameren Abnahmerate der verbalen Sprachkompetenz. Die Abnahme des visuellen und verbalen Gedächtnisses konnte durch Vitamin D-reiche Ernährung in unterschiedlichen Subgruppenanalysen verlangsamt werden (BEYDOUN et al., 2018). Auch der Zeitpunkt bis zum Auftreten psychotischer Symptome bei Alzheimer-Dementen verlängerte sich durch eine Vitamin D Supplementierung signifikant. Zurückgeführt wurde dies in der Studie unter anderem auf veränderte Alzheimer- und Psychose-bezogene Gene nach Vitamin D Supplementierung (WANG et al., 2019).



Insgesamt ist die Studienlage jedoch kontrovers, was daran deutlich wird, dass auch Studien existieren, die keine messbare Verbesserung der kognitiven Eigenschaften oder des Risikos, an Morbus Alzheimer zu erkranken, durch eine Vitamin D Supplementierung detektierten (BOUILLON et al., 2022b; DEAN et al., 2011; GALL, SZEKELY, 2021; GOODWILL, SZOEKE, 2017; JORDE et al., 2019; ROSSOM et al., 2012; RUTJES et al., 2018; STEIN et al., 2011). Beispielsweise erhielten in einer randomisierten, multizentrischen Studie Patienten für zwölf Monate dreimal wöchentlich intravenös das Vitamin D Analogon Maxacalcitol. Nach einem Jahr bestand keine relevante Änderung im durchgeführten Demenz-Fragebogen *Dementia Assessment Sheet for Community-based Integrated Care System*. Die Studie zielte jedoch insbesondere auf die Beeinflussung der Kalzifikation durch Maxacalcitol ab und die Studienteilnehmer waren ausschließlich Hämodialyse-pflichtige Patienten mit sekundärem Hyperparathyreoidismus. Die Teilnehmer erreichten schon zu Beginn der Studie fast vollständige Leistung in den Bereichen Kognition und Aktivität, was erklären könnte, wieso im gewählten Zeitraum keine relevante Verbesserung objektivierbar war (SHOJI et al., 2021). Gleiches gilt für eine Placebo-kontrollierte Studie an Patienten mit Morbus Parkinson, die täglich 1200 IE Vitamin D erhielten. Auch hier bestand nach einem Jahr kein signifikanter Unterschied der kognitiven Funktion, gemessen mittels MMST. In der Studie war eine Demenz vorab ein Ausschlusskriterium, sodass die Teilnehmer auch hier bereits zu Beginn hohe Ausgangswerte aufwiesen, die eine weitere Verbesserung erschwerten (SUZUKI et al., 2013). Eine Kohortenstudie sah unter einer langfristigen Vitamin D Supplementierung einen Anstieg des Demenzrisikos und der Morbidität bei Teilnehmern über 65 Jahren. Die Autoren vermuteten, dass die Effekte ggf. altersabhängig sind und eher jüngere Patienten unter 65 Jahren, bei denen noch keine Alzheimer-Pathologie besteht, von einer Vitamin D Supplementierung profitieren könnten (LAI et al., 2022).

Insgesamt deutet die Literatur darauf hin, dass von Vitamin D und seinen Analoga ein präventives und therapeutisches Potenzial in Bezug auf Morbus Alzheimer ausgeht. Die inhomogene Studienlage klinischer Studien bezüglich Vitamin D, Vitamin D Analoga und Morbus Alzheimer kann zum Teil auf methodische Ursachen, wie eine hohe Variabilität in der Dosierung, Darreichungsform und -dauer der verabreichten Vitamin D Präparate zurückgeführt werden. Weitere Studien sind notwendig, um die pleiotropen Effekte von Vitamin D und seinen Analoga evident zu erfassen. Hierbei sollte das Studiendesign

berücksichtigen, dass die von Vitamin D und seinen Analoga ausgehenden Effekte individual-, kontext-, alters- und geschlechtsabhängig sind. Dies wird in aktuellen Studien unzureichend beachtet. Auch sind einige Studien Sekundäranalysen, die ursprünglich zur Beurteilung von Vitamin D in Bezug auf skelettale Erkrankungen wie Osteoporose oder Knochenbrüche konzipiert wurden und deren Ergebnisse nun im Kontext nicht skelettaler Erkrankungen interpretiert werden. Dies kann ebenfalls zu Qualitätseinbußen führen, sodass weitere Primäranalysen notwendig sind (REJNMARK et al., 2017).

Darüber hinaus wurden in den Interventionsstudien teils Populationen mit normwertigen Vitamin D Spiegel untersucht. Insbesondere Vitamin D defiziente Patienten profitieren jedoch von einer Supplementierung (REJNMARK et al., 2017). Dies zeigte beispielsweise eine Metaanalyse mit insgesamt acht eingeschlossenen Studien und 28.354 Teilnehmern zur Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen Vitamin D Spiegel und dem Risiko, an Morbus Alzheimer zu erkranken. In der Studie bestand bis zu einem Vitamin D Serumspiegel von 35 ng/ml (87,5 nmol/l) ein linearer Zusammenhang zwischen steigenden Vitamin D Spiegel und sinkendem Risiko, eine Alzheimer-Demenz zu entwickeln. Ab Vitamin D Serumspiegeln über 35 ng/ml führte eine weitere Substitution zu keiner relevanten Reduktion des Risikos, an Morbus Alzheimer zu erkranken (JAYEDI et al., 2019). Andererseits existieren Studien, die auch bei bereits gesättigten Vitamin D Spiegel einen Profit von einer weiteren Substitution feststellten. Die Zunahme des Vitamin D Spiegels um 10 nmol/l reduziert das Risiko, eine Alzheimer-Demenz zu entwickeln, laut einer Metanalyse mit insgesamt 28.640 Teilnehmern aus 10 Kohortenstudien um 7 % bzw. das Risiko, eine Demenz im Allgemeinen zu entwickeln, um 5 % (CHEN et al., 2018).

Auch in der vorliegenden Arbeit konnten sowohl bei bestehendem Vitamin D Mangel als auch bei suffizientem Vitamin D Status Effekte durch eine Vitamin D Supplementierung auf einzelne Schritte der APP-Prozessierung gezeigt werden (Vergleich Kapitel 4.2 bis 4.5).

Die aktuelle epidemiologische Studienlage konzentriert sich auf natürlich vorkommende Vitamin D Präparate. Klinische Studien, die den Schwerpunkt auf synthetische Vitamin D Analoga legen, existieren bisher im Kontext zu Morbus Alzheimer nicht. Die Analyse der molekularen Prozesse hat gezeigt, dass die Vitamin D Analoga gleichwertig zu Calcifediol wirken und die einzelnen Schritte der APP-Prozessierung ebenso wie Calcifediol auf multiple

Weise beeinflussen. Aufgrund ihrer veränderten Wirk- und Nebenwirkungsprofile können sie Calcifediol Präparaten unter bestimmten Gegebenheiten sogar überlegen sein, was im folgenden Kapitel näher erläutert wird.

#### **5.4 Strukturelle Eigenschaften der Vitamin D Analoga**

Um die klinischen Besonderheiten der einzelnen Vitamin D Analoga nachvollziehen zu können, wird im Folgenden der strukturelle Aufbau der einzelnen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Vitamin D Analoga vorgestellt. Aus den strukturellen Modifikationen ergeben sich unterschiedliche Wirk- und Nebenwirkungsprofile, die zu unterschiedlichen klinischen Anwendungsgebieten führen. Unter anderem verändert sich die Affinität zum DBP, zum VDR und zu anabolen und katabolen Enzymen der Vitamin D Synthese, woraus unterschiedliche pharmakologische Eigenschaften resultieren. Hieraus ergebenen sich unterschiedliche therapeutische Vorteile der Analoga, die im Sinne einer personalisierten Medizin bei der Therapieauswahl Anwendung finden können und daher im Folgenden näher erläutert werden (MAESTRO et al., 2019).

Nach der Einordnung der einzelnen Vitamin D Analoga werden die Voraussetzungen zur zerebralen Wirkung der Analoga überprüft. Zuletzt wird auf die 25-Hydroxylierung von Doxercalciferol und Alfacalcidol eingegangen und die pharmakologischen Vorteile beschrieben, die sich aus der Gemeinsamkeit der  $1\alpha$ -Hydroxylierung ergeben.

Das Grundgerüst von Vitamin D und den Vitamin D Analoga besteht aus einem A-Ring, einem Seco-B-Ring, einem CD-Ring und einer Seitenkette und trägt unterschiedliche Modifikationen, wie in Abbildung 20 graphisch dargestellt.

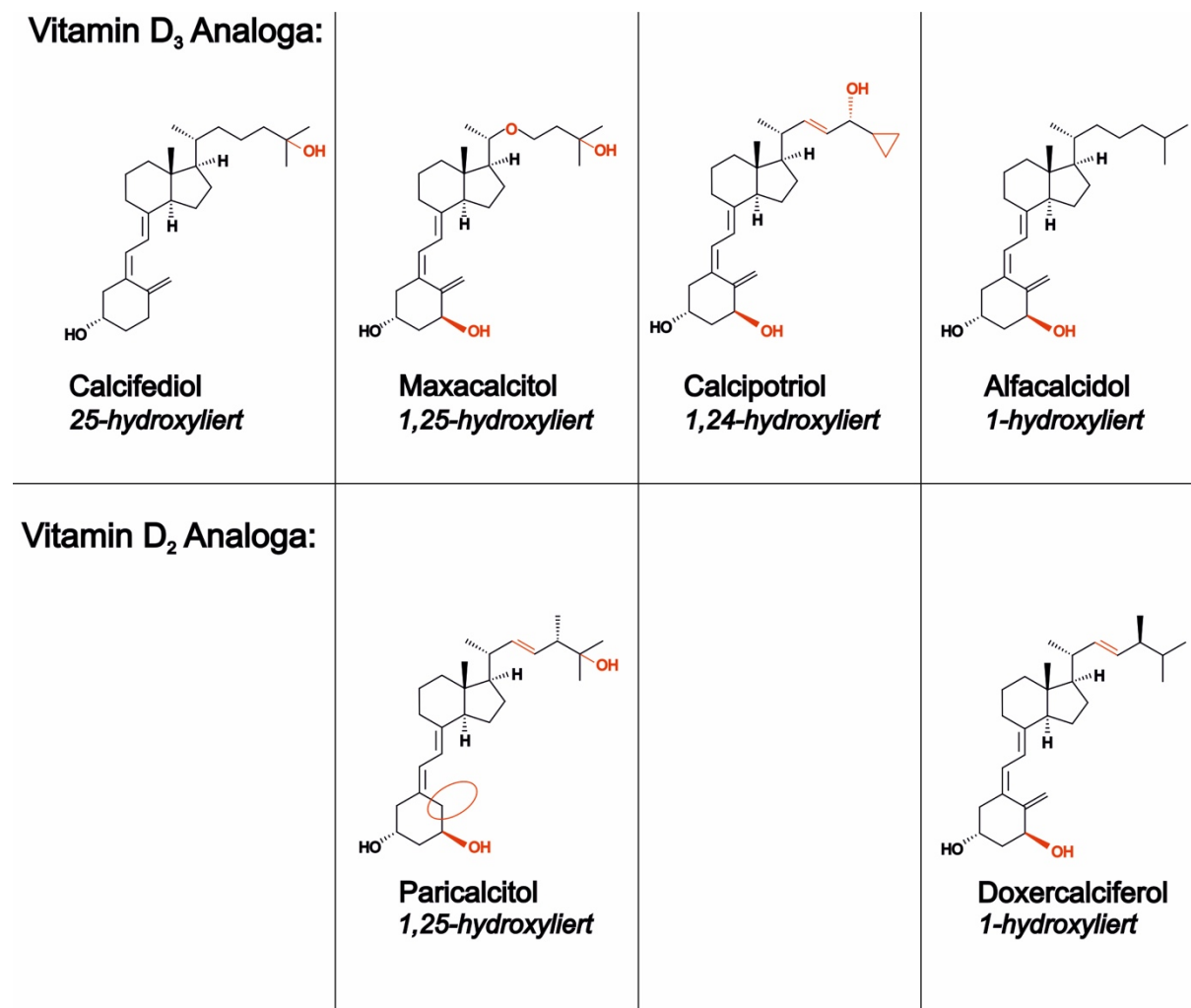


Abbildung 20 Strukturformeln der Vitamin D Analoga

Strukturformeln von Calcifediol und den untersuchten Vitamin D Analoga. Die strukturellen Modifikationen sind rot hinterlegt oder mit roten Kreisen veranschaulicht (Abb. modifiziert nach Thiel et al. 2017).

#### 5.4.1 Strukturelle Unterschiede der Vitamin D Analoga und ihre klinische Anwendung

Während sich Alfacalcidol, Maxacalcitol und Calcipotriol vom Vitamin D<sub>3</sub> (Cholecalciferol) ableiten, sind Doxercalciferol und Paricalcitol Derivate des Vitamin D<sub>2</sub> (Ergocalciferol).

##### 5.4.1.1 Maxacalcitol (22-oxa-1 $\alpha$ -25(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>)

Die Synthese von Maxacalcitol wurde erstmalig 1986 von Murayama *et al.* beschrieben (MURAYAMA et al., 1986). Das Vitamin D<sub>3</sub> Analogon Maxacalcitol wird synonym auch als 22-Oxacalcitriol bezeichnet. Ebenso wie Calcitriol ist es an C<sub>1</sub> und C<sub>25</sub> hydroxyliert, wodurch es direkt aktiv ist. Es unterscheidet sich von Calcitriol durch ein Sauerstoffatom im

Seitenkettengerüst an Position 22, wodurch die Rotation der Seitenkette eingeschränkt wird. Zudem ist die Seitenkette zwischen C<sub>22</sub> und C<sub>25</sub> im Vergleich zu Calcitriol von 5,15 Å auf 4,96 Å verkürzt. Insgesamt ist Maxacalcitol polarer als Calcitriol (ABE et al., 1987). Okano *et al.* zeigten in unterschiedlichen Tiermodellen, dass diese Modifizierungen die Proteinbindungseigenschaften von Maxacalcitol verändern. Die Bindungsaffinität von Maxacalcitol zum DBP in Plasma von Ratten betrug nur 1/600 der Affinität von Calcitriol (OKANO et al., 1989). Es gibt Hinweise, dass Maxacalcitol im Menschen nicht am DBP transportiert wird, sondern einen Komplex mit Lipoproteinen einschließlich Chylomikronen bildet (OKANO et al., 1989). Dusso *et al.* beschrieben, dass der Anteil an freiem, ungebunden Maxacalcitol entsprechend höher ist, was zu einem schnelleren extrazellulären Abbau von Maxacalcitol führt (CHRISTAKOS et al., 2016; DUSSO et al., 1991). Zusätzlich wird Maxacalcitol, anders als Calcitriol, auch durch Leberenzyme abgebaut (JONES et al., 1998).

In Japan wird Maxacalcitol in der Dermatologie zur Therapie von Psoriasis vulgaris eingesetzt. Zudem findet es dort Einsatz bei der Behandlung des sekundären Hyperparathyreoidismus (AKIZAWA et al., 2015; UMEZAWA et al., 2016).

In einer Studie an Patienten, die derzeit eine Hämodialyse erhielten, erwies sich Maxacalcitol ebenso wirksam wie eine orale Calcitriol-Therapie, wies jedoch geringere kalzämische Aktivitäten auf (TAMURA et al., 2005). Hierdurch könnte der Einsatz von Maxacalcitol besonders vorteilhaft bei Alzheimer-Dementen sein, die parallel unter anderen Erkrankungen leiden oder unter einer Behandlung mit anderen Medikamenten stehen, die mit einer Hyperkalzämie einhergehen. Hierzu zählen z.B. granulomatöse Erkrankungen wie die Sarkoidose, bei der 10 % der Betroffenen eine leichte bis schwere Hyperkalzämie und bis zu 50 % eine Hyperkalzurie aufweisen (BURKE et al., 2010).

#### 5.4.1.2 Paricalcitol (19nor-1,25-OH<sub>2</sub>-D<sub>2</sub>)

Paricalcitol gehört zu der Gruppe der 19-Nor Analoga, die im A-Ring an C<sub>19</sub> anstatt der exocyclischen Methylengruppe zwei Wasserstoffatome tragen. Zusätzlich wurde auch die Seitenkette modifiziert. Paricalcitol wirkt gewebe selektiv. Es kann den VDR im Nebenschilddrüsengewebe aktivieren, ohne Einfluss auf den intestinalen VDR zu nehmen. Hierdurch geht es im Gegensatz zu nicht-selektiven Vitamin D Analoga mit weniger Nebenwirkungen einher. Zugelassen ist Paricalcitol für den sekundären

Hyperparathyreoidismus bei chronischer Nierenerkrankungen unter Hämodialyse. Eine doppelblinde, randomisierte, multizentrische Studie an Patienten unter Hämodialyse zeigte, dass Paricalcitol das beim Hyperparathyreoidismus erhöhte Parathormon schneller und effektiver senken kann als Calcitriol. Hierbei kam es auch zu signifikant weniger Hyperkalzämie-Episoden (SPRAGUE et al., 2003). In einer Metaanalyse, die 13 Studien mit insgesamt 112.695 Patienten einschloss, wurden keine signifikanten Unterschiede in der Inzidenz unerwünschter Nebenwirkungen zwischen Paricalcitol und anderen Vitamin D Analoga wie Calcitriol, Doxercalciferol oder Alfacalcidol beobachtet. Paricalcitol verbesserte bei Patienten mit Hämodialyse jedoch, anders als die restlichen Vitamin D Analoga, signifikant das Gesamtüberleben (LIU et al., 2019).

In Tierexperimenten wurde gezeigt, dass Paricalcitol die Blut-Hirnschranke passieren kann. In Ratten wurden durch das Konvulsivum Pentylenetetrazol Krämpfe ausgelöst. Bei Ratten, die 45 min zuvor Paricalcitol injiziert bekamen, verzögerte sich unter anderem die Zeit bis zur ersten Myoklonie und der prozentuale Anteil der Spikes im Elektroenzephalogramm nahm ab. Insgesamt deutet dies darauf hin, dass Paricalcitol eine antikonvulsive Wirkung hat (UYANIKGIL et al., 2016). Dies hat in Hinblick auf Morbus Alzheimer eine besondere Relevanz, da Alzheimer-Demente eine erhöhte Prävalenz für Krampfanfälle aufweisen (SHERZAI et al., 2014). Epilepsie und Morbus Alzheimer begünstigen sich gegenseitig, so dass Epilepsie eine häufige Komorbidität bei Alzheimer-Dementen ist. Einerseits erhöhen A $\beta$ - und Tau-Proteine die neuronale Erregbarkeit, was zu vermehrten Anfällen führt, und andererseits nehmen die Amyloid-Ablagerungen nach einem epileptischen Anfall zu (SHERZAI et al., 2014; UYANIKGIL et al., 2016). Paricalcitol könnte hier also einerseits über die in im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigten Mechanismen die prokonvulsive A $\beta$ -Pathologie reduzieren, andererseits durch seine antikonvulsive Wirkung Krämpfe verhindern, die zu einem erhöhten A $\beta$ -Gehalt führen würden.

#### 5.4.1.3 *Calcipotriol (1,24-OH<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>)*

Das Vitamin D<sub>3</sub> Analogon Calcipotriol ist an C<sub>1</sub> und C<sub>24</sub> hydroxyliert und die Seitenkette ist durch eine Doppelbindung und einen Cyclopropanring modifiziert. Calcipotriol inhibiert die übermäßige Proliferation von epidermalen Keratinozyten und T-Lymphozyten, wodurch es in Deutschland seit 1992 zur Behandlung der Psoriasis vulgaris Anwendung findet (LEYSSSENS et al., 2014). Neben der antiproliferativen Wirkung zeigt Calcipotriol Effekte auf die

Zelldifferenzierung und inhibiert Chemokine, die als potenzielle Auslöser für Psoriasis vulgaris gelten. Calcipotriol erhöht zudem die Expression des VDR in Keratinozyten (LEYSSSENS et al., 2014; LUNG et al., 2022; REICHRATH et al., 1997). In SH-SY5Y Zellen konnte gezeigt werden, dass Calcipotriol die Aggregation von  $\alpha$ -Synuclein reduziert, ein aggregierendes Protein, welches in der Pathologie von Morbus Parkinson eine zentrale Rolle einnimmt (RCOM-H'CHEO-GAUTHIER et al., 2017). Die reduzierte  $\alpha$ -Synuclein-Aggregation nach Inkubation der Zellen mit Calcipotriol wurde auf eine Induktion der Expression des kalziumbindenden Proteins Calbindin-D28k durch Calcipotriol zurückgeführt. Dieser Effekt hat auch in Bezug auf Morbus Alzheimer eine Relevanz, da bekannt ist, dass bei Alzheimer-Dementen die *Calbindin-D28k*-Expression erniedrigt ist (MCLACHLAN et al., 1987).

Aktuell wird Calcipotriol zur topischen Behandlung eingesetzt, eine systemische Behandlung hat sich bisher nicht etabliert (GHAFOOR et al., 2022; MURDOCH, CLISSOLD, 1992). In Tierexperimenten zeigte Calcipotriol zwar nach oraler oder intravenöser Substitution eine deutlich niedrigere kalzämische Aktivität als Calcitriol, Alfacalcidol oder die aktiven Metaboliten von Doxercalciferol, jedoch war nicht nur das Nebenwirkungsprofil erniedrigt, sondern auch die orale Bioverfügbarkeit und die Halbwertszeit (BINDERUP, 1993; KNUTSON et al., 1997). Ursächlich hierfür könnte der schnelle Abbau von Calcipotriol sein, der durch unterschiedliche Hypothesen erklärt wird. Einerseits kann die reduzierte Bindung an DBP zu einer schnelleren Degradation von Calcipotriol führen (BOUILLON et al., 1995; KISSMEYER et al., 1995), zum anderen trägt Calcipotriol eine Hydroxylierung an C<sub>24</sub>. Diese Hydroxylierung an C<sub>24</sub> entspricht dem ersten Schritt des Vitamin D Katabolismus, wodurch Calcipotriol der biliären Ausscheidungsform von Vitamin D, der Calcitronsäure, bereits einen Schritt ähnlicher ist (JONES et al., 1998). Trotz der reduzierten Bioverfügbarkeit und geringen Halbwertszeit konnte die Folgestudie von Kabel *et al.* in Ratten signifikante Effekte nach oraler Applikation von Calcipotriol verzeichnen (KABEL et al., 2019).

#### 5.4.1.4 Alfacalcidol (1-OH-D<sub>3</sub>)

Das Vitamin D<sub>3</sub> Analogon Alfacalcidol trägt im Gegensatz zu Calcifediol keine Hydroxylgruppe an C<sub>25</sub>, sondern ist an C<sub>1</sub> hydroxyliert. Nach der oralen Aufnahme ist es zunächst inaktiv und muss durch die 25-Hydroxylase aktiviert werden, wie in Kapitel 5.4.3 näher beschrieben. Die retardierte Aktivierung führt zu einem langsameren Anfluten von

Alfacalcidol im Vergleich zu Calcitriol, wodurch keine akut ansteigenden Kalziumspiegel entstehen (CIANFEROTTI et al., 2015).

Zugelassen ist Alfacalcidol derzeit in Deutschland bei renal bedingten Kalzium- und Phosphatstoffwechselstörungen, wie dem renal bedingten Hyperparathyreoidismus, Osteoporose, -malazie, -dystrophie oder Rachitis. Es kann die Rückresorption von Kalzium und Phosphat in Darm und Nieren steigern und ihren Einbau in den Knochen fördern, sodass die Knochendichte erhöht wird (CIANFEROTTI et al., 2015). Die Verträglichkeit der oralen Substitution wurde in epidemiologischen Studien bestätigt (ACHIRON et al., 2015). Die häufigste berichtete Nebenwirkung war eine Hyperkalzämie mit Symptomen wie Kopf-, Muskel- oder Knochenschmerzen, intestinalen Störungen oder Schwächegefühl. Diese waren nach Absetzen von Alfacalcidol innerhalb weniger Tage rückläufig, was mit der kurzen pharmakologischen Wirkungsdauer von 3-5 d und der Halbwertszeit von 3-4 h einhergeht (CIANFEROTTI et al., 2015).

Eine Metaanalyse, die 13 Studien einschließt, bestätigte, dass die Einnahme von Alfacalcidol signifikant das Sturz- und Frakturrisiko senken kann. In der Subgruppenanalyse führte Alfacalcidol zu einer signifikanten Reduktion von Wirbelkörperfrakturen, während die Einnahme von Calcitriol hier keinen Effekt ergab. Demnach könnte Alfacalcidol sogar potenter als Calcitriol wirken (O'DONNELL et al., 2008). Die Verhinderung von Stürzen und Frakturen spielt in der Therapie der Alzheimer-Demenz eine wichtige Rolle, da so der Zugang zu nicht-medikamentösen Bewegungstherapien erhalten bleibt. Dies wird in Kapitel 5.5.3.4 näher erläutert.

#### 5.4.1.5 Doxercalciferol (1-OH-D<sub>2</sub>)

Doxercalciferol ist ein an C<sub>1</sub> hydroxyliertes Vitamin D<sub>2</sub> Analogon, das wie Alfacalcidol in inaktiver Form aufgenommen wird und nach Aufnahme aktiviert werden muss. Die aktiven Formen von Doxercalciferol und Alfacalcidol, 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (Calcitriol) und 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>2</sub> weisen ähnliche kalzämische Wirkungen auf (KNUTSON et al., 1997). Mehrere Tierexperimente beobachteten, dass eine Substitution von Doxercalciferol einer Alfacalcidol-Gabe hinsichtlich des Nebenwirkungsprofils überlegen war. Beispielsweise zeigte eine Studie an Ratten, dass Doxercalciferol im Vergleich zu Alfacalcidol 5- bis 15-mal weniger toxisch ist (SJODEN et al., 1985). Zudem besitzt Doxercalciferol weniger kalzämische



Nebenwirkungen bei gleicher bis höherer knochenschützender Aktivität (ERBEN et al., 1997). Eine Erklärung hierfür ist, dass Doxercalciferol bei höherer Dosierung nicht nur zu 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>2</sub>, sondern auch zu 1,24-(OH)<sub>2</sub>D<sub>2</sub> aktiviert wird. 1,24-(OH)<sub>2</sub>D<sub>2</sub> zeigt andere pharmakologische Fähigkeiten als 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>2</sub>. Es interagiert ebenfalls mit dem VDR, bindet aber weniger stark an DBP (STRUGNELL et al., 1995). Knutson *et al.* beobachteten, dass 1,24-(OH)<sub>2</sub>D<sub>2</sub> den Serum- und Urin-Kalziumgehalt von Ratten weniger ausgeprägt erhöht als Calcitriol oder 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>2</sub>. Konkret erhöhte erst die 30-fache Dosis an 1,24-(OH)<sub>2</sub>D<sub>2</sub> das Serumkalzium so stark wie Calcitriol oder 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>2</sub> (KNUTSON et al., 1997). Doxercalciferol kann also in einen weniger aktiven Metaboliten umgewandelt werden. Erstmals in einer humanen Studie getestet wurde Doxercalciferol 1994 an 15 Teilnehmerinnen mit postmenopausaler Osteoporose und zeigte dort unter osteoblastisch wirksamen Dosierungen eine hohe Verträglichkeit (GALLAGHER et al., 1994).

#### **5.4.2 Voraussetzungen zur zerebralen Wirkung der Vitamin D Analoga**

Eine potenzielle Voraussetzung dafür, dass Arzneimittel eine direkte zerebrale Wirkung entfalten können, ist die Überschreitung der Blut-Hirn-Schranke, die eine Filterfunktion zwischen Blutkreislauf und zentralem Nervensystem übernimmt, und das Vorhandensein der entsprechenden Enzyme und Rezeptoren im Zielgewebe.

Für natürlich vorkommendes Calcifediol und Calcitriol wurde die Überschreitung der humanen Blut-Hirn-Schranke mit einer entsprechenden Konzentrationszunahme der Stoffe im Liquor nachgewiesen (BALABANOVA et al., 1984; PARDRIDGE et al., 1985). Es ist anzunehmen, dass auch die synthetisch hergestellten Vitamin D Analoga die Blut-Hirn-Schranke passieren können, da sie ebenso wie Vitamin D lipophile Eigenschaften mitbringen. Im Anschluss der vorliegenden Arbeit konnten Tierstudien zeigen, dass Paricalcitol, Calcipotriol und Maxacalcitol in Nagetieren zerebral wirken (DEB et al., 2020; FAN et al., 2019; KABEL et al., 2019; SAAD EL-DIN et al., 2020; UYANIKGIL et al., 2016). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Vitamin D Analoga auch in der Lage sind die humane Blut-Hirn-Schranke zu passieren. Darüber hinaus werden die zur Aktivierung und zum Katabolismus der Vitamin D Analoga notwendigen Enzyme, wie die 25-Hydroxylasen oder die 24-Hydroxylase, zerebral exprimiert (NAVEILHAN et al., 1993; SMOLDERS et al., 2013).

Für natürlich vorkommendes Vitamin D wurden genomische und nicht-genomische Wirkmechanismen im Gehirn beschrieben. Genomisch wirkt natürlich vorkommendes Calcifediol und Calcitriol über den VDR, der unter anderem in Neuronen, Gliazellen und Astrozyten nachgewiesen wurde (EYLES et al., 2005; PRUFER et al., 1999; SMOLDERS et al., 2013). Durch die Bindung an den Rezeptor kommt es zur Heterodimerisierung des VDR mit dem Retinoid X Rezeptor. Dieser wandert in den Zellkern und kann dort an das Vitamin D *response* Element in der Promotorregion unterschiedlicher Gene binden und so ihre Transkription beeinflussen (LOWE et al., 1992). Für Calcipotriol wurde ebenfalls gezeigt, dass es die Expression bestimmter Proteine in neuronalen Zellen beeinflusst (RCOM-H'CHEO-GAUTHIER et al., 2017). Basierend darauf kann auch für die restlichen Vitamin D Analoga eine genomische Wirksamkeit im Gehirn angenommen werden.

Daneben sind für Vitamin D unterschiedliche nicht-genomische, zerebrale Wirkmechanismen beschrieben (CUI et al., 2017). Beispielsweise interagiert Vitamin D mit zerebralen Kalzium-, Chlorid- und Kaliumkanälen (ZANATTA et al., 2012). Zudem wurde der VDR auf neuronalen Plasmamembranen nachgewiesen und es wurde eine Ko-Lokalisierung von VDR und APP, ADAM10 oder Nicastrin gezeigt, die für eine nicht-genomische Beeinflussung der APP-Prozessierung durch Vitamin D spricht (DURSUN, GEZEN-AK, 2017).

#### **5.4.3 25-Hydroxylierung von Doxercalciferol und Alfacalcidol**

Cholecalciferol und Ergocalciferol werden nach ihrer oralen Aufnahme durch die 25-Hydroxylase zu Calcifediol synthetisiert. Während Maxacalcitol und Paricalcitol bereits an C<sub>25</sub> hydroxyliert sind, müssen Alfacalcidol und Doxercalciferol diesen Schritt ähnlich wie Cholecalciferol und Ergocalciferol durchlaufen (CIANFEROTTI et al., 2015).

Der Syntheseschritt erfolgt überwiegend in der Leber, kann aber auch in extrahepatischen Geweben, einschließlich Knochenmark, Gehirn oder Fettgewebe stattfinden (SAPONARO et al., 2020). Zerebral konnte eine Expression der 25-Hydroxylase in neuronalen Zellen nachgewiesen werden, während Gliazellen keine 25-Hydroxylase aufweisen (JONES et al., 2014).

Es sind unterschiedliche 25-Hydroxylasen bekannt, die zur Superfamilie der Cytochrom P450 Enzyme (CYP) gehören. Unter physiologischen Bedingungen ist CYP2R1 die wichtigste 25-Hydroxylase (CIANFEROTTI et al., 2015; LAM et al., 2018). Insbesondere bei der 25-Hydroxylierung der Vitamin D Analoga Doxercalciferol und Alfacalcidol spielt auch die 25-Hydroxylase CYP27A1 eine wichtige pharmakologische Rolle. Die 25-Hydroxylasen verstoffwechseln nicht nur körpereigene Substrate, sondern sind auch an der Metabolisierung einiger Medikamente beteiligt. Hierdurch kann beispielsweise eine gleichzeitige Behandlung mit bestimmten blutdrucksenkenden, antiepileptischen oder antiretroviralen Medikamenten zu unerwünschten Interaktionen führen (CIANFEROTTI et al., 2015; LAM et al., 2018).

Neben CYP2R1 und CYP27A1 hat sich auch CYP3A4 als potenzielle 25-Hydroxylase erwiesen. CYP3A4 hydroxyliert Vitamin D<sub>2</sub> Substrate effizienter als Vitamin D<sub>3</sub> Substrate. Neben der Fähigkeit zur 25-Hydroxylierung scheint vor allem die 24-Hydroxylierung und damit der Katabolismus von Vitamin D Analoga die Hauptaufgabe von CYP3A4 zu sein (JONES et al., 2014). CYP3A4 verstoffwechselt bis zu 50 % der Arzneimittel und unterliegt daher zahlreichen Wechselwirkungen (JONES et al., 2014).

Inwieweit die gleichzeitige Einnahme dieser Arzneimittel die Spiegel und klinischen Wirkungen der Vitamin D Analoga beeinflusst bzw. inwiefern die Vitamin D Analoga die Wirksamkeit dieser Medikamente reduziert oder verstärkt, sollte in weiteren klinischen Studien überprüft werden.

Tabelle 21 gibt einen Überblick über gängige Medikamente, die mit den CYP-Enzymen interagieren.

Tabelle 21 Überblick über CYP27A und CYP3A4 Inhibitoren

<p><b>Partielle CYP27A1 Inhibitoren</b> (LAM et al., 2018)</p>	<p><b>Antihypertensiva</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Kalziumkanal-Blocker (Clevidipin, Felodipin, Nicardipin, Nilvadipin, Nimodipin)</li> <li>○ Angiotensin II Rezeptorantagonist Candesartan (<i>aber nicht Losartan, Irbesartan, Eprosartan, Telmisartan</i>)</li> </ul> <p><b>Anti-HIV Medikamente</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (<i>Delavirdin, Etravirin</i>)</li> </ul> <p><b>Medikamente in der Krebstherapie</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Abirateron, Dasatinib, Nilotinib, Regorafenib</li> </ul>
<p><b>CYP3A4 Inhibitoren</b> (ZHOU et al., 2004)</p>	<p><b>Makrolide</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Erythromycin, Clarithromycin</li> </ul> <p><b>Medikamente in der Krebstherapie</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Tamoxifen</li> </ul> <p><b>Antidepressiva</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Fluoxetin, Midazolam</li> </ul> <p><b>Antihypertensiva</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Verapamil, Dihydralazin</li> </ul> <p><b>Anti-HIV Medikamente</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Indinavir, Nelfinavir, Ritonavir</li> </ul>
<p><b>CYP3A4 Induktoren</b> (WANG et al., 2013)</p>	<p><b>Antiepileptika</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Phenobarbital, Phenytoin, Valproinsäure</li> </ul> <p><b>Antibiotika</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Rifampicin</li> </ul>

Zudem weisen leberinsuffiziente Patienten eine reduzierte Expression von CYP27A1 auf (PETTA et al., 2010; ZHU et al., 2013). Jedoch bestätigten unterschiedliche Studien, dass eine Supplementierung von Cholecalciferol-Präparaten den Vitamin D Status bei Patienten mit Leberinsuffizienz ansteigen lässt, was für eine erhaltene 25-Hydroxylierung auch bei hepatischen Funktionseinschränkungen spricht (MALHAM et al., 2012; SAVIC et al., 2018).

Insgesamt kann festgehalten werden, dass Patienten, die parallel mit einem der in Tabelle 21 aufgelisteten Medikamente behandelt werden oder unter hepatischen Einschränkungen leiden, insbesondere von bereits an C<sub>25</sub> hydroxylierten Analoga wie Maxacalcitol oder Paricalcitol profitieren könnten.

#### **5.4.4 *1 $\alpha$ -Hydroxylierung als Gemeinsamkeit der Vitamin D Analoga***

Alle in der vorliegenden Arbeit analysierten Analoga sind im Gegensatz zu Calcifediol an C<sub>1</sub> hydroxyliert. Durch die 1-Hydroxylierung verändern sich die Bindungseigenschaften der Vitamin D Analoga, was zu einer geringeren Affinität zu DBP führt (OKANO et al., 1989). Dies hat eine Reihe von Konsequenzen, die zu pharmakologischen Unterschieden zwischen den Vitamin D Analoga und Calcifediol führen. Beispielsweise wird die Geschwindigkeit der Zellaufnahme beeinflusst, da durch die geringere Affinität zum DBP bei gleicher Affinität zum intrazellulären VDR ein größerer Gradient in die Zelle entsteht. Dies führt zu einer schnelleren Aufnahme der Analoga in die Zielzelle und einem schnelleren Wirkspiegel. Darüber hinaus wird auch der Abbau der Vitamin D Analoga beeinflusst, da ungebundene Metaboliten schneller degradiert werden als gebundene (JONES et al., 1998).

Unterschiedliche Vitamin D Analoga wie z.B. Maxacalcitol nutzen aufgrund der reduzierten Affinität zum DBP alternative Transportmechanismen im Blut. Maxacalcitol wird z.B. vermehrt an Chylomikronen transportiert (OKANO et al., 1989). Hierdurch könnte Maxacalcitol bei Erkrankungen, die mit niedrigeren DBP-Konzentrationen einhergehen, potenter sein. Beispielsweise führt eine eingeschränkte Synthese, aufgrund einer Mangelernährung oder Leberinsuffizienz, oder eine vermehrte Ausscheidung im Rahmen einer Proteinurie zu niedrigeren DBP-Konzentrationen (POP et al., 2022). Bei der Ableitung von Therapieempfehlungen aus der vorliegenden Arbeit muss berücksichtigt werden, dass die Versuche auf Zellkulturebene diese alternativen Transportmechanismen nicht abbilden.

Physiologisch wird Calcifediol durch die  $1\alpha$ -Hydroxylase zu aktivem Calcitriol synthetisiert. Die  $1\alpha$ -Hydroxylase gehört zur stark regulierten Superfamilie der Cytochrom P450 Enzyme (CYP450) und wird renal hauptsächlich durch Kalzium, Parathormon und Calcitriol gesteuert und extrarenal überwiegend über Zytokine reguliert (BIKLE, 2000).

Durch den Einsatz von  $1\alpha$ -hydroxylierten Vitamin D Analoga wird die  $1\alpha$ -Hydroxylase und damit auch ein körpereigener Mechanismus zur Regulation des Vitamin D Spiegels umgangen. Daher erfordert der Einsatz  $1\alpha$ -hydroxylierter Vitamin D Analoga eine engmaschige Therapiüberwachung, da sich das Risiko einer Hypervitaminose erhöht. Diese äußert sich insbesondere durch Hyperkalzämien und Hyperkalzurien. Insgesamt zeigen Zulassungsstudien jedoch, dass die Vitamin D Analoga verträglich und nebenwirkungsarm sind und das Risiko einer Hyperkalzämie niedriger ist als bei der Substituierung von Calcitriol (ACHIRON et al., 2015; ZAND, KUMAR, 2017).

Unterschiedliche Pathomechanismen und Arzneimittelinteraktionen können die Expression und Aktivität der  $1\alpha$ -Hydroxylase beeinflussen und hierdurch die Calcitriol Synthese hemmen (ADAMS, GACAD, 1985; OMDAHL et al., 2001; OMDAHL et al., 2002; ZAHEER et al., 2016). Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass erhöhte Harnsäurespiegel, wie sie bei Gichtkrankungen auftreten, den Proteinspiegel und die Expression der  $1\alpha$ -Hydroxylase senken (CHEN et al., 2014). Auch eine Hyperglykämie, wie sie bei Diabetes mellitus auftritt, senkte im Zellmodell die Expression der  $1\alpha$ -Hydroxylase (SOMJEN et al., 2015). Mutationen der  $1\alpha$ -Hydroxylase führen zur autosomal-rezessiv vererbten Pseudo-Vitamin D Mangel Rachitis Typ 1 (CHI et al., 2019).

Dadurch, dass die Aktivierung der Vitamin D Analoga unabhängig von der renalen oder extrarenalen  $1\alpha$ -Hydroxylase abläuft, ist ihr Einsatz bei diesen Patientengruppen, bei denen die Calcitriol Synthese aufgrund einer ineffektiven  $1\alpha$ -Hydroxylase gestört ist, besonders relevant. Damit nehmen die  $1\alpha$ -hydroxylierten Vitamin D Analoga einen hohen Stellenwert in der Geriatrie ein, da mit zunehmendem Alter auch die Prävalenz der Multimorbidität steigt und immer mehr Komorbiditäten über die Hemmung der  $1\alpha$ -Hydroxylase zu einem Vitamin D

Mangel beitragen. Die Mehrheit der 65-Jährigen weist zwei oder mehr Erkrankungen auf (BARNETT et al., 2012).

Aus diesem Grund sind die Vitamin D Analoga besonders relevant für die meist älteren Alzheimer-Dementen. Laut dem *WHO Global Status Report 2021* lag die mittlere Demenzprävalenz für Europa für die Altersgruppe 60-64 Jahre bei 0,93 %, während sie bei über 65-Jährigen auf 8,46 % anstieg. Für über 90-Jährige bestand eine Prävalenzrate von 36,32 % (DEUTSCHE ALZHEIMER GESELLSCHAFT E.V., 2021). Studien zeigten, dass der Calcitriol-Spiegel im Alter abnimmt, während der Calcifediol-Spiegel konstant bleibt, was auf eine erniedrigte  $1\alpha$ -Hydroxylase im Alter hindeutet (TSAI et al., 1984). Die Supplementierung mit Calcifediol-Präparaten zeigte sich aufgrund der eingeschränkten Syntheseleistung für Calcitriol im Alter weniger effektiv. In einer Studie synthetisierten junge Ratten ein oral verabreichtes Calcifediol-Präparat innerhalb von 24 h zu 20,8 % zu Calcitriol, während ältere Versuchstiere in der gleichen Zeit nur 2,1 % umbauten (ARMBRECHT et al., 1980).

Im Folgenden werden einzelne für Alzheimer-Demente häufig zutreffende Gegebenheiten, bei denen die  $1\alpha$ -Hydroxylase ineffektiv arbeitet, näher ausgeführt.

#### 5.4.4.1 Eingeschränkte renale $1\alpha$ -Hydroxylase bei Niereninsuffizienz

In Deutschland leben ca. zwei Millionen Menschen mit einer eingeschränkten Nierenfunktion (GIRNDT, 2017). Es ist bekannt, dass mit nachlassender Nierenfunktion die renale  $1\alpha$ -Hydroxylase abnimmt, was die Syntheseleistung für Calcitriol einschränkt (CHAROENNGAM et al., 2019). Unbehandelt kann dies zu Störungen des Mineral- und Knochenhaushalts führen und zur Entstehung eines sekundären Hyperparathyreoidismus beitragen. Um dies zu verhindern, sind bei fortgeschrittener Niereninsuffizienz zur Substitution eines Vitamin D Mangels  $1\alpha$ -hydroxylierte Vitamin D Analoga wie Alfacalcidol zugelassen (XIANG et al., 2017).

Insbesondere im Alter steigt die Prävalenz der Niereninsuffizienz an. Laut der bundesweiten *Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland 2008-2011* des Robert Koch-Instituts treten in Deutschland in der Altersgruppe der 70-79-Jährigen bei jedem Achten Einschränkungen der Nierenfunktion auf (GIRNDT et al., 2016). Damit ist die

Niereninsuffizienz eine häufige Komorbidität der meist geriatrischen Alzheimer-Dementen. Hinzu kommt, dass die Hauptrisikofaktoren der chronischen Niereninsuffizienz, arterielle Hypertonie und Diabetes mellitus, auch das Risiko für Morbus Alzheimer fördern (BAGLIETTO-VARGAS et al., 2016; MOONGA et al., 2017). Es ist bekannt, dass niereninsuffiziente Patienten häufiger kognitive Störungen aufweisen und das Risiko, zur Entwicklung einer Alzheimer-Demenz bei Patienten mit polyzystischer Nierenerkrankung um das 2,7-fache erhöht ist (BUCHMAN et al., 2009; GABIN et al., 2019; HELMER et al., 2011; KOGON, HARSHMAN, 2019; YU et al., 2017). Ursächlich hierfür können z.B. vermehrt anfallende urämische Toxine sein, die durch neurotoxische Wirkungen das Risiko für Morbus Alzheimer erhöhen (BUGNICOURT et al., 2013). Eine Studie an 329.822 schwedischen Einwohnern zeigte eine steigende Demenz-Inzidenzrate bei abnehmender glomerulären Filtrationsrate (GFR). Im Vergleich zu Teilnehmern mit normaler Nierenfunktion (entspricht einer GFR > 90 mL/min) hatten Teilnehmer mit einer GFR zwischen 30-59 mL/min ein 71 % höheres Demenzrisiko im Allgemeinen und ein um 81 % erhöhtes Risiko zur Entwicklung einer Alzheimer-Demenz. Bei hochgradig reduzierter GFR (< 30 mL/min) war das Demenzrisiko um 162 % erhöht (XU et al., 2021). Ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung von Morbus Alzheimer ist zudem mit einer Albuminurie, einem Frühsymptom der Niereninsuffizienz, assoziiert (BARZILAY et al., 2011; DECKERS et al., 2017; TAKAE et al., 2018). Daher muss bei der Therapie von Morbus Alzheimer die Nierenfunktion besonderes beachtet werden, was den Stellenwert der 1 $\alpha$ -hydroxylierten Vitamin D Analoga in diesem Kontext unterstreicht.

Erste Studien berichteten, dass die Vitamin D Analoga zum Erhalt der Nierenfunktion bei niereninsuffizienten Patienten beitragen können. Beispielsweise konnte in einer Studie an Patienten mit diabetischer Nephropathie durch die tägliche Gabe von 2  $\mu$ g Paricalcitol die Albuminurie wieder signifikant gesenkt werden (DE ZEEUW et al., 2010). Eine randomisierte, verblindete Studie an Patienten mit Vitamin D Mangel mit fortgeschrittener Niereninsuffizienz beobachtete, dass durch eine dreimonatige Supplementierung von 1  $\mu$ g Doxercalciferol täglich die initial erhöhten Parathormon-Spiegel um 27 % gesenkt werden konnten (MOE et al., 2010).



#### 5.4.4.2 Eingeschränkte renale 1 $\alpha$ -Hydroxylase durch Östrogenmangel

Die renale 1 $\alpha$ -Hydroxylase wird neben der Nierenfunktion, Kalzium und Parathormon auch durch endokrine Stimulatoren, wie den Östrogenspiegel, beeinflusst (CANIGGIA et al., 1987; PIKE et al., 1978). Beispielsweise zeigen Hühner, denen ein Östradiol-Präparat injiziert wurde, eine erhöhte renale 1 $\alpha$ -Hydroxylase Aktivität (TANAKA et al., 1976).

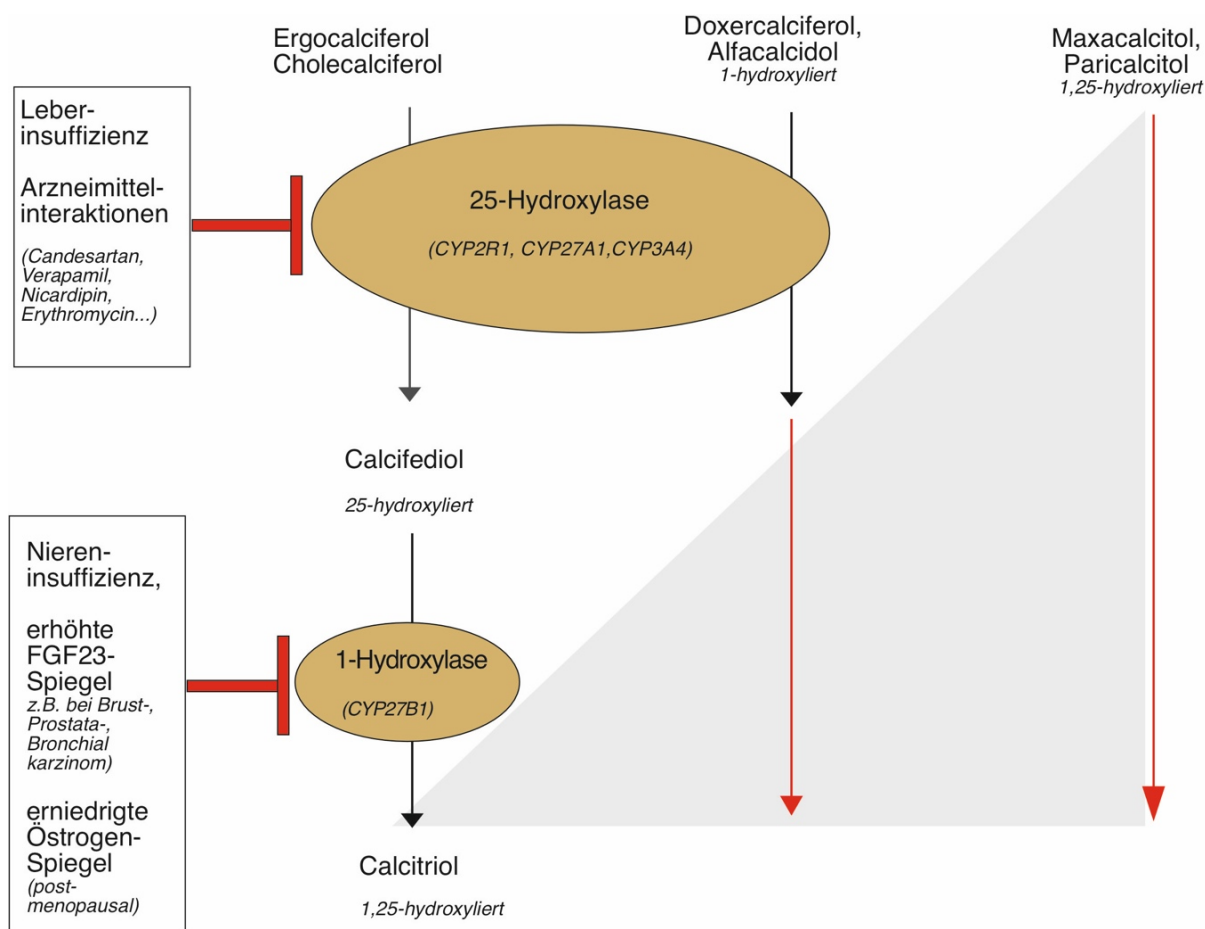
Umgekehrt führt ein Östrogenmangel, wie er beispielsweise in der Menopause oder nach Ovariectomie auftritt, zu einer reduzierten renalen Syntheseleistung von Calcitriol (LOPEZ-BAENA et al., 2020). Aufgrund der Altersprävalenz von Morbus Alzheimer befinden sich Betroffene bei Eintritt der Erkrankung in der Regel bereits in der Postmenopause, die durchschnittlich um das 50. Lebensjahr einsetzt (KO, KIM, 2020). Während der Östrogenspiegel bei Frauen während der fruchtbaren Lebensphase durchschnittlich bei 100-250 pg/ml liegt, fällt er postmenopausal auf Werte um 10 pg/ml ab (KO, KIM, 2020). Die hieraus resultierende eingeschränkte Calcitriol-Synthese kann zur Malabsorption von Kalzium aus dem Darm und einem gesteigerten Knochenabbau führen, was in einer postmenopausalen Osteoporose münden kann. 1 $\alpha$ -hydroxylierte Vitamin D Analoga wie beispielsweise Alfacalcidol finden hier in der Prävention und Therapie bereits Anwendung (RINGE, 2020).

#### 5.4.4.3 Eingeschränkte renale 1 $\alpha$ -Hydroxylase durch erhöhten Fibroblasten-Wachstumsfaktor 23

Alzheimer-Demente weisen erhöhte Proteinkonzentrationen des Fibroblasten-Wachstumsfaktor 23 (*engl. fibroblast growth factor 23*, FGF23) auf (LI et al., 2022). Darüber hinaus können unterschiedliche Tumorerkrankungen, darunter unter anderem Mammakarzinome, Prostatakarzinome, Bronchialkarzinome oder Urothelkarzinome FGF23 produzieren und sind mit erhöhten FGF23 Konzentrationen assoziiert (EWENDT et al., 2020). *In vitro* und *in vivo* Experimente haben gezeigt, dass FGF23 sowohl die Expression der renalen als auch der extrarenalen 1 $\alpha$ -Hydroxylase hemmt. Mäuse, denen zuvor FGF23 injiziert wurde, wiesen eine dosisabhängige Reduktion der renalen 1 $\alpha$ -Hydroxylase mRNA-Konzentration auf und auch die 1 $\alpha$ -Hydroxylase Expression in Monozyten aus humanen Serumproben war nach Inkubation von FGF23 reduziert (BACCHETTA et al., 2013; CHANAKUL et al., 2013; KRAJISNIK et al., 2007; PERWAD et al., 2007; WU et al., 2018).

Erkrankungen, die zu erhöhten FGF23 Konzentrationen führen, könnten daher mit einer niedrigeren  $1\alpha$ -Hydroxylase einhergehen und daher effektiver durch eine Therapie mit  $1\alpha$ -hydroxylierten Vitamin D Analoga anstatt Calcifediol-Präparaten behandelt werden.

Abbildung 21 fasst die Syntheseschritte von Vitamin D und den Vitamin D Analoga und die Interaktionen mit Medikamenten und Komorbiditäten graphisch zusammen.



**Abbildung 21 Vitamin D, Vitamin D Analoga und die Beeinflussung der Hydroxylierungsschritte**

*Ergocalciferol und Cholecalciferol werden durch die 25-Hydroxylase (u.a. CYP2R1, CYP27A1, CYP3A4) zu Calcifediol hydroxyliert, welches durch die 1-Hydroxylase (CYP27B1) zu Calcitriol hydroxyliert wird. Doxercalciferol und Alfacalcidol sind bereits an C1-hydroxyliert, benötigen jedoch noch die Aktivierung durch die 25-Hydroxylase. Maxacalcitol und Paricalcitol sind bereits bei Aufnahme vollständig an C1 und C25 hydroxyliert. Die 25-Hydroxylase kann durch unterschiedliche Arzneimittel oder Leberinsuffizienz beeinträchtigt werden. Die Syntheseleistung der 1-Hydroxylase kann durch Niereninsuffizienz, erhöhte FGF23-Spiegel oder erniedrigte Östrogenspiegel reduziert werden (Abb. modifiziert nach Thiel et al. 2023).*

## 5.5 Weitere therapeutische Ansatzpunkte der Vitamin D Analoga in Bezug auf Morbus Alzheimer

Neben den in der vorliegenden Arbeit näher untersuchten Effekten auf die A $\beta$ -Homöostase und das IL-1 $\beta$ -Level, existieren multiple weitere Wirkmechanismen, über die die Vitamin D Analoga potenziell zur Prävention und Therapie der Alzheimer-Demenz beitragen können.

Kenntnisse dieser Wirkmechanismen könnten weitere therapeutische Unterschiede der Vitamin D Analoga aufzeigen, wodurch die Auswahl der Vitamin D Analoga noch besser an den Patienten und sein Risikoprofil angepasst werden könnte. Diese weiteren therapeutischen Ansatzpunkte sollen daher im Folgenden näher geschildert werden.

### 5.5.1 *Beeinflussung der Hyperphosphorylierung von Tau-Proteinen und oxidativem Stress*

Für einzelne Vitamin D Analoga konnten Folgestudien der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sie die Hyperphosphorylierung von Tau-Proteinen und den oxidativen Stress signifikant minimieren (FAN et al., 2019; KABEL et al., 2019; SAAD EL-DIN et al., 2020).

Kabel *et al.* untersuchten die Auswirkungen einer Calcipotriol und/oder Sitagliptin-Gabe im Rattenmodell. In den Ratten wurde die Pathologie der Alzheimer-Demenz durch LPS-Injektion simuliert. Vor und nach der LPS-Injektion wurden unterschiedliche Parameter für oxidativen Stress bestimmt. Nach der LPS-Injektion nahmen die Gewebekatalase (*engl. tissue catalase, CAT*) und die Superoxiddismutase (SOD) signifikant ab, die Konzentration von Thibarbitursäure-reaktive Substanzen (*engl. thibarbituric acid derivates, TBARS*) stieg an. In Ratten, die vor der LPS-Injektion Calcipotriol und/oder Sitagliptin erhielten, fielen der Rückgang von CAT und SOD sowie der Anstieg von TBARS signifikant niedriger aus, was einem geringeren Ausmaß an oxidativem Stress nach Calcipotriol-Behandlung entspricht (KABEL et al., 2019).

Auch die bereits beschriebene Folgestudie mit Maxacalcitol beobachtete im Alzheimer-Rattenmodell neben den geschilderten Effekten auf die A $\beta$ -Homöostase und proinflammatorischen Zytokine, signifikante Effekte auf phosphorylierte Tau-Proteine und

den oxidativen Stress (SAAD EL-DIN et al., 2020). In den Ratten, denen LPS injiziert wurde, bestand verglichen zur Kontrollgruppe eine geringere Proteinkonzentration von antioxidativen Effektoren, die auf eine herabregulierte Genexpression des vorgeschalteten Transkriptionsfaktors Nrf2 (*engl. nuclear factor erythroid 2 related factor 2*) zurückgeführt wurde. Zudem bestand eine Hyperphosphorylierung der Tau-Proteine. Die Behandlung der Ratten mit Maxacalcitol führte zum signifikanten Anstieg der Expression von Nrf2 und den nachgeschalteten antioxidativen Effektoren und verringerte die Hyperphosphorylierung von Tau-Proteinen signifikant (SAAD EL-DIN et al., 2020).

Darüber hinaus zeigten Fan *et al.*, dass auch Paricalcitol oxidativen Stress in Zellen minimieren kann. Eine Inkubation mit Paricalcitol führte in neuronalen Mitochondrien zur verringerten Bildung von 8-Hydroxydesguanosin (8-OHdG), einem Biomarker für oxidativen Stress und minimierte die Rate des neuronalen Zelltods und synaptischer Verluste (FAN et al., 2019). Die Minimierung des neuronalen Untergangs könnte sich auch signifikant auf Neurotransmitterspiegel auswirken, ein Zusammenhang, der im folgenden Kapitel beleuchtet wird.

### **5.5.2 Parallelen von Vitamin D und seinen Analoga zu Antidementiva**

Derzeit existiert in Europa keine pharmakologische Therapie, die sich kausal gegen die Pathologie von Morbus Alzheimer richtet. Die gegenwärtig durch die *Deutsche Gesellschaft für Neurologie* empfohlenen Arzneimittel wirken rein symptomatisch, ohne den Krankheitsverlauf aufzuhalten (DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR NEUROLOGIE, 2016; FERRIS et al., 2009). Ihre Angriffspunkte sind Neurotransmitterspiegel, die bei den Betroffenen der Alzheimer-Demenz durch den neuronalen Untergang ins Ungleichgewicht geraten sind. Auch Vitamin D und seine Analoga greifen in die Regulierung wichtiger Neurotransmitterspiegel ein und könnten hierüber den Krankheitsverlauf der Alzheimer-Demenz modulieren, wie im Folgenden dargestellt.

#### **5.5.2.1 Beeinflussung von Acetylcholin**

Bei Alzheimer-Dementen wird ein niedriger Acetylcholin-Spiegel beschrieben (TALESA, 2001). Niedrige Acetylcholin-Spiegel stehen mit Lern- und Gedächtnisstörungen in Verbindung (FERREIRA-VIEIRA et al., 2016). Einhergehend damit stehen Anticholinergika,

die die Wirkung von Acetylcholin hemmen, unter dem Verdacht das Demenzrisiko zu erhöhen (COUPLAND et al., 2019). Ursächlich für die niedrigen Acetylcholin-Spiegel bei Alzheimer-Dementen ist neben dem Untergang cholinerg Neuronen eine reduzierte Expression und Aktivität der Cholin-Acetyl-Transferase in den verbleibenden Neuronen (TALESA, 2001). Die Cholin-Acetyl-Transferase katalysiert die Synthese von Acetylcholin (STRADA et al., 1992). Ihre Aktivitätsabnahme korreliert mit der Schwere der Demenz (WILCOCK et al., 1982).

Die Antidementiva *Donepezil*, *Galantamin* und *Rivastigmin* heben den Spiegel des Neurotransmitters Acetylcholin an, indem sie seinen Katabolismus durch Inhibition der Acetylcholinesterase blockieren (ZHANG, GORDON, 2018). Die Acetylcholinesterase interagiert zudem mit A $\beta$  und fördert die A $\beta$ -Aggregation, was sie zu einem vielversprechenden Angriffspunkt in der Therapie von Morbus Alzheimer macht (DE FERRARI et al., 2001; JOHNSON, MARSHALL, 1976). Der Einsatz der Acetylcholinesterase-Inhibitoren ist jedoch umstritten. Eine Metaanalyse ergab, dass nur 9 % der Behandelten auf die Therapie ansprechen und eine Wirkung über den Placebo-Effekt hinaus zeigten (LANCOTOT et al., 2003). Gleichzeitig geht die Therapie mit einer erhöhten Nebenwirkungsrate einher (KIM et al., 2011; WATANABE et al., 2018). Eine Studie zeigte, dass die Therapie durchschnittlich nach 14 Monaten abgebrochen wurde (SUN et al., 2008). Eine Übersichtsarbeit, die die Evidenz der Therapie mit Acetylcholinesterase-Inhibitoren analysierte, kam zu dem Ergebnis, dass die Medikamente zwar zu einer statistisch signifikanten Verbesserung der Kognition führen, deren klinische Relevanz jedoch kritisch zu hinterfragen ist (RAINA et al., 2008).

Vitamin D beeinflusste in Tierexperimenten ebenfalls den Acetylcholin-Spiegel. Ratten, die zuvor mit Vitamin D behandelt wurden, zeigten in einigen Hirnregionen eine signifikant erhöhte Aktivität der Cholin-Acetyl-Transferase (SONNENBERG et al., 1986). Darüber hinaus zeigte sich in einem Alzheimer-Rattenmodell, in denen in Ratten durch eine Streptozotocin-Injektion eine Demenz simuliert wurde, dass eine Vitamin D Supplementierung die pathologisch erhöhten Acetylcholinesterase-Spiegel wieder normalisierte (RODRIGUES et al., 2019). Die Vitamin D Analoga könnten damit eine ähnliche Wirkung auf die Acetylcholin-Spiegel und die Acetylcholinesterase ausüben wie die

Acetylcholinesterase Inhibitoren. Weitere Studien sollten daher die Effektstärken der Vitamin D Analoga mit den Acetylcholinesterase Inhibitoren vergleichen.

#### 5.5.2.2 Beeinflussung von Glutamat

Weitere Parallelen bestehen zu dem nicht kompetitiven NMDA-Rezeptorantagonisten *Memantin*, der derzeit bei moderater Demenz zugelassen ist. *Memantin* wirkt der erhöhten Glutamatausschüttung entgegen, die bei Alzheimer-Dementen besteht (JOHNSON, KOTERMANSKI, 2006). Hohe Glutamat-Spiegel stimulieren die NMDA-Rezeptoren mit der Folge eines intrazellulären Kalziumanstiegs, der zur Apoptose der Zelle führen kann. Dieser als Exzitotoxizität definierte Mechanismus kann durch die Blockade des NMDA-Rezeptors verlangsamt werden (HYND et al., 2004). Unter physiologischen Bedingungen scheint zelluläres APP die Glutamatrezeptoren zu regulieren (TOMINAGA-YOSHINO et al., 2001). In der Pathologie von Morbus Alzheimer verstärkt A $\beta$  die Exzitotoxizität (BRORSON et al., 1995; MATTSON, GOODMAN, 1995).

Für Vitamin D sind ebenso wie für *Memantin* neuroprotektive Eigenschaften beschrieben. Vitamin D konnte in mehreren Studien die durch Glutamat induzierte Neurotoxizität reduzieren (KAJTA et al., 2009; TANIURA et al., 2006). Beispielsweise zeigten sich signifikant niedrigere LDH- und Caspase-3 Konzentrationen, wenn murine Hippocampusneuronen nach der Behandlung mit Glutamat mit Calcitriol inkubiert wurden (KAJTA et al., 2009). Eine Studie an Patienten mit Morbus Alzheimer untersuchte die Kombination von Vitamin D und *Memantin* in Hinblick auf die kognitive Verbesserung. Hierzu wurde vor und nach der sechsmonatigen Einnahme von Vitamin D, *Memantin* oder beider Präparate der MMST erhoben. Während die reine Einnahme von Vitamin D oder *Memantin* den MMST nicht signifikant beeinflusste, zeigte sich nach der Kombination beider Präparate eine Verbesserung des MMST um durchschnittlich vier Punkte (ANNWEILER, BEAUCHET, 2012; ANNWEILER et al., 2012). In der Zellkultur wurde die Wirkung beider Präparate auf die Axontoxizität getestet, die zuvor durch A $\beta$  oder Glutamat induziert wurde. Die Kombination von Vitamin D und *Memantin* zeigte sich protektiv, während reines *Memantin* oder Vitamin D keine oder niedrigere Effekte bewirkten (ANNWEILER et al., 2014). Diese Studien liefern somit Hinweise auf eine synergistische und potenzierende Wirkungsweise von Vitamin D und *Memantin*.

In der Literatur ist beschrieben, dass in der Niere hohe Glutamat-Spiegel und aktivierte NMDA-Rezeptoren die Expression der 1- $\alpha$ -Hydroxylase senken, woraus eine reduzierte Synthese von Calcitriol resultiert (PARISI et al., 2010). Wenn diese Mechanismen auch zerebral bestehen, könnten die 1 $\alpha$ -hydroxylierten Vitamin D Analoga noch potenter als Vitamin D wirken, da sie ohne die potenziell herabregulierte 1- $\alpha$ -Hydroxylase agieren.

### 5.5.2.3 *Beeinflussung von Dopamin*

Die Alzheimer-Demenz geht zudem mit einem niedrigeren Dopamin-Spiegel einher. (KRASHIA et al., 2019; PAN et al., 2019). Insbesondere die Apathie, als häufige Verhaltensstörung bei Alzheimer-Dementen, korreliert mit der Dysfunktion des dopaminergen Systems (MITCHELL et al., 2011).

Auch Vitamin D steht mit Dopamin in Verbindung, so wurde der VDR in humanen, dopaminergen Neuronen der Substantia Nigra detektiert (CUI et al., 2017). Ein Vitamin D Mangel geht mit einem dopaminergen Defizit einher, da beispielsweise die Expression der Catechol-O-Methyltransferase, die für die Synthese von Dopamin notwendig ist, gesenkt ist (KESBY et al., 2009; KESBY et al., 2010).

Der Dopamin-Spiegel wird als pharmakologischer Angriffspunkt zur Symptomlinderung der Alzheimer-Demenz diskutiert (MITCHELL et al., 2011; STORGA et al., 1996). Eine Calcitriol Supplementierung bei Mäusen und Ratten führte zu einem signifikanten Anstieg des Dopamin-Spiegels, was unter anderem auf Expressionsänderung von Genen, die mit der Dopaminsynthese in Verbindung stehen, zurückzuführen war (JIANG et al., 2014; TRINKO et al., 2016). In *in vitro* und Tierexperimenten wurde durch Vitamin D die Differenzierung von dopaminergen Neuronen gefördert. Zudem zeigte sich Vitamin D neuroprotektiv (LIMA et al., 2018; PERTILE et al., 2016).

Zusammenfassen lässt sich festhalten, dass Vitamin D potenziell ähnliche Wirkmechanismen zur Regulation der Neurotransmitterspiegel aufweist, wie die derzeit in der symptomatischen Therapie von Morbus Alzheimer eingesetzten Antidementiva. Eine Ursache für das Ungleichgewicht der Neurotransmitterspiegel ist der neuronale Untergang, der unter anderem durch A $\beta$  induziert wird. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Vitamin D Analoga das Gesamt-A $\beta$  reduzieren (Vergleich Kapitel 4.2). Daher könnten die Vitamin D

Analoga additiv wirken, da sie nicht nur das Ungleichgewicht der Neurotransmitter ausgleichen, sondern dem neuronalen Untergang durch Reduktion des toxischen A $\beta$  auch neuroprotektiv entgegenwirken.

### **5.5.3 Vitamin D und Beeinflussung kardiovaskulärer Risikofaktoren**

Die meisten kardiovaskulären Risikofaktoren, darunter Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie, Rauchen, Adipositas und Bewegungsmangel, sind mit einem erhöhten Risiko für Morbus Alzheimer assoziiert (BAGLIETTO-VARGAS et al., 2016; LEE et al., 2020; WANLEENUWAT et al., 2019). Gleichzeitig besteht ein Zusammenhang zwischen diesen Risikofaktoren und den Vitamin D Spiegeln (NORMAN, POWELL, 2014). Beispielsweise ist ein Vitamin D Mangel mit einem erhöhten Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen wie arterieller Hypertonie, Myokardinfarkten oder der koronaren Herzkrankheit verbunden (BERRIDGE, 2017; GIOVANNUCCI et al., 2008; KUCHULAKANTI et al., 2020; PORTER, SMITH, 1988; RAI, AGRAWAL, 2017). Welche Rolle Vitamin D und seine Analoga in der Reduktion des kardiovaskulären Risikoprofils und damit auch in der Reduktion wichtiger Risikofaktoren der Alzheimer-Demenz spielen, ist Gegenstand aktueller Forschung. Bisher zeigt sich die Studienlage diesbezüglich kontrovers (BARBARAWI et al., 2019; MANSON et al., 2020; MANSON et al., 2019).

Es gibt Hinweise, dass insbesondere von den Vitamin D Analoga ein präventives Potential in Bezug auf kardiovaskuläre Risikofaktoren ausgeht. Im Rattenmodell konnte z.B. durch die Supplementierung von Maxacalcitol das Auftreten von kardialen Schäden, wie intrakardialen oxidativen Stress oder kardialer oder perivaskulärer Fibrose, signifikant reduziert werden (FUJII et al., 2015). Für das Vitamin D Analogon Paricalcitol konnte in einer Metaanalyse gezeigt werden, dass es bei Niereninsuffizienten das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse signifikant reduziert und die im Rahmen der fortschreitenden Arteriosklerose reduzierte Flexibilität der Arterien aufrechterhält (GIAKOUMIS et al., 2019; HU et al., 2018). Im Gegensatz zu anderen Vitamin D Analoga verringerte Paricalcitol bei Patienten, die sich einer Hämodialyse unterziehen, signifikant die Gesamtmortalität (LIU et al., 2019). Im Folgenden soll der Zusammenhang von Vitamin D Analoga, Morbus Alzheimer und einzelnen kardiovaskulären Risikofaktoren diskutiert werden.



### 5.5.3.1 Arterielle Hypertonie

Arterielle Hypertonie gilt als Risikofaktor für Morbus Alzheimer (LENNON et al., 2021). Eine Behandlung mit Alfacalcidol senkte in einer klinischen Studie den systolischen Blutdruck um 6 mmHg und den diastolischen Blutdruck um 5,8 mmHg (LIND et al., 1989; LIND et al., 1988). Weitere Vitamin D Analoga, z.B. Paricalcitol, zeigten jedoch keine signifikanten antihypertensiven Effekte (PILZ et al., 2009). Durch eine verbesserte Gehirnperfusion könnte beispielsweise die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke positiv beeinflusst werden, was zu einer besseren A $\beta$ -Clearance führen könnte. Darüber hinaus könnte das Apoplex-Risiko, das bei Alzheimer-Dementen signifikant erhöht ist, durch niedrigere Blutdruckprofile minimiert werden. Bei Patienten, die keine Alzheimer-Demenz aufweisen, hätte dies präventive Auswirkungen, da laut einer Studie ein Apoplex in der Krankenvorgeschichte das Risiko an einer Alzheimer-Demenz zu erkranken verdoppelt (TOSTO, 2017).

Insbesondere die Beeinflussung des blutdruckregulierenden Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems wird als ein potenzieller Therapieansatz der Alzheimer-Demenz diskutiert (BILD et al., 2022). Das Vorläuferprotein Angiotensinogen wird durch Renin zu Angiotensin I gespalten, aus dem durch ACE das vasokonstriktorische und Blutdruck steigernde Angiotensin II entsteht. Angiotensin II kann über unterschiedliche Mechanismen, beispielsweise der Erhöhung der APP-mRNS, der  $\beta$ -Sekretase Aktivität oder der *Presenilin*-Expression, die A $\beta$ -Konzentrationen im Gehirn erhöhen (GEBRE et al., 2018). Darüber hinaus weisen Alzheimer-Demente erhöhte ACE-Liquorspiegel auf, was über den vermehrten Anfall von Angiotensin II zu erhöhten Blutdruckprofilen beitragen kann. Die ACE-Expression im Gehirngewebe von Alzheimer-Dementen wurde mit dem A $\beta$ -Gehalt und dem Schweregrad der Alzheimer-Demenz assoziiert. Antihypertensive Therapien, wie ACE-Hemmer oder Angiotensin-Rezeptorantagonisten konnten mit niedrigen A $\beta$ -Konzentrationen im Gehirn in Zusammenhang gebracht werden, jedoch verbesserten sich laut einer Metaanalyse die kognitiven Fähigkeiten nicht signifikant (LOERA-VALENCIA et al., 2021).

Auch Vitamin D Analoga besitzen das Potenzial, das Renin-Angiotensin-System zu beeinflussen (LI, 2003). Beispielsweise reduzierte eine acht-wöchige Paricalcitol-Behandlung bei Ratten signifikant die myokardiale Expression von Renin und Angiotensinogen und

Doxercalciferol reduzierte die Expression von Renin und dem Angiotensin-II-Rezeptor in Mäusen (FREUNDLICH et al., 2014; WANG et al., 2011). Die Hemmung der Renin-Expression könnte aktuellen antihypertensiven Therapieansätzen wie ACE-Hemmern oder Angiotensin-Rezeptorantagonisten überlegen sein, da kein kompensatorischer Anstieg der Renin-Expression entstehen kann (LI, 2003). Weitere Studien sind hier jedoch notwendig, um das Potenzial der Vitamin D Analoga ausführlich zu untersuchen.

#### 5.5.3.2 *Diabetes mellitus*

Eine Vitamin D Supplementierung reduziert signifikant das Risiko zur Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2. Dies zeigte unter anderem die *Nurses' Health* Studie, die über 20 Jahre prospektiv 83.779 Frauen beobachtete. 4.843 Frauen entwickelten im Verlauf einen Diabetes mellitus Typ 2. Teilnehmerinnen, die täglich mehr als 800 IE Vitamin D in Kombination mit 1.200 mg Kalzium zu sich nahmen, hatten ein um 33 % niedrigeres Risiko einen Diabetes mellitus zu entwickeln, verglichen mit einer Einnahme von weniger als 400 IE Vitamin D und weniger als 600 mg Kalzium (BARBARAWI et al., 2020). In einer Metaanalyse sankt durch eine Vitamin D Supplementierung insbesondere der Nüchtern-Blutzucker, während keine signifikanten Effekte auf den Insulinspiegel und den HbA1c-Wert bestanden (MILAJERDI et al., 2019). Ein vorbestehender Diabetes mellitus gilt als Risikofaktor zur Entwicklung einer Alzheimer-Demenz, sodass das Verhindern von Diabetes mellitus in der Prävention von Morbus Alzheimer eine wichtige Rolle spielt (XU et al., 2015; YU et al., 2020). In der Folgestudie von Kabel *et al.* zeigte das Vitamin D Analogon Calcipotriol insbesondere in Kombination mit dem Antidiabetikum Sitagliptin positive Effekte auf kognitive Fähigkeiten, den oxidativen Stress und proinflammatorische Zytokine. Auch die alleinige Behandlung von Sitagliptin bewirkte eine Zunahme der Erinnerungsfähigkeit von Ratten, in denen eine Alzheimer-Demenz Pathologie simuliert wurde. Die Ergebnisse unterstreichen damit den engen Zusammenhang von Diabetes mellitus und Morbus Alzheimer (KABEL et al., 2019).

#### 5.5.3.3 *Lipidstoffwechsel*

Epidemiologische Studien zeigen, dass hohe Serum-Cholesterinspiegel mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Morbus Alzheimer korrelieren (LOERA-VALENCIA et al., 2019; SOLOMON et al., 2009). Die Senkung des Cholesterinspiegels ist damit ein präventiver Ansatzpunkt und insbesondere die cholesterinsenkenden Statine wurden in Bezug auf Morbus

Alzheimer untersucht. Die Literaturlage zeigt sich kontrovers. Während in einigen Metaanalysen keine Evidenz besteht, dass durch eine regelmäßige Statineinnahme das Risiko für Morbus Alzheimer reduziert wird, besteht in anderen Studien ein signifikanter Zusammenhang (CHU et al., 2018; MCGUINNESS et al., 2016). Eine Dosis-Wirkungs-Analyse zeigte pro Jahr Statineinnahme eine Reduktion des Demenzrisikos um 20 % (ZHANG et al., 2018b).

Die Arbeitsgruppe für experimentelle Neurologie der Universität des Saarlandes zeigte, dass ein Vitamin D Mangel auf Zellkulturebene und *in vivo* die Lipidhomöostase beeinflusst (LAUER et al., 2021). In anderen Studien senkte die Supplementierung von Vitamin D und Vitamin D Analoga signifikant den Cholesterinspiegel (DIBABA, 2019; MILAJERDI et al., 2019). Eine Studie an Mäusen verglich den Einfluss von Vitamin D<sub>3</sub> und unterschiedlichen Vitamin D Analoga, darunter Calcifediol, Alfacalcidol und Doxercalciferol, auf den murinen Cholesterinspiegel. Die Mäuse erhielten zuvor eine cholesterinreiche, westliche Ernährung. Bis auf Doxercalciferol zeigten alle Vitamin D Analoga cholesterinsenkende Eigenschaften. Alfacalcidol senkte den Cholesterinspiegel effektiver als Calcifediol und Calcitriol (QUACH et al., 2018).

Die Vitamin D Analoga könnten damit ähnlich wie die Statine durch Beeinflussung der Lipidhomöostase und insbesondere des Cholesterinspiegels das Risiko zur Entwicklung von Morbus Alzheimer senken (GRIMES, 2006). Hierbei könnten die Vitamin D Analoga den Statinen, die mit Nebenwirkungen wie Myopathien oder Rhabdomyolysen in Verbindung gebracht werden, durch ein günstigeres Nebenwirkungsprofil überlegen sein.

#### 5.5.3.4 Immobilität

Durch eine Vitamin D Supplementierung könnte die Mobilität und dadurch der Zugang zu Bewegungstherapien länger erhalten werden. Bekannt ist, dass eine Vitamin D Supplementierung signifikant das Fraktur- und Sturzrisiko senkt und die Funktionalität des Bewegungsapparates aufrechterhält (ALLAN et al., 2016; AVENELL et al., 2014; BISCHOFF-FERRARI et al., 2012; MURAD et al., 2011; YAO et al., 2019). Stürze und Frakturen sind insbesondere im höheren Alter eine häufige Ursache für Immobilität (AMBROSE et al., 2013). Wenn sie durch Vitamin D vermieden werden können, bedeutet dies, dass ältere Menschen längere Zeit körperlich aktiv sein können. Körperliche Aktivität

hat neben seinen positiven Auswirkungen auf das kardiovaskuläre Profil direkte Effekte auf die Alzheimer-Demenz, beispielsweise verlangsamt sich durch körperliche Betätigung der Gedächtnisverlust Alzheimer-Dementer (STEPHEN et al., 2017; VAN GELDER et al., 2004). In einer Kohortenstudie mit Erwachsenen im späten mittleren Alter korrelierte die körperliche Aktivität signifikant mit der A $\beta$ -Belastung, dem Glucosestoffwechsel und dem Hippokampusvolumen (OKONKWO et al., 2014; VASCONCELOS-FILHO et al., 2021). Die Erhaltung der Beweglichkeit ist damit ein wichtiger nicht-medikamentöser Therapieansatz, der durch Vitamin D und seine Analoga unterstützt wird. Die Vitamin D Analoga, insbesondere Alfacalcidol, könnten hier besonders potent sein, da eine Studie zeigte, dass Alfacalcidol effektiver vor Wirbelsäulenfrakturen schützt als Calcitriol (O'DONNELL et al., 2008). Durch die Senkung des Frakturrisikos können darüber hinaus Krankenhausaufenthalte und Operationen verhindert werden. Dies hat besondere Relevanz, da einige Narkosearten *in vitro* zur erhöhten A $\beta$ -Belastung in Neuronen führten, was darauf hindeutet, dass bestimmte Anästhetika die Symptomatik von Morbus Alzheimer verstärken (SUN, 2020).

## 5.6 Fazit & Ausblick

Auf molekularer Ebene wurde gezeigt, dass die synthetisch hergestellten Vitamin D Analoga Maxacalcitol, Calcipotriol, Alfacalcidol, Paricalcitol und Doxercalciferol ebenso wie Calcifediol die A $\beta$ -Homöostase beeinflussen und den A $\beta$ -Gehalt signifikant reduzieren, indem sie einerseits den A $\beta$ -Anabolismus, also die APP-Prozessierung, inhibieren und andererseits den A $\beta$ -Katabolismus fördern. Die APP-Prozessierung wird durch direkte Effekte auf die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase Aktivität und durch Reduktion der *BACE1* und *NICASTRIN* Genexpression gesenkt. Die Degradation von A $\beta$  wird durch eine verstärkte NEP-Aktivität und eine vermehrte *NEP*-Expression gefördert. Die Vitamin D Analoga beeinflussten zudem das IL-1 $\beta$ -Level, sodass auch die Interaktion mit neuroinflammatorischen Prozessen gezeigt wurde.

Hirnproben von Mäusen mit Vitamin D Mangel wiesen eine erhöhte  $\beta$ -Sekretase Aktivität und eine reduzierte A $\beta$ -Degradation auf. Dies steht im Einklang mit der aktuellen epidemiologischen Studienlage, die, wenn auch nur mit geringer Evidenz, auf einen kausalen

Zusammenhang zwischen Vitamin D Mangel und erhöhtem Erkrankungsrisiko für Morbus Alzheimer hindeutet. Es zeigte sich, dass die Vitamin D Analoga bei bestehendem Vitamin D Mangel insbesondere den A $\beta$ -Katabolismus fördern, während auf die  $\beta$ -Sekretase tendenzielle, mit Ausnahme für Doxercalciferol, nicht signifikante Effekte bestanden. Insgesamt ist anzunehmen, dass nicht nur der Ausgleich eines Vitamin D Mangels, sondern auch die Substitution bei gesättigtem Vitamin D Status präventive und therapeutische Vorteile in Bezug auf Morbus Alzheimer mit sich bringen könnte.

Auch wenn sich die zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen minimal unterschieden, bestand insgesamt kein signifikanter Unterschied in den Effektstärken der einzelnen synthetischen Vitamin D Analoga und Calcifediol. Die Vitamin D Analoga waren Calcifediol weder über- noch unterlegen. Dies ermöglicht es die Auswahl der Vitamin D Therapie individuell an den Patienten anzupassen und so der Strategie einer personalisierten Medizin nachzukommen. Beispielsweise könnten Alzheimer-Demente mit reduzierter nicht-amyloidogene Prozessierung von einer Supplementierung mit Calcifediol oder Paricalcitol profitieren, da diese die  $\alpha$ -Sekretase Aktivität erhöhten. Patienten mit geringer A $\beta$ -Degradation könnten einen stärkeren Benefit durch die Verwendung von Calcipotriol oder Maxacalcitol haben. Des Weiteren könnte die Medikamentenauswahl anhand Komorbiditäten und der bestehenden Medikation der an Morbus Alzheimer erkrankten Patienten getroffen werden. So könnte beispielsweise die Verwendung der C<sub>1</sub>-hydroxylierten Vitamin D Analoga bei bestehender Niereninsuffizienz einer Anwendung von Calcifediol überlegen sein. Patienten mit Leberinsuffizienz könnten von bereits C<sub>25</sub>-hydroxylierten Analoga wie Paricalcitol oder Maxacalcitol profitieren und die Auswahl könnte unter Berücksichtigung der bestehenden Medikation und Arzneimittelinteraktionen an die CYP450 Enzyme angepasst werden. Zukünftige Studien sollten sich zudem auch auf weitere therapeutische Ansatzpunkte konzentrieren, über die Vitamin D Analoga Morbus Alzheimer beeinflussen, da sich hier ggf. signifikante Unterschiede einzelner Analoga ergeben könnten.

Bei der Ableitung von Therapieempfehlungen muss jedoch beachtet werden, dass es sich bei den in der vorliegenden Arbeit generierten Ergebnissen um *in vitro* und *ex vivo* Daten handelt, die nur begrenzt auf den Menschen übertragbar sind. Epidemiologische Studien, die den präventiven oder therapeutischen Einsatz von Vitamin D Analoga bei Morbus Alzheimer analysieren, existieren bis dato nicht. Studien, die Calcifediol oder andere natürlich

vorkommende Vitamin D Präparate an Alzheimer-Dementen untersuchten, kamen zu inhomogenen Ergebnissen und es wird kontrovers diskutiert, inwiefern eine Vitamin D Supplementierung das Erkrankungsrisiko für Morbus Alzheimer und die kognitiven Fähigkeiten beeinflusst.

Für Maxacalcitol, Calcipotriol und Paricalcitol konnten Folgestudien die im Rahmen der vorliegenden Arbeit generierten Ergebnisse teilweise bereits *in vivo* in Maus- und Rattenversuchen reproduzieren und ergänzend Einflüsse auf den oxidativen Stress und die Tau-Pathologie darstellen. In den Studien bestand durch die Behandlung mit den Vitamin D Analoga auch eine signifikante Verbesserung kognitiver Fähigkeiten der Mäuse bzw. Ratten (FAN et al., 2019; KABEL et al., 2019; SAAD EL-DIN et al., 2020). Dies unterstreicht den klinischen Stellenwert der hier vorliegenden Ergebnisse und untermauert die Notwendigkeit, die für weitere klinische Studien mit Vitamin D Analoga in Bezug auf die Alzheimer-Demenz besteht.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Abe J, Morikawa M, Miyamoto K, Kaiho S, Fukushima M, Miyaura C, Abe E, Suda T, Nishii Y (1987) Synthetic analogues of vitamin D<sub>3</sub> with an oxygen atom in the side chain skeleton. A trial of the development of vitamin D compounds which exhibit potent differentiation-inducing activity without inducing hypercalcemia. *FEBS Lett* 226:58-62
2. Achiron A, Givon U, Magalashvili D, Dolev M, Liraz Zaltzman S, Kalron A, Stern Y, Mazor Z, Ladkani D, Barak Y (2015) Effect of Alfacalcidol on multiple sclerosis-related fatigue: A randomized, double-blind placebo-controlled study. *Mult Scler* 21:767-775
3. Adams JS, Gacad MA (1985) Characterization of 1 alpha-hydroxylation of vitamin D<sub>3</sub> sterols by cultured alveolar macrophages from patients with sarcoidosis. *J Exp Med* 161:755-765
4. Aghajafari F, Pond D, Catzikiris N, Cameron I (2018) Quality assessment of systematic reviews of vitamin D, cognition and dementia. *BJPsych Open* 4:238-249
5. Aguilar-Navarro SG, Mimenza-Alvarado AJ, Jimenez-Castillo GA, Bracho-Vela LA, Yevefino-Castro SG, Avila-Funes JA (2019) Association of Vitamin D with Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Dementia in Older Mexican Adults. *Rev Invest Clin* 71:381-386
6. Ajmani SN, Paul M, Chauhan P, Ajmani AK, Yadav N (2016) Prevalence of Vitamin D Deficiency in Burka-clad Pregnant Women in a 450-Bedded Maternity Hospital of Delhi. *J Obstet Gynaecol India* 66:67-71
7. Akizawa T, Akiba T, Hirakata H, Kinugasa E, Tominaga Y, Fukagawa M, Yokoyama K, Zhang W, Linde PG, Suzuki M (2015) Comparison of paricalcitol with maxacalcitol injection in Japanese hemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism. *Ther Apher Dial* 19:225-234
8. Allan GM, Cranston L, Lindblad A, McCormack J, Kolber MR, Garrison S, Korownyk C (2016) Vitamin D: A Narrative Review Examining the Evidence for Ten Beliefs. *J Gen Intern Med* 31:780-791
9. Alvarez-Diaz S, Larriba MJ, Lopez-Otin C, Munoz A (2010) Vitamin D: Proteases, protease inhibitors and cancer. *Cell Cycle* 9:32-37
10. Alvira-Botero X, Carro EM (2010) Clearance of amyloid-beta peptide across the choroid plexus in Alzheimer's disease. *Curr Aging Sci* 3:219-229
11. Alzheimer A (1906) Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und psychisch-gerichtliche Medizin* 64:146-148
12. Alzheimer's Association (2021) 2021 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement* 17:327-406
13. Ambrose AF, Paul G, Hausdorff JM (2013) Risk factors for falls among older adults: a review of the literature. *Maturitas* 75:51-61
14. Ames BN, Grant WB, Willett WC (2021) Does the High Prevalence of Vitamin D Deficiency in African Americans Contribute to Health Disparities? *Nutrients* 13

15. Amrein K, Scherkl M, Hoffmann M, Neuwersch-Sommeregger S, Kostenberger M, Tmava Berisha A, Martucci G, Pilz S, Malle O (2020) Vitamin D deficiency 2.0: an update on the current status worldwide. *Eur J Clin Nutr* 74:1498-1513
16. Annweiler C, Schott AM, Rolland Y, Blain H, Herrmann FR, Beauchet O (2010) Dietary intake of vitamin D and cognition in older women: a large population-based study. *Neurology* 75:1810-1816
17. Annweiler C, Souberbielle JC, Schott AM, de Decker L, Berrut G, Beauchet O (2011) [Vitamin D in the elderly: 5 points to remember]. *Geriatr Psychol Neuropsychiatr Vieil* 9:259-267
18. Annweiler C, Beauchet O (2012) Possibility of a new anti-alzheimer's disease pharmaceutical composition combining memantine and vitamin D. *Drugs Aging* 29:81-91
19. Annweiler C, Herrmann FR, Fantino B, Brugg B, Beauchet O (2012) Effectiveness of the combination of memantine plus vitamin D on cognition in patients with Alzheimer disease: a pre-post pilot study. *Cogn Behav Neurol* 25:121-127
20. Annweiler C, Llewellyn DJ, Beauchet O (2013a) Low serum vitamin D concentrations in Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *J Alzheimers Dis* 33:659-674
21. Annweiler C, Montero-Odasso M, Llewellyn DJ, Richard-Devantoy S, Duque G, Beauchet O (2013b) Meta-analysis of memory and executive dysfunctions in relation to vitamin D. *J Alzheimers Dis* 37:147-171
22. Annweiler C, Brugg B, Peyrin JM, Bartha R, Beauchet O (2014) Combination of memantine and vitamin D prevents axon degeneration induced by amyloid-beta and glutamate. *Neurobiol Aging* 35:331-335
23. Annweiler C, Bartha R, Karras SN, Gautier J, Roche F, Beauchet O (2015) Vitamin D and white matter abnormalities in older adults: a quantitative volumetric analysis of brain MRI. *Exp Gerontol* 63:41-47
24. Ao T, Kikuta J, Ishii M (2021) The Effects of Vitamin D on Immune System and Inflammatory Diseases. *Biomolecules* 11
25. Armbrrecht HJ, Zenser TV, Davis BB (1980) Effect of age on the conversion of 25-hydroxyvitamin D3 to 1,25-dihydroxyvitamin D3 by kidney of rat. *J Clin Invest* 66:1118-1123
26. Ashrafian H, Zadeh EH, Khan RH (2021) Review on Alzheimer's disease: Inhibition of amyloid beta and tau tangle formation. *Int J Biol Macromol* 167:382-394
27. Autier P, Mullie P, Macacu A, Dragomir M, Boniol M, Coppens K, Pizot C, Boniol M (2017) Effect of vitamin D supplementation on non-skeletal disorders: a systematic review of meta-analyses and randomised trials. *Lancet Diabetes Endocrinol* 5:986-1004
28. Avenell A, Mak JC, O'Connell D (2014) Vitamin D and vitamin D analogues for preventing fractures in post-menopausal women and older men. *Cochrane Database Syst Rev*:CD000227
29. Bacchetta J, Sea JL, Chun RF, Lisse TS, Wesseling-Perry K, Gales B, Adams JS, Salusky IB, Hewison M (2013) Fibroblast growth factor 23 inhibits extrarenal synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D in human monocytes. *J Bone Miner Res* 28:46-55



30. Baglietto-Vargas D, Shi J, Yaeger DM, Ager R, LaFerla FM (2016) Diabetes and Alzheimer's disease crosstalk. *Neurosci Biobehav Rev* 64:272-287
31. 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. *Klin Wochenschr* 62:1086-1090
32. 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
33. Banks RE, Aiton JF, Naylor GJ, Cramb G, Wright AF, Griffith RC, Reich T (1989) Cation transport in lymphoblastoid cell lines established from bipolar manic-depressive patients. *J Affect Disord* 16:259-267
34. Barbarawi M, Kheiri B, Zayed Y, Barbarawi O, Dhillon H, Swaid B, Yelangi A, Sundus S, Bachuwa G, Alkotob ML, Manson JE (2019) Vitamin D Supplementation and Cardiovascular Disease Risks in More Than 83000 Individuals in 21 Randomized Clinical Trials: A Meta-analysis. *JAMA Cardiol* 4:765-776
35. Barbarawi M, Zayed Y, Barbarawi O, Bala A, Alabdouh A, Gakhal I, Rizk F, Alkasasbeh M, Bachuwa G, Manson JE (2020) Effect of Vitamin D Supplementation on the Incidence of Diabetes Mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 105
36. Barnett K, Mercer SW, Norbury M, Watt G, Wyke S, Guthrie B (2012) Epidemiology of multimorbidity and implications for health care, research, and medical education: a cross-sectional study. *Lancet* 380:37-43
37. Barzilay JI, Gao P, O'Donnell M, Mann JF, Anderson C, Fagard R, Probstfield J, Dagenais GR, Teo K, Yusuf S, Ontarget, Investigators T (2011) Albuminuria and decline in cognitive function: The ONTARGET/TRANSCEND studies. *Arch Intern Med* 171:142-150
38. 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. *Alzheimers Dement* 11:718-726
39. Bekris LM, Yu CE, Bird TD, Tsuang DW (2010) Genetics of Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 23:213-227
40. Benedik E (2022) Sources of vitamin D for humans. *Int J Vitam Nutr Res* 92:118-125
41. Berridge MJ (2017) Vitamin D deficiency and diabetes. *Biochem J* 474:1321-1332
42. Bertram L, McQueen MB, Mullin K, Blacker D, Tanzi RE (2007) Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nat Genet* 39:17-23
43. Beydoun MA, Hossain S, Fanelli-Kuczmarski MT, Beydoun HA, Canas JA, Evans MK, Zonderman AB (2018) Vitamin D Status and Intakes and Their Association With Cognitive Trajectory in a Longitudinal Study of Urban Adults. *J Clin Endocrinol Metab* 103:1654-1668
44. Bikle DD (2000). Vitamin D: Production, Metabolism and Mechanisms of Action. In Endotext, Feingold KR, B Anawalt, MR Blackman, A Boyce, G Chrousos, E Corpas, WW de Herder, K Dhatariya, K Dungan, J Hofland, *et al.*, eds. (South Dartmouth (MA)).

45. Bild W, Vasincu A, Rusu RN, Ababei DC, Stana AB, Stanciu GD, Savu B, Bild V (2022) Impact of the Renin-Angiotensin System on the Pathogeny and Pharmacotherapeutics of Neurodegenerative Diseases. *Biomolecules* 12
46. Bilezikian JP, Formenti AM, Adler RA, Binkley N, Bouillon R, Lazaretti-Castro M, Marcocci C, Napoli N, Rizzoli R, Giustina A (2021) Vitamin D: Dosing, levels, form, and route of administration: Does one approach fit all? *Rev Endocr Metab Disord* 22:1201-1218
47. Binderup L (1993) Comparison of calcipotriol with selected metabolites and analogues of vitamin D<sub>3</sub>: effects on cell growth regulation in vitro and calcium metabolism in vivo. *Pharmacol Toxicol* 72:240-244
48. Bischoff-Ferrari HA, Willett WC, Orav EJ, Lips P, Meunier PJ, Lyons RA, Flicker L, Wark J, Jackson RD, Cauley JA, Meyer HE, Pfeifer M, Sanders KM, Stahelin HB, Theiler R, Dawson-Hughes B (2012) A pooled analysis of vitamin D dose requirements for fracture prevention. *N Engl J Med* 367:40-49
49. Bollerslev J, Rejnmark L, Marcocci C, Shoback DM, Sitges-Serra A, van Biesen W, Dekkers OM, European Society of E (2015) European Society of Endocrinology Clinical Guideline: Treatment of chronic hypoparathyroidism in adults. *Eur J Endocrinol* 173:G1-20
50. Borel P, Caillaud D, Cano NJ (2015) Vitamin D bioavailability: state of the art. *Crit Rev Food Sci Nutr* 55:1193-1205
51. Bouillon R, Okamura WH, Norman AW (1995) Structure-function relationships in the vitamin D endocrine system. *Endocr Rev* 16:200-257
52. Bouillon R, Antonio L, Olarte OR (2022a) Calcifediol (25OH Vitamin D(3)) Deficiency: A Risk Factor from Early to Old Age. *Nutrients* 14
53. Bouillon R, Manousaki D, Rosen C, Trajanoska K, Rivadeneira F, Richards JB (2022b) The health effects of vitamin D supplementation: evidence from human studies. *Nat Rev Endocrinol* 18:96-110
54. Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82:239-259
55. Braak H, Alafuzoff I, Arzberger T, Kretschmar H, Del Tredici K (2006) Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol* 112:389-404
56. Bradburn S, Murgatroyd C, Ray N (2019) Neuroinflammation in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: A meta-analysis. *Ageing Res Rev* 50:1-8
57. Breijyeh Z, Karaman R (2020) Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules* 25
58. 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. *J Neurosci* 21:98-108
59. Brewer LD, Porter NM, Kerr DS, Landfield PW, Thibault O (2006) Chronic 1alpha,25-(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> treatment reduces Ca<sup>2+</sup>-mediated hippocampal biomarkers of aging. *Cell Calcium* 40:277-286

60. 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
61. Brogan M, Astor BC, Melamed ML (2020) Vitamin D in chronic kidney disease: is there a role outside of PTH control? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 29:243-247
62. Brorson JR, Bindokas VP, Iwama T, Marcuccilli CJ, Chisholm JC, Miller RJ (1995) The Ca<sup>2+</sup> influx induced by beta-amyloid peptide 25-35 in cultured hippocampal neurons results from network excitation. *J Neurobiol* 26:325-338
63. Brown AJ, Dusso A, Slatopolsky E (1999) Vitamin D. *Am J Physiol* 277:F157-175
64. Brown AJ (2001) Therapeutic uses of vitamin D analogues. *Am J Kidney Dis* 38:S3-S19
65. Buchman AS, Tanne D, Boyle PA, Shah RC, Leurgans SE, Bennett DA (2009) Kidney function is associated with the rate of cognitive decline in the elderly. *Neurology* 73:920-927
66. Bugnicourt JM, Godefroy O, Chillon JM, Choukroun G, Massy ZA (2013) Cognitive disorders and dementia in CKD: the neglected kidney-brain axis. *J Am Soc Nephrol* 24:353-363
67. Burg VK, Grimm HS, Rothhaar TL, Grosgen S, Hundsdorfer B, Hauptenthal VJ, Zimmer VC, Mett J, Weingartner O, Laufs U, Broersen LM, Tanila H, Vanmierlo T, Lutjohann D, Hartmann T, Grimm MO (2013) Plant sterols the better cholesterol in Alzheimer's disease? A mechanistical study. *J Neurosci* 33:16072-16087
68. Burg VK (2014) Sterine und die molekularen Mechanismen der APP-Prozessierung: Zusammenhänge und Implikationen für die Alzheimer Krankheit.
69. Burke RR, Rybicki BA, Rao DS (2010) Calcium and vitamin D in sarcoidosis: how to assess and manage. *Semin Respir Crit Care Med* 31:474-484
70. Burns A, Jacoby R, Luthert P, Levy R (1990) Cause of death in Alzheimer's disease. *Age Ageing* 19:341-344
71. Cacabelos R, Alvarez XA, Fernandez-Novoa L, Franco A, Manges R, Pellicer A, Nishimura T (1994) Brain interleukin-1 beta in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 16:141-151
72. Camara AB, de Souza ID, Dalmolin RJS (2018) Sunlight Incidence, Vitamin D Deficiency, and Alzheimer's Disease. *J Med Food* 21:841-848
73. Caniggia A, Lore F, di Cairano G, Nuti R (1987) Main endocrine modulators of vitamin D hydroxylases in human pathophysiology. *J Steroid Biochem* 27:815-824
74. Cao L, Tan L, Wang HF, Jiang T, Zhu XC, Lu H, Tan MS, Yu JT (2016) Dietary Patterns and Risk of Dementia: a Systematic Review and Meta-Analysis of Cohort Studies. *Mol Neurobiol* 53:6144-6154
75. Carbone MG, Pagni G, Tagliarini C, Marazziti D, Pomara N (2021) Platelet APP Processing: Is It a Tool to Explore the Pathophysiology of Alzheimer's Disease? A Systematic Review. *Life (Basel)* 11
76. Carlberg C (2019) Nutrigenomics of Vitamin D. *Nutrients* 11

77. Carvalho AC, Santos NC, Portugal-Nunes C, Castanho TC, Moreira P, Costa PS, Sousa N, Palha JA (2019) 25-OH Vitamin D Levels and Cognitive Performance: Longitudinal Assessment in a Healthy Aging Cohort. *Front Aging Neurosci* 11:330
78. Chai B, Gao F, Wu R, Dong T, Gu C, Lin Q, Zhang Y (2019) Vitamin D deficiency as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease: an updated meta-analysis. *BMC Neurol* 19:284
79. Chanakul A, Zhang MY, Louw A, Armbrecht HJ, Miller WL, Portale AA, Perwad F (2013) FGF-23 regulates CYP27B1 transcription in the kidney and in extra-renal tissues. *PLoS One* 8:e72816
80. Charoenngam N, Shirvani A, Holick MF (2019) Vitamin D for skeletal and non-skeletal health: What we should know. *J Clin Orthop Trauma* 10:1082-1093
81. Chen GF, Xu TH, Yan Y, Zhou YR, Jiang Y, Melcher K, Xu HE (2017) Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacol Sin* 38:1205-1235
82. Chen H, Xue W, Li J, Fu K, Shi H, Zhang B, Teng W, Tian L (2018) 25-Hydroxyvitamin D Levels and the Risk of Dementia and Alzheimer's Disease: A Dose-Response Meta-Analysis. *Front Aging Neurosci* 10:368
83. Chen W, Roncal-Jimenez C, Lanaspá M, Gerard S, Chonchol M, Johnson RJ, Jalal D (2014) Uric acid suppresses 1 alpha hydroxylase in vitro and in vivo. *Metabolism* 63:150-160
84. Cherry JD, Olschowka JA, O'Banion MK (2015) Arginase 1+ microglia reduce Aβ plaque deposition during IL-1β-dependent neuroinflammation. *J Neuroinflammation* 12:203
85. Chi Y, Sun J, Pang L, Jiajue R, Jiang Y, Wang O, Li M, Xing X, Hu Y, Zhou X, Meng X, Xia W (2019) Mutation update and long-term outcome after treatment with active vitamin D<sub>3</sub> in Chinese patients with pseudovitamin D-deficiency rickets (PDDR). *Osteoporos Int* 30:481-489
86. Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G (2016) Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiol Rev* 96:365-408
87. Chu CS, Tseng PT, Stubbs B, Chen TY, Tang CH, Li DJ, Yang WC, Chen YW, Wu CK, Veronese N, Carvalho AF, Fernandes BS, Herrmann N, Lin PY (2018) Use of statins and the risk of dementia and mild cognitive impairment: A systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 8:5804
88. Chun RF, Liu PT, Modlin RL, Adams JS, Hewison M (2014) Impact of vitamin D on immune function: lessons learned from genome-wide analysis. *Front Physiol* 5:151
89. Cianferotti L, Cricelli C, Kanis JA, Nuti R, Reginster JY, Ringe JD, Rizzoli R, Brandi ML (2015) The clinical use of vitamin D metabolites and their potential developments: a position statement from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO) and the International Osteoporosis Foundation (IOF). *Endocrine* 50:12-26
90. Citron M, Westaway D, Xia W, Carlson G, Diehl T, Levesque G, Johnson-Wood K, Lee M, Seubert P, Davis A, Kholodenko D, Motter R, Sherrington R, Perry B, Yao H, Strome R, Lieberburg I, Rommens J, Kim S, Schenk D, Fraser P, St George Hyslop P, Selkoe DJ (1997) Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat Med* 3:67-72
91. Cline EN, Bicca MA, Viola KL, Klein WL (2018) The Amyloid-beta Oligomer Hypothesis: Beginning of the Third Decade. *J Alzheimers Dis* 64:S567-S610

92. Colman RW (1986) Platelet activation: role of an ADP receptor. *Semin Hematol* 23:119-128
93. Costa RM, Honjo T, Silva AJ (2003) Learning and memory deficits in Notch mutant mice. *Curr Biol* 13:1348-1354
94. Coupland CAC, Hill T, Denning T, Morriss R, Moore M, Hippisley-Cox J (2019) Anticholinergic Drug Exposure and the Risk of Dementia: A Nested Case-Control Study. *JAMA Intern Med* 179:1084-1093
95. Creavin ST, Wisniewski S, Noel-Storr AH, Trevelyan CM, Hampton T, Rayment D, Thom VM, Nash KJ, Elhamoui H, Milligan R, Patel AS, Tsivos DV, Wing T, Phillips E, Kellman SM, Shackleton HL, Singleton GF, Neale BE, Watton ME, Cullum S (2016) Mini-Mental State Examination (MMSE) for the detection of dementia in clinically unevaluated people aged 65 and over in community and primary care populations. *Cochrane Database Syst Rev*:CD011145
96. Cui X, Gooch H, Petty A, McGrath JJ, Eyles D (2017) Vitamin D and the brain: Genomic and non-genomic actions. *Mol Cell Endocrinol* 453:131-143
97. D'Andrea L, Stringhi R, Di Luca M, Marcello E (2021) Looking at Alzheimer's Disease Pathogenesis from the Nuclear Side. *Biomolecules* 11
98. De Ferrari GV, Canales MA, Shin I, Weiner LM, Silman I, Inestrosa NC (2001) A structural motif of acetylcholinesterase that promotes amyloid beta-peptide fibril formation. *Biochemistry* 40:10447-10457
99. 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
100. de Zeeuw D, Agarwal R, Amdahl M, Audhya P, Coyne D, Garimella T, Parving HH, Pritchett Y, Remuzzi G, Ritz E, Andress D (2010) Selective vitamin D receptor activation with paricalcitol for reduction of albuminuria in patients with type 2 diabetes (VITAL study): a randomised controlled trial. *Lancet* 376:1543-1551
101. Dean AJ, Bellgrove MA, Hall T, Phan WM, Eyles DW, Kvaskoff D, McGrath JJ (2011) Effects of vitamin D supplementation on cognitive and emotional functioning in young adults--a randomised controlled trial. *PLoS One* 6:e25966
102. Deb S, Reeves AA, Lafortune S (2020) Simulation of Physicochemical and Pharmacokinetic Properties of Vitamin D3 and Its Natural Derivatives. *Pharmaceuticals (Basel)* 13
103. Deckers K, Camerino I, van Boxtel MP, Verhey FR, Irving K, Brayne C, Kivipelto M, Starr JM, Yaffe K, de Leeuw PW, Kohler S (2017) Dementia risk in renal dysfunction: A systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Neurology* 88:198-208
104. DeLuca HF (2004) Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 80:1689S-1696S
105. Deutsche Alzheimer Gesellschaft e.V. (2021). Die Häufigkeit von Demenzerkrankungen
106. Deutsche Gesellschaft für Ernährung (2012). Ausgewählte Fragen und Antworten zu Vitamin D

107. Deutsche Gesellschaft für Neurologie DGfPuP, Psychosomatik und Nervenheilkunde, (2016) S3-Leitlinie Demenzen.
108. Dibaba DT (2019) Effect of vitamin D supplementation on serum lipid profiles: a systematic review and meta-analysis. *Nutr Rev* 77:890-902
109. Dislich B, Lichtenthaler SF (2012) The Membrane-Bound Aspartyl Protease BACE1: Molecular and Functional Properties in Alzheimer's Disease and Beyond. *Front Physiol* 3:8
110. Doody RS, Raman R, Farlow M, Iwatsubo T, Vellas B, Joffe S, Kieburtz K, He F, Sun X, Thomas RG, Aisen PS, Alzheimer's Disease Cooperative Study Steering C, Siemers E, Sethuraman G, Mohs R, Semagacestat Study G (2013) A phase 3 trial of semagacestat for treatment of Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 369:341-350
111. Doorduijn AS, Visser M, van de Rest O, Kester MI, de Leeuw FA, Boesveldt S, Fieldhouse JLP, van den Heuvel E, Teunissen CE, Scheltens P, van der Flier WM, de van der Schueren MAE (2019) Associations of AD Biomarkers and Cognitive Performance with Nutritional Status: The NUDAD Project. *Nutrients* 11
112. Dovey HF, John V, Anderson JP, Chen LZ, de Saint Andrieu P, Fang LY, Freedman SB, Folmer B, Goldbach E, Holsztynska EJ, Hu KL, Johnson-Wood KL, Kennedy SL, Kholodenko D, Knops JE, Latimer LH, Lee M, Liao Z, Lieberburg IM, Motter RN, Mutter LC, Nietz J, Quinn KP, Sacchi KL, Seubert PA, Shopp GM, Thorsett ED, Tung JS, Wu J, Yang S, Yin CT, Schenk DB, May PC, Altstiel LD, Bender MH, Boggs LN, Britton TC, Clemens JC, Czilli DL, Dieckman-McGinty DK, Droste JJ, Fuson KS, Gitter BD, Hyslop PA, Johnstone EM, Li WY, Little SP, Mabry TE, Miller FD, Audia JE (2001) Functional gamma-secretase inhibitors reduce beta-amyloid peptide levels in brain. *J Neurochem* 76:173-181
113. 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
114. Dusso AS, Negrea L, Gunawardhana S, Lopez-Hilker S, Finch J, Mori T, Nishii Y, Slatopolsky E, Brown AJ (1991) On the mechanisms for the selective action of vitamin D analogs. *Endocrinology* 128:1687-1692
115. Edwards DR, Handsley MM, Pennington CJ (2008) The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med* 29:258-289
116. Egan MF, Kost J, Voss T, Mukai Y, Aisen PS, Cummings JL, Tariot PN, Vellas B, van Dyck CH, Boada M, Zhang Y, Li W, Furtek C, Mahoney E, Harper Mozley L, Mo Y, Sur C, Michelson D (2019) Randomized Trial of Verubecestat for Prodromal Alzheimer's Disease. *N Engl J Med* 380:1408-1420
117. Erben RG, Bante U, Birner H, Stangassinger M (1997) 1alpha-hydroxyvitamin D2 partially dissociates between preservation of cancellous bone mass and effects on calcium homeostasis in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 60:449-456
118. Etgen T, Sander D, Bickel H, Sander K, Forstl H (2012) Vitamin D deficiency, cognitive impairment and dementia: a systematic review and meta-analysis. *Dement Geriatr Cogn Disord* 33:297-305
119. Ewendt F, Feger M, Foller M (2020) Role of Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23) and alphaKlotho in Cancer. *Front Cell Dev Biol* 8:601006

120. Eyles DW, Smith S, Kinobe R, Hewison M, McGrath JJ (2005) Distribution of the vitamin D receptor and 1 alpha-hydroxylase in human brain. *J Chem Neuroanat* 29:21-30
121. Fan YG, Guo T, Han XR, Liu JL, Cai YT, Xue H, Huang XS, Li YC, Wang ZY, Guo C (2019) Paricalcitol accelerates BACE1 lysosomal degradation and inhibits calpain-1 dependent neuronal loss in APP/PS1 transgenic mice. *EBioMedicine* 45:393-407
122. Ferreira-Vieira TH, Guimaraes IM, Silva FR, Ribeiro FM (2016) Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Curr Neuropharmacol* 14:101-115
123. Ferris S, Ihl R, Robert P, Winblad B, Gatz G, Tennigkeit F, Gauthier S (2009) Treatment effects of Memantine on language in moderate to severe Alzheimer's disease patients. *Alzheimers Dement* 5:369-374
124. Folch J, Petrov D, Ettcheto M, Abad S, Sanchez-Lopez E, Garcia ML, Olloquequi J, Beas-Zarate C, Auladell C, Camins A (2016) Current Research Therapeutic Strategies for Alzheimer's Disease Treatment. *Neural Plast* 2016:8501693
125. Forbes D, Forbes SC, Blake CM, Thiessen EJ, Forbes S (2015) Exercise programs for people with dementia. *Cochrane Database Syst Rev*:CD006489
126. Fraser DR, Kodicek E (1970) Unique biosynthesis by kidney of a biological active vitamin D metabolite. *Nature* 228:764-766
127. Fraser WD, Tang JCY, Dutton JJ, Schoenmakers I (2020) Vitamin D Measurement, the Debates Continue, New Analytes Have Emerged, Developments Have Variable Outcomes. *Calcif Tissue Int* 106:3-13
128. Frautschy SA, Cole GM, Baird A (1992) Phagocytosis and deposition of vascular beta-amyloid in rat brains injected with Alzheimer beta-amyloid. *Am J Pathol* 140:1389-1399
129. Freshney RI (2011) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*.
130. Freundlich M, Li YC, Quiroz Y, Bravo Y, Seecherunvong W, Faul C, Weisinger JR, Rodriguez-Iturbe B (2014) Paricalcitol downregulates myocardial renin-angiotensin and fibroblast growth factor expression and attenuates cardiac hypertrophy in uremic rats. *Am J Hypertens* 27:720-726
131. Fujii H, Nakai K, Yonekura Y, Kono K, Goto S, Hirata M, Shinohara M, Nishi S, Fukagawa M (2015) The Vitamin D Receptor Activator Maxacalcitol Provides Cardioprotective Effects in Diabetes Mellitus. *Cardiovasc Drugs Ther* 29:499-507
132. Fukumoto H, Cheung BS, Hyman BT, Irizarry MC (2002) Beta-secretase protein and activity are increased in the neocortex in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 59:1381-1389
133. Gabin JM, Romundstad S, Saltvedt I, Holmen J (2019) Moderately increased albuminuria, chronic kidney disease and incident dementia: the HUNT study. *BMC Nephrol* 20:261
134. Gall Z, Szekely O (2021) Role of Vitamin D in Cognitive Dysfunction: New Molecular Concepts and Discrepancies between Animal and Human Findings. *Nutrients* 13
135. Gallagher JC, Bishop CW, Knutson JC, Mazess RB, DeLuca HF (1994) Effects of increasing doses of 1 alpha-hydroxyvitamin D2 on calcium homeostasis in postmenopausal osteopenic women. *J Bone Miner Res* 9:607-614

136. Galo J, Celli D, Colombo R (2021) Effect of Sacubitril/Valsartan on Neurocognitive Function: Current Status and Future Directions. *Am J Cardiovasc Drugs* 21:267-270
137. Gebre AK, Altaye BM, Atey TM, Tuem KB, Berhe DF (2018) Targeting Renin-Angiotensin System Against Alzheimer's Disease. *Front Pharmacol* 9:440
138. Geng J, Zhang J, Yao F, Liu X, Liu J, Huang Y (2020) A systematic review and meta-analysis of the associations of vitamin D receptor genetic variants with two types of most common neurodegenerative disorders. *Aging Clin Exp Res* 32:21-27
139. German Nutrition S (2012) New reference values for vitamin D. *Ann Nutr Metab* 60:241-246
140. Gezen-Ak D, Dursun E, Ertan T, Hanagasi H, Gurvit H, Emre M, Eker E, Ozturk M, Engin F, Yilmazer S (2007) Association between vitamin D receptor gene polymorphism and Alzheimer's disease. *Tohoku J Exp Med* 212:275-282
141. Gezen-Ak D, Atasoy IL, Candas E, Alaylioglu M, Yilmazer S, Dursun E (2017) Vitamin D Receptor Regulates Amyloid Beta 1-42 Production with Protein Disulfide Isomerase A3. *ACS Chem Neurosci* 8:2335-2346
142. Ghafoor R, Patil A, Yamauchi P, Weinberg J, Kircik L, Grabbe S, Goldust M (2022) Treatment of Scalp Psoriasis. *J Drugs Dermatol* 21:833-837
143. Giakoumis M, Tsioufis C, Dimitriadis K, Sonikian M, Kasiakogias A, Andrikou E, Kalos T, Konstantinidis D, Filis K, Petras D, Tousoulis D (2019) Effects of oral paricalcitol therapy on arterial stiffness and osteopontin in hypertensive patients with chronic kidney disease and secondary hyperparathyroidism. *Hellenic J Cardiol* 60:108-113
144. Giovannucci E, Liu Y, Hollis BW, Rimm EB (2008) 25-hydroxyvitamin D and risk of myocardial infarction in men: a prospective study. *Arch Intern Med* 168:1174-1180
145. Girndt M, Trocchi P, Scheidt-Nave C, Markau S, Stang A (2016) The Prevalence of Renal Failure. Results from the German Health Interview and Examination Survey for Adults, 2008-2011 (DEGS1). *Dtsch Arztebl Int* 113:85-91
146. Girndt M (2017) [Diagnosis and treatment of chronic kidney disease]. *Internist (Berl)* 58:243-256
147. Giustina A, Adler RA, Binkley N, Bollerslev J, Bouillon R, Dawson-Hughes B, Ebeling PR, Feldman D, Formenti AM, Lazaretti-Castro M, Marcocci C, Rizzoli R, Sempos CT, Bilezikian JP (2020) Consensus statement from 2(nd) International Conference on Controversies in Vitamin D. *Rev Endocr Metab Disord* 21:89-116
148. Gleason CE, Zuelsdorff M, Gooding DC, Kind AJH, Johnson AL, James TT, Lambrou NH, Wyman MF, Ketchum FB, Gee A, Johnson SC, Bendlin BB, Zetterberg H (2022) Alzheimer's disease biomarkers in Black and non-Hispanic White cohorts: A contextualized review of the evidence. *Alzheimers Dement* 18:1545-1564
149. Goodwill AM, Szoeki C (2017) A Systematic Review and Meta-Analysis of The Effect of Low Vitamin D on Cognition. *J Am Geriatr Soc* 65:2161-2168
150. Goring H (2018) Vitamin D in Nature: A Product of Synthesis and/or Degradation of Cell Membrane Components. *Biochemistry (Mosc)* 83:1350-1357



151. Gosswald A, Lange M, Kamtsiuris P, Kurth BM (2012) [DEGS: German Health Interview and Examination Survey for Adults. A nationwide cross-sectional and longitudinal study within the framework of health monitoring conducted by the Robert Koch Institute]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 55:775-780
152. Grimes DS (2006) Are statins analogues of vitamin D? *Lancet* 368:83-86
153. Grimm MO, Lehmann J, Mett J, Zimmer VC, Grosgen S, Stahlmann CP, Hundsdorfer B, Hauptenthal VJ, Rothhaar TL, Herr C, Bals R, Grimm HS, Hartmann T (2014) Impact of Vitamin D on amyloid precursor protein processing and amyloid-beta peptide degradation in Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis* 13:75-81
154. Grimm MO, Mett J, Hartmann T (2016) The Impact of Vitamin E and Other Fat-Soluble Vitamins on Alzheimer s Disease. *Int J Mol Sci* 17
155. Grimm MOW, Lauer AA, Grosgen S, Thiel A, Lehmann J, Winkler J, Janitschke D, Herr C, Beisswenger C, Bals R, Grimm HS, Hartmann T (2019) Profiling of Alzheimer's disease related genes in mild to moderate vitamin D hypovitaminosis. *J Nutr Biochem* 67:123-137
156. Groot C, Hooghiemstra AM, Raijmakers PG, van Berckel BN, Scheltens P, Scherder EJ, van der Flier WM, Ossenkoppele R (2016) The effect of physical activity on cognitive function in patients with dementia: A meta-analysis of randomized control trials. *Ageing Res Rev* 25:13-23
157. Grösgen S (2013) Der Einfluss der intrazellulären APP-Domäne und von Lipiden auf die Alzheimer Krankheit, Universität des Saarlandes.
158. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS, Wisniewski HM (1986) Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* 261:6084-6089
159. Gunville CF, Mourani PM, Ginde AA (2013) The role of vitamin D in prevention and treatment of infection. *Inflamm Allergy Drug Targets* 12:239-245
160. Haapasalo A, Kovacs DM (2011) The many substrates of presenilin/gamma-secretase. *J Alzheimers Dis* 25:3-28
161. Haass C (2004) Take five--BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *EMBO J* 23:483-488
162. Hackl D, Kossack N, Schoenfelder T (2021) [Prevalence, Costs of Medical Treatment and Modalities of Dialysis-dependent Chronic Renal Failure in Germany: Comparison of Dialysis Care of Nursing Home Residents and in Outpatient Units]. *Gesundheitswesen* 83:818-828
163. Hampel H, Hardy J, Blennow K, Chen C, Perry G, Kim SH, Villemagne VL, Aisen P, Vendruscolo M, Iwatsubo T, Masters CL, Cho M, Lannfelt L, Cummings JL, Vergallo A (2021) The Amyloid-beta Pathway in Alzheimer's Disease. *Mol Psychiatry* 26:5481-5503
164. Hebert LE, Bienias JL, Aggarwal NT, Wilson RS, Bennett DA, Shah RC, Evans DA (2010) Change in risk of Alzheimer disease over time. *Neurology* 75:786-791
165. Helmer C, Stengel B, Metzger M, Froissart M, Massy ZA, Tzourio C, Berr C, Dartigues JF (2011) Chronic kidney disease, cognitive decline, and incident dementia: the 3C Study. *Neurology* 77:2043-2051

166. Heneka MT, Carson MJ, El Khoury J, 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. *Lancet Neurol* 14:388-405
167. Henley DB, Sundell KL, Sethuraman G, Dowsett SA, May PC (2014) Safety profile of semagacestat, a gamma-secretase inhibitor: IDENTITY trial findings. *Curr Med Res Opin* 30:2021-2032
168. Hitt BD, Jaramillo TC, Chetkovich DM, Vassar R (2010) BACE1<sup>-/-</sup> mice exhibit seizure activity that does not correlate with sodium channel level or axonal localization. *Mol Neurodegener* 5:31
169. Holick MF (1995) Environmental factors that influence the cutaneous production of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 61:638S-645S
170. Holick MF (2007) Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 357:266-281
171. Hooshmand B, Lökk J, Solomon A, Mangialasche F, Miralbell J, Spulber G, Annerbo S, Andreassen N, Winblad B, Cedazo-Minguez A, Wahlund LO, Kivipelto M (2014) Vitamin D in relation to cognitive impairment, cerebrospinal fluid biomarkers, and brain volumes. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 69:1132-1138
172. Howard R, Zubko O, Bradley R, Harper E, Pank L, O'Brien J, Fox C, Tabet N, Livingston G, Bentham P, McShane R, Burns A, Ritchie C, Reeves S, Lovestone S, Ballard C, Noble W, Nilforooshan R, Wilcock G, Gray R, Minocycline in Alzheimer Disease Efficacy Trialist G (2020) Minocycline at 2 Different Dosages vs Placebo for Patients With Mild Alzheimer Disease: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurol* 77:164-174
173. Hu X, He W, Luo X, Tsubota KE, Yan R (2013) BACE1 regulates hippocampal astrogenesis via the Jagged1-Notch pathway. *Cell Rep* 4:40-49
174. Hu X, Shang J, Yuan W, Zhang S, Jiang Y, Zhao B, Duan Y, Xiao J, Zhao Z (2018) Effects of paricalcitol on cardiovascular outcomes and renal function in patients with chronic kidney disease : A meta-analysis. *Herz* 43:518-528
175. Hur JY (2022) gamma-Secretase in Alzheimer's disease. *Exp Mol Med* 54:433-446
176. Hynd MR, Scott HL, Dodd PR (2004) Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 45:583-595
177. Ida N, Hartmann T, Pantel J, Schroder J, Zerfass R, Forstl 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. *J Biol Chem* 271:22908-22914
178. Imbimbo BP, Giardina GA (2011) gamma-secretase inhibitors and modulators for the treatment of Alzheimer's disease: disappointments and hopes. *Curr Top Med Chem* 11:1555-1570
179. IQWiG-Bericht (2007) Cholinesterasehemmer bei. Abschlussbericht Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen 17
180. IQWiG-Bericht (2011) Responderanalysen zu Memantin bei Alzheimer Demenz.

181. Ito S, Ohtsuki S, Nezu Y, Koitabashi Y, Murata S, Terasaki T (2011) 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> enhances cerebral clearance of human amyloid-beta peptide(1-40) from mouse brain across the blood-brain barrier. *Fluids Barriers CNS* 8:20
182. Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Shirotani K, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Hama E, Lee HJ, Saido TC (2001) Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin. *Science* 292:1550-1552
183. Jansen WJ, Ossenkuppele R, Knol DL, Tijms BM, Scheltens P, Verhey FR, Visser PJ, Amyloid Biomarker Study G, Aalten P, Aarsland D, Alcolea D, Alexander M, Almdahl IS, Arnold SE, Baldeiras I, Barthel H, van Berckel BN, Bibeau K, Blennow K, Brooks DJ, van Buchem MA, Camus V, Cavado E, Chen K, Chetelat G, Cohen AD, Drzezga A, Engelborghs S, Fagan AM, Fladby T, Fleisher AS, van der Flier WM, Ford L, Forster S, Fortea J, Foskett N, Frederiksen KS, Freund-Levi Y, Frisoni GB, Froelich L, Gabryelewicz T, Gill KD, Gkatzima O, Gomez-Tortosa E, Gordon MF, Grimmer T, Hampel H, Hausner L, Hellwig S, Herukka SK, Hildebrandt H, Ishihara L, Ivanoiu A, Jagust WJ, Johannsen P, Kandimalla R, Kapaki E, Klimkowicz-Mrowiec A, Klunk WE, Kohler S, Koglin N, Kornhuber J, Kramberger MG, Van Laere K, Landau SM, Lee DY, de Leon M, Lisetti V, Lleo A, Madsen K, Maier W, Marcusson J, Mattsson N, de Mendonca A, Meulenbroek O, Meyer PT, Mintun MA, Mok V, Molinuevo JL, Mollergard HM, Morris JC, Mroczko B, Van der Mussele S, Na DL, Newberg A, Nordberg A, Nordlund A, Novak GP, Paraskevas GP, Parnetti L, Perera G, Peters O, Popp J, Prabhakar S, Rabinovici GD, Ramakers IH, Rami L, Resende de Oliveira C, Rinne JO, Rodrigue KM, Rodriguez-Rodriguez E, Roe CM, Rot U, Rowe CC, Ruther E, Sabri O, Sanchez-Juan P, Santana I, Sarazin M, Schroder J, Schutte C, Seo SW, Soetewey F, Soininen H, Spuru L, Struyfs H, Teunissen CE, Tsolaki M, Vandenberghe R, Verbeek MM, Villemagne VL, Vos SJ, van Waalwijk van Doorn LJ, Waldemar G, Wallin A, Wallin AK, Wiltfang J, Wolck DA, Zboch M, Zetterberg H (2015) Prevalence of cerebral amyloid pathology in persons without dementia: a meta-analysis. *JAMA* 313:1924-1938
184. Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT, Jr. (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
185. Jayedi A, Rashidy-Pour A, Shab-Bidar S (2019) Vitamin D status and risk of dementia and Alzheimer's disease: A meta-analysis of dose-response (dagger). *Nutr Neurosci* 22:750-759
186. Jia J, Hu J, Huo X, Miao R, Zhang Y, Ma F (2019) Effects of vitamin D supplementation on cognitive function and blood Abeta-related biomarkers in older adults with Alzheimer's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 90:1347-1352
187. Jiang P, Zhang LH, Cai HL, Li HD, Liu YP, Tang MM, Dang RL, Zhu WY, Xue Y, He X (2014) Neurochemical effects of chronic administration of calcitriol in rats. *Nutrients* 6:6048-6059
188. Johansson P, Almqvist EG, Johansson JO, Mattsson N, Andreasson U, Hansson O, Wallin A, Blennow K, Zetterberg H, Svensson J (2013) Cerebrospinal fluid (CSF) 25-hydroxyvitamin D concentration and CSF acetylcholinesterase activity are reduced in patients with Alzheimer's disease. *PLoS One* 8:e81989
189. Johnson AG, Marshall CE (1976) Proceedings: The effect of cholecystectomy on serum cholecystokinin bioactivity. *Br J Surg* 63:153-154
190. Johnson JW, Kotermanski SE (2006) Mechanism of action of memantine. *Curr Opin Pharmacol* 6:61-67
191. Jones G, Strugnell SA, DeLuca HF (1998) Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiol Rev* 78:1193-1231

192. Jones G, Prosser DE, Kaufmann M (2014) Cytochrome P450-mediated metabolism of vitamin D. *J Lipid Res* 55:13-31
193. Jonsson T, Atwal JK, Steinberg S, Snaedal J, Jonsson PV, Bjornsson S, Stefansson H, Sulem P, Gudbjartsson D, Maloney J, Hoyte K, Gustafson A, Liu Y, Lu Y, Bhangale T, Graham RR, Huttenlocher J, Bjornsdottir G, Andreassen OA, Jonsson EG, Palotie A, Behrens TW, Magnusson OT, Kong A, Thorsteinsdottir U, Watts RJ, Stefansson K (2012) A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature* 488:96-99
194. Jorde R, Kubiak J, Svartberg J, Fuskevåg OM, Figenschau Y, Martinaityte I, Grimnes G (2019) Vitamin D supplementation has no effect on cognitive performance after four months in mid-aged and older subjects. *J Neurol Sci* 396:165-171
195. Kabel A, Abd Elmaaboud M, Ashour A (2019) Ameliorative potential of sitagliptin and/or calcipotriol on lipopolysaccharide-induced Alzheimer's disease. *Bulletin of Egyptian Society for Physiological Sciences* 39:191-203
196. Kajta M, Makarewicz D, Zieminska E, Jantas D, Domin H, Lason W, Kutner A, Lazarewicz JW (2009) Neuroprotection by co-treatment and post-treating with calcitriol following the ischemic and excitotoxic insult in vivo and in vitro. *Neurochem Int* 55:265-274
197. Kalra A, Teixeira AL, Diniz BS (2020) Association of Vitamin D Levels with Incident All-Cause Dementia in Longitudinal Observational Studies: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Prev Alzheimers Dis* 7:14-20
198. Kang J, Park M, Lee E, Jung J, Kim T (2022) The Role of Vitamin D in Alzheimer's Disease: A Transcriptional Regulator of Amyloidopathy and Gliopathy. *Biomedicines* 10
199. Kao YC, Ho PC, Tu YK, Jou IM, Tsai KJ (2020) Lipids and Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* 21
200. Kelleher RJ, 3rd, Shen J (2017) Presenilin-1 mutations and Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:629-631
201. Kesby JP, Cui X, Ko P, McGrath JJ, Burne TH, Eyles DW (2009) Developmental vitamin D deficiency alters dopamine turnover in neonatal rat forebrain. *Neurosci Lett* 461:155-158
202. Kesby JP, Cui X, O'Loan J, McGrath JJ, Burne TH, Eyles DW (2010) Developmental vitamin D deficiency alters dopamine-mediated behaviors and dopamine transporter function in adult female rats. *Psychopharmacology (Berl)* 208:159-168
203. Kim DH, Brown RT, Ding EL, Kiel DP, Berry SD (2011) Dementia medications and risk of falls, syncope, and related adverse events: meta-analysis of randomized controlled trials. *J Am Geriatr Soc* 59:1019-1031
204. Kim G, Sprague SM (2002) Use of vitamin D analogs in chronic renal failure. *Adv Ren Replace Ther* 9:175-183
205. Kimberly WT, LaVoie MJ, Ostaszewski BL, Ye W, Wolfe MS, Selkoe DJ (2003) Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:6382-6387
206. Kissmeyer A, Mathiasen IS, Latini S, Binderup L (1995) Pharmacokinetic studies of vitamin D analogues: relationship to vitamin D binding protein (DBP). *Endocrine* 3:263-266

207. Kitazawa M, Cheng D, Tsukamoto MR, Koike MA, Wes PD, Vasilevko V, Cribbs DH, LaFerla FM (2011) Blocking IL-1 signaling rescues cognition, attenuates tau pathology, and restores neuronal beta-catenin pathway function in an Alzheimer's disease model. *J Immunol* 187:6539-6549
208. Knutson JC, LeVan LW, Valliere CR, Bishop CW (1997) Pharmacokinetics and systemic effect on calcium homeostasis of 1 alpha,24-dihydroxyvitamin D2 in rats. Comparison with 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D2, calcitriol, and calcipotriol. *Biochem Pharmacol* 53:829-837
209. Ko SH, Kim HS (2020) Menopause-Associated Lipid Metabolic Disorders and Foods Beneficial for Postmenopausal Women. *Nutrients* 12
210. Kogon AJ, Harshman LA (2019) Chronic Kidney Disease: Treatment of Comorbidities I: (Nutrition, Growth, Neurocognitive Function, and Mineral Bone Disease). *Curr Treat Options Pediatr* 5:78-92
211. Kontomanolis EN, Kalagasidou S, Pouliliou S, Anthoulaki X, Georgiou N, Papamanolis V, Fasoulakis ZN (2018) The Notch Pathway in Breast Cancer Progression. *ScientificWorldJournal* 2018:2415489
212. Kovacs GG, Gelpi E (2012) Clinical neuropathology practice news 3-2012: the "ABC" in AD-revised and updated guideline for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Clin Neuropathol* 31:116-118
213. Krajisnik T, Bjorklund P, Marsell R, Ljunggren O, Akerstrom G, Jonsson KB, Westin G, Larsson TE (2007) Fibroblast growth factor-23 regulates parathyroid hormone and 1alpha-hydroxylase expression in cultured bovine parathyroid cells. *J Endocrinol* 195:125-131
214. Krashia P, Nobili A, D'Amelio M (2019) Unifying Hypothesis of Dopamine Neuron Loss in Neurodegenerative Diseases: Focusing on Alzheimer's Disease. *Front Mol Neurosci* 12:123
215. Kuchenbecker J (2011) Docohexaensäure und Plasmalogene in der Alzheimer Krankheit, Universität des Saarlandes.
216. Kuchulakanti PK, Chaudhuri JR, Annad U, Samala NR, Tallapaneni L, Balaraju B, Bandaru VS (2020) Association of serum 25-hydroxyvitamin D levels with primary hypertension: a study from south India. *Hypertens Res* 43:389-395
217. Kueider AM, Tanaka T, An Y, Kitner-Triolo MH, Palchamy E, Ferrucci L, Thambisetty M (2016) State- and trait-dependent associations of vitamin-D with brain function during aging. *Neurobiol Aging* 39:38-45
218. 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
219. Kuhn PH, Koroniak K, Hogg S, Colombo A, Zeitschel U, Willem M, Volbracht C, Schepers U, Imhof A, Hoffmeister A, Haass C, Rossner S, Brase S, Lichtenthaler SF (2012) Secretome protein enrichment identifies physiological BACE1 protease substrates in neurons. *EMBO J* 31:3157-3168
220. Kulmala J, Ngandu T, Kivipelto M (2018) Prevention Matters: Time for Global Action and Effective Implementation. *J Alzheimers Dis* 64:S191-S198

221. Kuzma E, Hannon E, Zhou A, Lourida I, Bethel A, Levine DA, Lunnon K, Thompson-Coon J, Hypponen E, Llewellyn DJ (2018) Which Risk Factors Causally Influence Dementia? A Systematic Review of Mendelian Randomization Studies. *J Alzheimers Dis* 64:181-193
222. Lai RH, Hsu CC, Yu BH, Lo YR, Hsu YY, Chen MH, Juang JL (2022) Vitamin D supplementation worsens Alzheimer's progression: Animal model and human cohort studies. *Aging Cell* 21:e13670
223. Laird FM, Cai H, Savonenko AV, Farah MH, He K, Melnikova T, Wen H, Chiang HC, Xu G, Koliatsos VE, Borchelt DR, Price DL, Lee HK, Wong PC (2005) BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid-beta amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions. *J Neurosci* 25:11693-11709
224. Lam M, Mast N, Pikuleva IA (2018) Drugs and Scaffold That Inhibit Cytochrome P450 27A1 In Vitro and In Vivo. *Mol Pharmacol* 93:101-108
225. Lambert JC, Amouyel P (2011) Genetics of Alzheimer's disease: new evidences for an old hypothesis? *Curr Opin Genet Dev* 21:295-301
226. Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasionowski M, Haass C, Fahrenholz F (1999) Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3922-3927
227. Lanctot KL, Herrmann N, Yau KK, Khan LR, Liu BA, LouLou MM, Einarson TR (2003) Efficacy and safety of cholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease: a meta-analysis. *CMAJ* 169:557-564
228. Lauer AA, Griebisch LV, Pilz SM, Janitschke D, Theiss EL, Reichrath J, Herr C, Beisswenger C, Bals R, Valencak TG, Portius D, Grimm HS, Hartmann T, Grimm MOW (2021) Impact of Vitamin D3 Deficiency on Phosphatidylcholine-/Ethanolamine, Plasmalogen-, Lyso-Phosphatidylcholine-/Ethanolamine, Carnitine- and Triacyl Glyceride-Homeostasis in Neuroblastoma Cells and Murine Brain. *Biomolecules* 11
229. Lauer AA, Grimm HS, Apel B, Golobrodska N, Kruse L, Ratanski E, Schulten N, Schwarze L, Slawik T, Sperlich S, Vohla A, Grimm MOW (2022) Mechanistic Link between Vitamin B12 and Alzheimer's Disease. *Biomolecules* 12
230. Lautenschlager NT, Cox KL, Flicker L, Foster JK, van Bockxmeer FM, Xiao J, Greenop KR, Almeida OP (2008) Effect of physical activity on cognitive function in older adults at risk for Alzheimer disease: a randomized trial. *JAMA* 300:1027-1037
231. Lee WJ, Liao YC, Wang YF, Lin YS, Wang SJ, Fuh JL (2020) Summative Effects of Vascular Risk Factors on the Progression of Alzheimer Disease. *J Am Geriatr Soc* 68:129-136
232. Lee YH, Kim JH, Song GG (2014) Vitamin D receptor polymorphisms and susceptibility to Parkinson's disease and Alzheimer's disease: a meta-analysis. *Neurol Sci* 35:1947-1953
233. Lehmann DJ, Refsum H, Warden DR, Medway C, Wilcock GK, Smith AD (2011) The vitamin D receptor gene is associated with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 504:79-82
234. Lehmann J (2018) Vitamin D und die Alzheimer-Krankheit - Der Einfluss von Vitamin D auf die Prozessierung des Amyloid-Vorläufer-Proteins und die A $\beta$ -Degradation, Universität des Saarlandes.

235. Leng F, Edison P (2021) Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? *Nat Rev Neurol* 17:157-172
236. Lennon MJ, Koncz R, Sachdev PS (2021) Hypertension and Alzheimer's disease: is the picture any clearer? *Curr Opin Psychiatry* 34:142-148
237. Lewis HD, Perez Revuelta BI, Nadin A, Neduvilil JG, Harrison T, Pollack SJ, Shearman MS (2003) Catalytic site-directed gamma-secretase complex inhibitors do not discriminate pharmacologically between Notch S3 and beta-APP cleavages. *Biochemistry* 42:7580-7586
238. Leysens C, Verlinden L, Verstuyf A (2014) The future of vitamin D analogs. *Front Physiol* 5:122
239. Li B, Zhou M, Peng J, Yang Q, Chu J, Li R, Jiang Y (2022) Mechanism of the Fibroblast Growth Factor 23/alpha-Klotho Axis in Peripheral Blood Mononuclear Cell Inflammation in Alzheimer's Disease. *Immunol Invest* 51:1471-1484
240. Li YC (2003) Vitamin D regulation of the renin-angiotensin system. *J Cell Biochem* 88:327-331
241. Lim ASP, Gaiteri C, Yu L, Sohail S, Swardfager W, Tasaki S, Schneider JA, Paquet C, Stuss DT, Masellis M, Black SE, Hugon J, Buchman AS, Barnes LL, Bennett DA, De Jager PL (2018) Seasonal plasticity of cognition and related biological measures in adults with and without Alzheimer disease: Analysis of multiple cohorts. *PLoS Med* 15:e1002647
242. Lima LAR, Lopes MJP, Costa RO, Lima FAV, Neves KRT, Calou IBF, Andrade GM, Viana GSB (2018) Vitamin D protects dopaminergic neurons against neuroinflammation and oxidative stress in hemiparkinsonian rats. *J Neuroinflammation* 15:249
243. Lind L, Wengle B, Wide L, Sorensen OH, Ljunghall S (1988) Hypertension in primary hyperparathyroidism--reduction of blood pressure by long-term treatment with vitamin D (alphacalcidol). A double-blind, placebo-controlled study. *Am J Hypertens* 1:397-402
244. Lind L, Pollare T, Hvarfner A, Lithell H, Sorensen OH, Ljunghall S (1989) Long-term treatment with active vitamin D (alphacalcidol) in middle-aged men with impaired glucose tolerance. Effects on insulin secretion and sensitivity, glucose tolerance and blood pressure. *Diabetes Res* 11:141-147
245. Liu Y, Liu LY, Jia Y, Wu MY, Sun YY, Ma FZ (2019) Efficacy and safety of paricalcitol in patients undergoing hemodialysis: a meta-analysis. *Drug Des Devel Ther* 13:999-1009
246. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408
247. Livingston G, Huntley J, Sommerlad A, Ames D, Ballard C, Banerjee S, Brayne C, Burns A, Cohen-Mansfield J, Cooper C, Costafreda SG, Dias A, Fox N, Gitlin LN, Howard R, Kales HC, Kivimaki M, Larson EB, Ogunniyi A, Orgeta V, Ritchie K, Rockwood K, Sampson EL, Samus Q, Schneider LS, Selbaek G, Teri L, Mukadam N (2020) Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. *Lancet* 396:413-446
248. Loera-Valencia R, Goikolea J, Parrado-Fernandez C, Merino-Serrais P, Maioli S (2019) Alterations in cholesterol metabolism as a risk factor for developing Alzheimer's disease: Potential novel targets for treatment. *J Steroid Biochem Mol Biol* 190:104-114

249. Loera-Valencia R, Eroli F, Garcia-Ptacek S, Maioli S (2021) Brain Renin-Angiotensin System as Novel and Potential Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* 22
250. Lopes da Silva S, Vellas B, Elemans S, Luchsinger J, Kamphuis P, Yaffe K, Sijben J, Groenendijk M, Stijnen T (2014) Plasma nutrient status of patients with Alzheimer's disease: Systematic review and meta-analysis. *Alzheimers Dement* 10:485-502
251. Lopez-Baena MT, Perez-Roncero GR, Perez-Lopez FR, Mezones-Holguin E, Chedraui P (2020) Vitamin D, menopause, and aging: quo vadis? *Climacteric* 23:123-129
252. Lowe KE, Maiyar AC, Norman AW (1992) Vitamin D-mediated gene expression. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2:65-109
253. Ludwig WMBSR (2021) *Arzneiverordnungs-Report 2021*.
254. Lung BE, Mowery ML, Komatsu DEE (2022). Calcitriol. In *StatPearls (Treasure Island (FL))*.
255. MacLaughlin J, Holick MF (1985) Aging decreases the capacity of human skin to produce vitamin D<sub>3</sub>. *J Clin Invest* 76:1536-1538
256. Maestro MA, Molnar F, Carlberg C (2019) Vitamin D and Its Synthetic Analogs. *J Med Chem* 62:6854-6875
257. Malham M, Peter Jorgensen S, Lauridsen AL, Ott P, Glerup H, Dahlerup JF (2012) The effect of a single oral megadose of vitamin D provided as either ergocalciferol (D(2)) or cholecalciferol (D(3)) in alcoholic liver cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 24:172-178
258. Manson JE, Cook NR, Lee IM, Christen W, Bassuk SS, Mora S, Gibson H, Gordon D, Copeland T, D'Agostino D, Friedenberg G, Ridge C, Bubes V, Giovannucci EL, Willett WC, Buring JE, Group VR (2019) Vitamin D Supplements and Prevention of Cancer and Cardiovascular Disease. *N Engl J Med* 380:33-44
259. Manson JE, Bassuk SS, Cook NR, Lee IM, Mora S, Albert CM, Buring JE, Group VR (2020) Vitamin D, Marine n-3 Fatty Acids, and Primary Prevention of Cardiovascular Disease Current Evidence. *Circ Res* 126:112-128
260. Mansur JL, Oliveri B, Giacoia E, Fusaro D, Costanzo PR (2022) Vitamin D: Before, during and after Pregnancy: Effect on Neonates and Children. *Nutrients* 14
261. Marcello E, Epis R, Saraceno C, Gardoni F, Borroni B, Cattabeni F, Padovani A, Di Luca M (2012) SAP97-mediated local trafficking is altered in Alzheimer disease patients' hippocampus. *Neurobiol Aging* 33:422 e421-410
262. 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 D<sub>3</sub> interacts with curcuminoids to stimulate amyloid-beta clearance by macrophages of Alzheimer's disease patients. *J Alzheimers Dis* 17:703-717
263. Matousek SB, Ghosh S, Shaftel SS, Kyrkanides S, Olschowka JA, O'Banion MK (2012) Chronic IL-1beta-mediated neuroinflammation mitigates amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease without inducing overt neurodegeneration. *J Neuroimmune Pharmacol* 7:156-164
264. Mattson MP, Goodman Y (1995) Different amyloidogenic peptides share a similar mechanism of neurotoxicity involving reactive oxygen species and calcium. *Brain Res* 676:219-224



265. Matuszyk MM, Garwood CJ, Ferraiuolo L, Simpson JE, Staniforth RA, Wharton SB (2022) Biological and methodological complexities of beta-amyloid peptide: Implications for Alzheimer's disease research. *J Neurochem* 160:434-453
266. Maurya VK, Aggarwal M (2017) Factors influencing the absorption of vitamin D in GIT: an overview. *J Food Sci Technol* 54:3753-3765
267. 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
268. Max Rubner-Institut (2008) Nationale Verzehrsstudie II.
269. May T (2021). Europäische Arzneimittelagentur lehnt Zulassung von Aducanumab ab, *Ärzteblatt D*, ed.
270. Mayeda ER, Glymour MM, Quesenberry CP, Whitmer RA (2016) Inequalities in dementia incidence between six racial and ethnic groups over 14 years. *Alzheimers Dement* 12:216-224
271. Mazzaferro S, Cozzolino M, Marangella M, Strippoli GF, Messa P, Societa Italiana di N (2007) [Calcimimetics, phosphate binders, vitamin D and its analogues for treating secondary hyperparathyroidism in chronic kidney disease: guideline from the Italian Society of Nephrology]. *G Ital Nefrol* 24 Suppl 37:S107-124
272. Mc Donald JM, Savva GM, Brayne C, Welzel AT, Forster G, Shankar GM, Selkoe DJ, Ince PG, Walsh DM, Medical Research Council Cognitive F, Ageing S (2010) The presence of sodium dodecyl sulphate-stable Abeta dimers is strongly associated with Alzheimer-type dementia. *Brain* 133:1328-1341
273. McConlogue L, Buttini M, Anderson JP, Brigham EF, Chen KS, Freedman SB, Games D, Johnson-Wood K, Lee M, Zeller M, Liu W, Motter R, Sinha S (2007) Partial reduction of BACE1 has dramatic effects on Alzheimer plaque and synaptic pathology in APP Transgenic Mice. *J Biol Chem* 282:26326-26334
274. McGuinness B, Craig D, Bullock R, Passmore P (2016) Statins for the prevention of dementia. *Cochrane Database Syst Rev*:CD003160
275. McLachlan DR, Wong L, Bergeron C, Baimbridge KG (1987) Calmodulin and calbindin D28K in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 1:171-179
276. Mendiola AS, Cardona AE (2018) The IL-1beta phenomena in neuroinflammatory diseases. *J Neural Transm (Vienna)* 125:781-795
277. Merz ZC, Van Patten R, Hurlless N, Grant A, McGrath AB (2021) Furthering the Understanding of Wechsler Adult Intelligence Scale-Fourth Edition Factor Structure in a Clinical Sample. *Appl Neuropsychol Adult* 28:12-23
278. Mett J (2017) Die Regulation A $\beta$ -degradierender Enzyme durch die intrazelluläre Domäne von APP (AICD) und die Lipidhomöostase, Universität des Saarlandes.
279. Michaelson DM (2014) APOE epsilon4: the most prevalent yet understudied risk factor for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 10:861-868

280. Michiels E, Rousseau F, Schymkowitz J (2021) Mechanisms and therapeutic potential of interactions between human amyloids and viruses. *Cell Mol Life Sci* 78:2485-2501
281. Milajerdi A, Ostadmohammadi V, Amirjani S, Kolahdooz F, Asemi Z (2019) The effects of vitamin D treatment on glycemic control, serum lipid profiles, and C-reactive protein in patients with chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Int Urol Nephrol* 51:1567-1580
282. Miller BJ, Whisner CM, Johnston CS (2016) Vitamin D Supplementation Appears to Increase Plasma Abeta40 in Vitamin D Insufficient Older Adults: A Pilot Randomized Controlled Trial. *J Alzheimers Dis* 52:843-847
283. Miller JW, Harvey DJ, Beckett LA, Green R, Farias ST, Reed BR, Olichney JM, Mungas DM, DeCarli C (2015) Vitamin D Status and Rates of Cognitive Decline in a Multiethnic Cohort of Older Adults. *JAMA Neurol* 72:1295-1303
284. Miners JS, Verbeek MM, Rikkert MO, Kehoe PG, Love S (2008) Immunocapture-based fluorometric assay for the measurement of neprilysin-specific enzyme activity in brain tissue homogenates and cerebrospinal fluid. *J Neurosci Methods* 167:229-236
285. Miners JS, Barua N, Kehoe PG, Gill S, Love S (2011) Abeta-degrading enzymes: potential for treatment of Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 70:944-959
286. Mirra SS, Heyman A, McKeel D, Sumi SM, Crain BJ, Brownlee LM, Vogel FS, Hughes JP, van Belle G, Berg L (1991) The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 41:479-486
287. Mishra A, Kim HJ, Shin AH, Thayer SA (2012) Synapse loss induced by interleukin-1beta requires pre- and post-synaptic mechanisms. *J Neuroimmune Pharmacol* 7:571-578
288. Mitchell RA, Herrmann N, Lanctot KL (2011) The role of dopamine in symptoms and treatment of apathy in Alzheimer's disease. *CNS Neurosci Ther* 17:411-427
289. Mizwicki MT, Menegaz D, Zhang J, Barrientos-Duran A, Tse S, Cashman JR, Griffin PR, Fiala M (2012) Genomic and nongenomic signaling induced by 1alpha,25(OH)2-vitamin D3 promotes the recovery of amyloid-beta phagocytosis by Alzheimer's disease macrophages. *J Alzheimers Dis* 29:51-62
290. 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) 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and resolvin D1 retune the balance between amyloid-beta phagocytosis and inflammation in Alzheimer's disease patients. *J Alzheimers Dis* 34:155-170
291. Moe SM, Saifullah A, LaClair RE, Usman SA, Yu Z (2010) A randomized trial of cholecalciferol versus doxercalciferol for lowering parathyroid hormone in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 5:299-306
292. 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
293. Moonga I, Niccolini F, Wilson H, Pagano G, Politis M, Alzheimer's Disease Neuroimaging I (2017) Hypertension is associated with worse cognitive function and hippocampal hypometabolism in Alzheimer's disease. *Eur J Neurol* 24:1173-1182

294. Murad MH, Elamin KB, Abu Elnour NO, Elamin MB, Alkatib AA, Fatourehchi MM, Almandoz JP, Mullan RJ, Lane MA, Liu H, Erwin PJ, Hensrud DD, Montori VM (2011) Clinical review: The effect of vitamin D on falls: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 96:2997-3006
295. Murayama E, Miyamoto K, Kubodera N, Mori T, Matsunaga I (1986) Synthetic studies of vitamin D3 analogues. VIII. Synthesis of 22-oxavitamin D3 analogues. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 34:4410-4413
296. Murdoch D, Clissold SP (1992) Calcipotriol. A review of its pharmacological properties and therapeutic use in psoriasis vulgaris. *Drugs* 43:415-429
297. Nakamura A, Kaneko N, Villemagne VL, Kato T, Doecke J, Dore V, Fowler C, Li QX, Martins R, Rowe C, Tomita T, Matsuzaki K, Ishii K, Ishii K, Arahata Y, Iwamoto S, Ito K, Tanaka K, Masters CL, Yanagisawa K (2018) High performance plasma amyloid-beta biomarkers for Alzheimer's disease. *Nature* 554:249-254
298. Nalivaeva NN, Turner AJ (2019) Targeting amyloid clearance in Alzheimer's disease as a therapeutic strategy. *Br J Pharmacol* 176:3447-3463
299. Nalivaeva NN, Zhuravin IA, Turner AJ (2020) Neprilysin expression and functions in development, ageing and disease. *Mech Ageing Dev* 192:111363
300. National Institutes of Health (2022) health professional fact sheet on Vitamin D.
301. 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
302. Naveilhan P, Neveu I, Wion D, Brachet P (1996) 1,25-Dihydroxyvitamin D3, an inducer of glial cell line-derived neurotrophic factor. *Neuroreport* 7:2171-2175
303. Neale RE, Khan SR, Lucas RM, Waterhouse M, Whiteman DC, Olsen CM (2019) The effect of sunscreen on vitamin D: a review. *Br J Dermatol* 181:907-915
304. Need AG, Morris HA, Horowitz M, Nordin C (1993) Effects of skin thickness, age, body fat, and sunlight on serum 25-hydroxyvitamin D. *Am J Clin Nutr* 58:882-885
305. Nolan KA, Brennan EP, Scholz CC, Cullen C, Ryan A, Taylor CT, Godson C (2015) Paricalcitol protects against TGF-beta1-induced fibrotic responses in hypoxia and stabilises HIF-alpha in renal epithelia. *Exp Cell Res* 330:371-381
306. Norman PE, Powell JT (2014) Vitamin D and cardiovascular disease. *Circ Res* 114:379-393
307. 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
308. O'Donnell S, Moher D, Thomas K, Hanley DA, Cranney A (2008) Systematic review of the benefits and harms of calcitriol and alfacalcidol for fractures and falls. *J Bone Miner Metab* 26:531-542
309. Okano T, Tsugawa N, Masuda S, Takeuchi A, Kobayashi T, Nishii Y (1989) Protein-binding properties of 22-oxa-1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3, a synthetic analogue of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 35:529-533

310. Okonkwo OC, Schultz SA, Oh JM, Larson J, Edwards D, Cook D, Kosciak R, Gallagher CL, Dowling NM, Carlsson CM, Bendlin BB, LaRue A, Rowley HA, Christian BT, Asthana S, Hermann BP, Johnson SC, Sager MA (2014) Physical activity attenuates age-related biomarker alterations in preclinical AD. *Neurology* 83:1753-1760
311. Olsson B, Lautner R, Andreasson U, Ohrfelt A, Portelius E, Bjerke M, Holtta M, Rosen C, Olsson C, Strobel G, Wu E, Dakin K, Petzold M, Blennow K, Zetterberg H (2016) CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol* 15:673-684
312. Omdahl JL, Bobrovnikova EA, Choe S, Dwivedi PP, May BK (2001) Overview of regulatory cytochrome P450 enzymes of the vitamin D pathway. *Steroids* 66:381-389
313. Omdahl JL, Morris HA, May BK (2002) Hydroxylase enzymes of the vitamin D pathway: expression, function, and regulation. *Annu Rev Nutr* 22:139-166
314. Ortega LB, Ventura CA (2013) [I am alone: the experience of nurses delivering care to alcohol and drug users]. *Rev Esc Enferm USP* 47:1381-1388
315. Palacios N, Scott T, Sahasrabudhe N, Gao X, Tucker KL (2020) Serum vitamin D and cognition in a cohort of Boston-area Puerto Ricans. *Nutr Neurosci* 23:688-695
316. Pan X, Kaminga AC, Wen SW, Wu X, Acheampong K, Liu A (2019) Dopamine and Dopamine Receptors in Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *Front Aging Neurosci* 11:175
317. Pardridge WM, Sakiyama R, Coty WA (1985) Restricted transport of vitamin D and A derivatives through the rat blood-brain barrier. *J Neurochem* 44:1138-1141
318. Parisi E, Bozic M, Ibarz M, Panizo S, Valcheva P, Coll B, Fernandez E, Valdivielso JM (2010) Sustained activation of renal N-methyl-D-aspartate receptors decreases vitamin D synthesis: a possible role for glutamate on the onset of secondary HPT. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299:E825-831
319. Parker GB, Brotchie H, Graham RK (2017) Vitamin D and depression. *J Affect Disord* 208:56-61
320. Patel P, Shah J (2017) Role of Vitamin D in Amyloid clearance via LRP-1 upregulation in Alzheimer's disease: A potential therapeutic target? *J Chem Neuroanat* 85:36-42
321. Pertile RA, Cui X, Eyles DW (2016) Vitamin D signaling and the differentiation of developing dopamine systems. *Neuroscience* 333:193-203
322. Perwad F, Zhang MY, Tenenhouse HS, Portale AA (2007) Fibroblast growth factor 23 impairs phosphorus and vitamin D metabolism in vivo and suppresses 25-hydroxyvitamin D-1alpha-hydroxylase expression in vitro. *Am J Physiol Renal Physiol* 293:F1577-1583
323. Petersen RC (2004) Mild cognitive impairment as a diagnostic entity. *J Intern Med* 256:183-194
324. Petersenn S, Bojunga J, Brabant G, Etzrodt-Walter G, Finke R, Scharla S, Stamm B, Weber MM, Wicke C, Siggelkow H (2019) [Hypoparathyroidism - un underestimated problem?]. *MMW Fortschr Med* 161:12-20

325. Petta S, Camma C, Scazzone C, Tripodo C, Di Marco V, Bono A, Cabibi D, Licata G, Porcasi R, Marchesini G, Craxi A (2010) Low vitamin D serum level is related to severe fibrosis and low responsiveness to interferon-based therapy in genotype 1 chronic hepatitis C. *Hepatology* 51:1158-1167
326. Pike JW, Spanos E, Colston KW, MacIntyre I, Haussler MR (1978) Influence of estrogen on renal vitamin D hydroxylases and serum 1alpha,25-(OH)2D3 in chicks. *Am J Physiol* 235:E338-343
327. Pilz S, Tomaschitz A, Ritz E, Pieber TR (2009) Vitamin D status and arterial hypertension: a systematic review. *Nat Rev Cardiol* 6:621-630
328. Pop TL, Sirbe C, Benta G, Mititelu A, Grama A (2022) The Role of Vitamin D and Vitamin D Binding Protein in Chronic Liver Diseases. *Int J Mol Sci* 23
329. Porter DA, Smith MA (1988) Magnetic resonance spectroscopy in vivo. *J Biomed Eng* 10:562-568
330. 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
331. Pruessmeyer J, Ludwig A (2009) The good, the bad and the ugly substrates for ADAM10 and ADAM17 in brain pathology, inflammation and cancer. *Semin Cell Dev Biol* 20:164-174
332. Prufer K, Veenstra TD, Jirikowski GF, Kumar R (1999) Distribution of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor immunoreactivity in the rat brain and spinal cord. *J Chem Neuroanat* 16:135-145
333. Quach HP, Dzekic T, Bukuroshi P, Pang KS (2018) Potencies of vitamin D analogs, 1alpha-hydroxyvitamin D3, 1alpha-hydroxyvitamin D2 and 25-hydroxyvitamin D3, in lowering cholesterol in hypercholesterolemic mice in vivo. *Biopharm Drug Dispos* 39:196-204
334. Raha S, Lee HJ, Yumnam S, Hong GE, Venkataram Gowda Saralamma V, Ha YL, Kim JO, Kim YS, Heo JD, Lee SJ, Kim EH, Kim GS (2016) Vitamin D2 suppresses amyloid-beta 25-35 induced microglial activation in BV2 cells by blocking the NF-kappaB inflammatory signaling pathway. *Life Sci* 161:37-44
335. Rai V, Agrawal DK (2017) Role of Vitamin D in Cardiovascular Diseases. *Endocrinol Metab Clin North Am* 46:1039-1059
336. Raina P, Santaguida P, Ismaila A, Patterson C, Cowan D, Levine M, Booker L, Oremus M (2008) Effectiveness of cholinesterase inhibitors and memantine for treating dementia: evidence review for a clinical practice guideline. *Ann Intern Med* 148:379-397
337. Rcom-H'cheo-Gauthier AN, Meedeniya AC, Pountney DL (2017) Calcipotriol inhibits alpha-synuclein aggregation in SH-SY5Y neuroblastoma cells by a Calbindin-D28k-dependent mechanism. *J Neurochem* 141:263-274
338. Reichrath J, Muller SM, Kerber A, Baum HP, Bahmer FA (1997) Biologic effects of topical calcipotriol (MC 903) treatment in psoriatic skin. *J Am Acad Dermatol* 36:19-28
339. Reichrath J (2009) Skin cancer prevention and UV-protection: how to avoid vitamin D-deficiency? *Br J Dermatol* 161 Suppl 3:54-60

340. Reichrath S, Muller CS, Gleissner B, Pfreundschuh M, Vogt T, Reichrath J (2010) Notch- and vitamin D signaling in 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-resistant glioblastoma multiforme (GBM) cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol* 121:420-424
341. Reichrath S, Reichrath J (2012) No evidence for induction of key components of the Notch signaling pathway (Notch-1, Jagged-1) by treatment with UV-B, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, and/or epigenetic drugs (TSA, 5-Aza) in human keratinocytes in vitro. *Dermatoendocrinol* 4:44-52
342. Rejnmark L, Bislev LS, Cashman KD, Eiriksdottir G, Gaksch M, Grubler M, Grimnes G, Gudnason V, Lips P, Pilz S, van Schoor NM, Kiely M, Jorde R (2017) Non-skeletal health effects of vitamin D supplementation: A systematic review on findings from meta-analyses summarizing trial data. *PLoS One* 12:e0180512
343. Ringe JD (2020) Plain vitamin D or active vitamin D in the treatment of osteoporosis: where do we stand today? *Arch Osteoporos* 15:182
344. Rizzoli R (2021) Vitamin D supplementation: upper limit for safety revisited? *Aging Clin Exp Res* 33:19-24
345. Rocca WA, Hofman A, Brayne C, Breteler MM, Clarke M, Copeland JR, Dartigues JF, Engedal K, Hagnell O, Heeren TJ, et al. (1991) Frequency and distribution of Alzheimer's disease in Europe: a collaborative study of 1980-1990 prevalence findings. The EURODEM-Prevalence Research Group. *Ann Neurol* 30:381-390
346. Rodrigues MV, Gutierrez JM, Carvalho F, Lopes TF, Antunes V, da Costa P, Pereira ME, Schetinger MRC, Morsch VM, de Andrade CM (2019) Protection of cholinergic and antioxidant system contributes to the effect of Vitamin D<sub>3</sub> ameliorating memory dysfunction in sporadic dementia of Alzheimer's type. *Redox Rep* 24:34-40
347. Rossom RC, Espeland MA, Manson JE, Dysken MW, Johnson KC, Lane DS, LeBlanc ES, Lederle FA, Masaki KH, Margolis KL (2012) Calcium and vitamin D supplementation and cognitive impairment in the women's health initiative. *J Am Geriatr Soc* 60:2197-2205
348. Rothhaar TL, Grosgen S, Hauptenthal VJ, Burg VK, Hundsdorfer B, Mett J, Riemenschneider M, Grimm HS, Hartmann T, Grimm MO (2012) Plasmalogens inhibit APP processing by directly affecting gamma-secretase activity in Alzheimer's disease. *ScientificWorldJournal* 2012:141240
349. Roy NM, Al-Harhi L, Sampat N, Al-Mujaini R, Mahadevan S, Al Adawi S, Essa MM, Al Subhi L, Al-Balushi B, Qoronfleh MW (2021) Impact of vitamin D on neurocognitive function in dementia, depression, schizophrenia and ADHD. *Front Biosci (Landmark Ed)* 26:566-611
350. Roy S, Sherman A, Monari-Sparks MJ, Schweiker O, Hunter K (2014) Correction of Low Vitamin D Improves Fatigue: Effect of Correction of Low Vitamin D in Fatigue Study (EViDiF Study). *N Am J Med Sci* 6:396-402
351. Rutjes AW, Denton DA, Di Nisio M, Chong LY, Abraham RP, Al-Assaf AS, Anderson JL, Malik MA, Vernooij RW, Martinez G, Tabet N, McCleery J (2018) Vitamin and mineral supplementation for maintaining cognitive function in cognitively healthy people in mid and late life. *Cochrane Database Syst Rev* 12:CD011906
352. Saad El-Din S, Rashed L, Medhat E, Emad Aboulhoda B, Desoky Badawy A, Mohammed ShamsEldeen A, Abdelgwad M (2020) Active form of vitamin D analogue mitigates neurodegenerative changes in Alzheimer's disease in rats by targeting Keap1/Nrf2 and MAPK-38p/ERK signaling pathways. *Steroids* 156:108586

353. Sagare A, Deane R, Bell RD, Johnson B, Hamm K, Pendu R, Marky A, Lenting PJ, Wu Z, Zarcone T, Goate A, Mayo K, Perlmutter D, Coma M, Zhong Z, Zlokovic BV (2007) Clearance of amyloid-beta by circulating lipoprotein receptors. *Nat Med* 13:1029-1031
354. Saido TC (2013) Metabolism of amyloid beta peptide and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 89:321-339
355. Saji Parel N, Krishna PV, Gupta A, Uthayaseelan K, Uthayaseelan K, Kadari M, Subhan M, Kasire SP (2022) Depression and Vitamin D: A Peculiar Relationship. *Cureus* 14:e24363
356. SanMartin CD, Henriquez M, Chacon C, Ponce DP, Salech F, Rogers NK, Behrens MI (2018) Vitamin D Increases Abeta140 Plasma Levels and Protects Lymphocytes from Oxidative Death in Mild Cognitive Impairment Patients. *Curr Alzheimer Res* 15:561-569
357. Saponaro F, Saba A, Zucchi R (2020) An Update on Vitamin D Metabolism. *Int J Mol Sci* 21
358. Sassi F, Tamone C, D'Amelio P (2018) Vitamin D: Nutrient, Hormone, and Immunomodulator. *Nutrients* 10
359. Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Crapper-MacLachlan DR, Alberts MJ, et al. (1993) Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 43:1467-1472
360. Savic Z, Vracaric V, Milic N, Niciforovic D, Damjanov D, Pellicano R, Medic-Stojanoska M, Abenavoli L (2018) Vitamin D supplementation in patients with alcoholic liver cirrhosis: a prospective study. *Minerva Med* 109:352-357
361. Savonenko AV, Melnikova T, Laird FM, Stewart KA, Price DL, Wong PC (2008) Alteration of BACE1-dependent NRG1/ErbB4 signaling and schizophrenia-like phenotypes in BACE1-null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:5585-5590
362. Schaffler A (2010) Hormone replacement after thyroid and parathyroid surgery. *Dtsch Arztebl Int* 107:827-834
363. 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. *Anal Biochem* 166:368-379
364. Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, Bird TD, Hardy J, Hutton M, Kukull W, Larson E, Levy-Lahad E, Viitanen M, Peskind E, Poorkaj P, Schellenberg G, Tanzi R, Wasco W, Lannfelt L, Selkoe D, Younkin S (1996) Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med* 2:864-870
365. 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
366. Sehar U, Rawat P, Reddy AP, Kopel J, Reddy PH (2022) Amyloid Beta in Aging and Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* 23
367. Selkoe DJ (2001) Presenilin, Notch, and the genesis and treatment of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:11039-11041

368. Selkoe DJ, Hardy J (2016) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med* 8:595-608
369. Serneels L, Narlawar R, Benito LP, Municoy M, Guallar V, T'Syen D, Dewilde M, Bischoff F, Fraiponts E, Tresadern G, Roevens PWM, Gijzen HJM, De Strooper B (2023) Selective inhibitors of the PSEN1-gamma-secretase complex. *J Biol Chem*:104794
370. Shafiq SS, Griffin WS, O'Banion MK (2008) The role of interleukin-1 in neuroinflammation and Alzheimer disease: an evolving perspective. *J Neuroinflammation* 5:7
371. Shan NL, Wahler J, Lee HJ, Bak MJ, Gupta SD, Maehr H, Suh N (2017) Vitamin D compounds inhibit cancer stem-like cells and induce differentiation in triple negative breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 173:122-129
372. Shen L, Ji HF (2015) Vitamin D deficiency is associated with increased risk of Alzheimer's disease and dementia: evidence from meta-analysis. *Nutr J* 14:76
373. Sherzai D, Losey T, Vega S, Sherzai A (2014) Seizures and dementia in the elderly: Nationwide Inpatient Sample 1999-2008. *Epilepsy Behav* 36:53-56
374. Shoji T, Nakatani S, Kabata D, Mori K, Shintani A, Yoshida H, Takahashi K, Ota K, Fujii H, Ueda S, Nishi S, Nakatani T, Yoshiyama M, Goto K, Hamada T, Imanishi M, Ishimura E, Kagitani S, Kato Y, Kumeda Y, Maekawa K, Matsumura T, Nagayama H, Obi Y, Ohno Y, Sai Y, Sakurai M, Sasaki S, Shidara K, Shoji S, Tsujimoto Y, Yamakawa K, Yasuda H, Yodoi S, Inaba M, Emoto M (2021) Comparative Effects of Etelcalcetide and Maxacalcitol on Serum Calcification Propensity in Secondary Hyperparathyroidism: A Randomized Clinical Trial. *Clin J Am Soc Nephrol* 16:599-612
375. Sinha S, Anderson JP, Barbour R, Basi GS, Caccavello R, Davis D, Doan M, Dovey HF, Frigon N, Hong J, Jacobson-Croak K, Jewett N, Keim P, Knops J, Lieberburg I, Power M, Tan H, Tatsuno G, Tung J, Schenk D, Seubert P, Suomensaaari SM, Wang S, Walker D, Zhao J, McConlogue L, John V (1999) Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* 402:537-540
376. Sjoden G, Smith C, Lindgren U, DeLuca HF (1985) 1 alpha-Hydroxyvitamin D2 is less toxic than 1 alpha-hydroxyvitamin D3 in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 178:432-436
377. 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. *Anal Biochem* 150:76-85
378. Smolders J, Schuurman KG, van Strien ME, Melief J, Hendrickx D, Hol EM, van Eden C, Luchetti S, Huitinga I (2013) Expression of vitamin D receptor and metabolizing enzymes in multiple sclerosis-affected brain tissue. *J Neuropathol Exp Neurol* 72:91-105
379. Soderberg L, Johannesson M, Nygren P, Laudon H, Eriksson F, Osswald G, Moller C, Lannfelt L (2023) Lecanemab, Aducanumab, and Gantenerumab - Binding Profiles to Different Forms of Amyloid-Beta Might Explain Efficacy and Side Effects in Clinical Trials for Alzheimer's Disease. *Neurotherapeutics* 20:195-206
380. 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. *Dement Geriatr Cogn Disord* 28:75-80



381. Somjen D, Knoll E, Sharon O, Many A, Stern N (2015) Calcitrophic hormones and hyperglycemia modulate vitamin D receptor and 25 hydroxy vitamin D 1-alpha hydroxylase mRNA expression in human vascular smooth muscle cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 148:210-213
382. Sommer I, Griebler U, Kien C, Auer S, Klerings I, Hammer R, Holzer P, Gartlehner G (2017) Vitamin D deficiency as a risk factor for dementia: a systematic review and meta-analysis. *BMC Geriatr* 17:16
383. Sonnenberg J, Luine VN, Krey LC, Christakos S (1986) 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> treatment results in increased choline acetyltransferase activity in specific brain nuclei. *Endocrinology* 118:1433-1439
384. Sosa Henriquez M, Gomez de Tejada Romero MJ (2020) Cholecalciferol or Calcifediol in the Management of Vitamin D Deficiency. *Nutrients* 12
385. Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM, Iwatsubo T, Jack CR, Jr., Kaye J, Montine TJ, Park DC, Reiman EM, Rowe CC, Siemers E, Stern Y, Yaffe K, Carrillo MC, Thies B, Morrison-Bogorad M, Wagster MV, Phelps CH (2011) Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7:280-292
386. Sprague SM, Llach F, Amdahl M, Taccetta C, Batlle D (2003) Paricalcitol versus calcitriol in the treatment of secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int* 63:1483-1490
387. Stein MS, Scherer SC, Ladd KS, Harrison LC (2011) A randomized controlled trial of high-dose vitamin D<sub>2</sub> followed by intranasal insulin in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 26:477-484
388. Stephen R, Hongisto K, Solomon A, Lonroos E (2017) Physical Activity and Alzheimer's Disease: A Systematic Review. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 72:733-739
389. Storga D, Vrecko K, Birkmayer JG, Reibnegger G (1996) Monoaminergic neurotransmitters, their precursors and metabolites in brains of Alzheimer patients. *Neurosci Lett* 203:29-32
390. Strada O, Vyas S, Hirsch EC, Ruberg M, Brice A, Agid Y, Javoy-Agid F (1992) Decreased choline acetyltransferase mRNA expression in the nucleus basalis of Meynert in Alzheimer disease: an in situ hybridization study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:9549-9553
391. Strugnell S, Byford V, Makin HL, Moriarty RM, Gilardi R, LeVan LW, Knutson JC, Bishop CW, Jones G (1995) 1 alpha,24(S)-dihydroxyvitamin D<sub>2</sub>: a biologically active product of 1 alpha-hydroxyvitamin D<sub>2</sub> made in the human hepatoma, Hep3B. *Biochem J* 310 ( Pt 1):233-241
392. Sun JY (2020) Anesthesia and Alzheimer's: A review. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol* 36:297-302
393. Sun Y, Lai MS, Lu CJ, Chen RC (2008) How long can patients with mild or moderate Alzheimer's dementia maintain both the cognition and the therapy of cholinesterase inhibitors: a national population-based study. *Eur J Neurol* 15:278-283
394. 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

395. Suzuki M, Yoshioka M, Hashimoto M, Murakami M, Noya M, Takahashi D, Urashima M (2013) Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of vitamin D supplementation in Parkinson disease. *Am J Clin Nutr* 97:1004-1013
396. Swardfager W, Lanctot K, Rothenburg L, Wong A, Cappell J, Herrmann N (2010) A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 68:930-941
397. Takae K, Hata J, Ohara T, Yoshida D, Shibata M, Mukai N, Hirakawa Y, Kishimoto H, Tsuruya K, Kitazono T, Kiyohara Y, Ninomiya T (2018) Albuminuria Increases the Risks for Both Alzheimer Disease and Vascular Dementia in Community-Dwelling Japanese Elderly: The Hisayama Study. *J Am Heart Assoc* 7
398. Talesa VN (2001) Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev* 122:1961-1969
399. Tamura S, Ueki K, Mashimo K, Tsukada Y, Naitoh M, Abe Y, Kawai H, Tsuchida A, Wakamatsu R, Nojima Y (2005) Comparison of the efficacy of an oral calcitriol pulse or intravenous 22-oxacalcitriol therapies in chronic hemodialysis patients. *Clin Exp Nephrol* 9:238-243
400. Tanaka Y, Castillo L, DeLuca HF (1976) Control of renal vitamin D hydroxylases in birds by sex hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:2701-2705
401. 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. *J Neurosci Res* 83:1179-1189
402. Tarasoff-Conway JM, Carare RO, Osorio RS, Glodzik L, Butler T, Fieremans E, Axel L, Rusinek H, Nicholson C, Zlokovic BV, Frangione B, Blennow K, Menard J, Zetterberg H, Wisniewski T, de Leon MJ (2015) Clearance systems in the brain-implications for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 11:457-470
403. Thal DR, Rub U, Orantes M, Braak H (2002) Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology* 58:1791-1800
404. Thal DR, Del Tredici K, Braak H (2004) Neurodegeneration in normal brain aging and disease. *Sci Aging Knowledge Environ* 2004:pe26
405. Theodoratou E, Tzoulaki I, Zgaga L, Ioannidis JP (2014) Vitamin D and multiple health outcomes: umbrella review of systematic reviews and meta-analyses of observational studies and randomised trials. *BMJ* 348:g2035
406. Thiel A, Hermanns C, Lauer AA, Reichrath J, Erhardt T, Hartmann T, Grimm MOW, Grimm HS (2023) Vitamin D and Its Analogues: From Differences in Molecular Mechanisms to Potential Benefits of Adapted Use in the Treatment of Alzheimer's Disease. *Nutrients* 15
407. Tinawi M (2021) Disorders of Calcium Metabolism: Hypocalcemia and Hypercalcemia. *Cureus* 13:e12420
408. 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 J* 23:1643-1654
409. Tominaga-Yoshino K, Uetsuki T, Yoshikawa K, Ogura A (2001) Neurotoxic and neuroprotective effects of glutamate are enhanced by introduction of amyloid precursor protein cDNA. *Brain Res* 918:121-130

410. Tosto G (2017) Morbus Alzheimer: Kardiovaskuläre Erkrankungen erhöhen das Risiko. *Fortschr Neurol Psychiatr* 85:65-74
411. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4350-4354
412. Trinko JR, Land BB, Solecki WB, Wickham RJ, Tellez LA, Maldonado-Aviles J, de Araujo IE, Addy NA, DiLeone RJ (2016) Vitamin D3: A Role in Dopamine Circuit Regulation, Diet-Induced Obesity, and Drug Consumption. *eNeuro* 3
413. Tsai KS, Heath H, 3rd, Kumar R, Riggs BL (1984) Impaired vitamin D metabolism with aging in women. Possible role in pathogenesis of senile osteoporosis. *J Clin Invest* 73:1668-1672
414. Umezawa Y, Nakagawa H, Tamaki K (2016) Phase III clinical study of maxacalcitol ointment in patients with palmoplantar pustulosis: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Dermatol* 43:288-293
415. Uyanikgil Y, Solmaz V, Cavusoglu T, Cinar BP, Cetin EO, Sur HY, Erbas O (2016) Inhibitor effect of paricalcitol in rat model of pentylenetetrazol-induced seizures. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 389:1117-1122
416. van der Schaft J, Koek HL, Dijkstra E, Verhaar HJ, van der Schouw YT, Emmelot-Vonk MH (2013) The association between vitamin D and cognition: a systematic review. *Ageing Res Rev* 12:1013-1023
417. van Dyck CH, Swanson CJ, Aisen P, Bateman RJ, Chen C, Gee M, Kanekiyo M, Li D, Reyderman L, Cohen S, Froelich L, Katayama S, Sabbagh M, Vellas B, Watson D, Dhadda S, Irizarry M, Kramer LD, Iwatsubo T (2023) Lecanemab in Early Alzheimer's Disease. *N Engl J Med* 388:9-21
418. van Gelder BM, Tijhuis MA, Kalmijn S, Giampaoli S, Nissinen A, Kromhout D (2004) Physical activity in relation to cognitive decline in elderly men: the FINE Study. *Neurology* 63:2316-2321
419. van Schoor NM, Comijs HC, Llewellyn DJ, Lips P (2016) Cross-sectional and longitudinal associations between serum 25-hydroxyvitamin D and cognitive functioning. *Int Psychogeriatr* 28:759-768
420. Varnum-Finney B, Purton LE, Yu M, Brashem-Stein C, Flowers D, Staats S, Moore KA, Le Roux I, Mann R, Gray G, Artavanis-Tsakonas S, Bernstein ID (1998) The Notch ligand, Jagged-1, influences the development of primitive hematopoietic precursor cells. *Blood* 91:4084-4091
421. Vasconcelos-Filho FSL, da Rocha Oliveira LC, de Freitas TBC, de Pontes P, Rocha ESRCD, Godinho WDN, Chaves EMC, da Silva CGL, Soares PM, Ceccatto VM (2021) Effect of involuntary chronic physical exercise on beta-amyloid protein in experimental models of Alzheimer's disease: Systematic review and meta-analysis. *Exp Gerontol* 153:111502
422. Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286:735-741

423. Verberk IMW, Slot RE, Verfaillie SCJ, Heijst H, Prins ND, van Berckel BNM, Scheltens P, Teunissen CE, van der Flier WM (2018) Plasma Amyloid as Prescreener for the Earliest Alzheimer Pathological Changes. *Ann Neurol* 84:648-658
424. Vieth R (2011) Why the minimum desirable serum 25-hydroxyvitamin D level should be 75 nmol/L (30 ng/ml). *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 25:681-691
425. Wacker M, Holick MF (2013) Sunlight and Vitamin D: A global perspective for health. *Dermatoendocrinol* 5:51-108
426. Walsh S, Merrick R, Milne R, Brayne C (2021) Aducanumab for Alzheimer's disease? *BMJ* 374:n1682
427. Wang L, Ying J, Fan P, Weamer EA, DeMichele-Sweet MAA, Lopez OL, Kofler JK, Sweet RA (2019) Effects of Vitamin D Use on Outcomes of Psychotic Symptoms in Alzheimer Disease Patients. *Am J Geriatr Psychiatry* 27:908-917
428. Wang XX, Jiang T, Shen Y, Santamaria H, Solis N, Arbeeny C, Levi M (2011) Vitamin D receptor agonist doxercalciferol modulates dietary fat-induced renal disease and renal lipid metabolism. *Am J Physiol Renal Physiol* 300:F801-810
429. Wang Z, Schuetz EG, Xu Y, Thummel KE (2013) Interplay between vitamin D and the drug metabolizing enzyme CYP3A4. *J Steroid Biochem Mol Biol* 136:54-58
430. Wanleenuwat P, Iwanowski P, Kozubski W (2019) Alzheimer's dementia: pathogenesis and impact of cardiovascular risk factors on cognitive decline. *Postgrad Med* 131:415-422
431. Waring GL, Pollack JC (1987) Cloning and characterization of a dispersed, multicopy, X chromosome sequence in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:2843-2847
432. Watanabe S, Fukatsu T, Kanemoto K (2018) Risk of hospitalization associated with anticholinergic medication for patients with dementia. *Psychogeriatrics* 18:57-63
433. Weller RO, Massey A, Kuo YM, Roher AE (2000) Cerebral amyloid angiopathy: accumulation of A beta in interstitial fluid drainage pathways in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 903:110-117
434. Wessels AM, Tariot PN, Zimmer JA, Selzler KJ, Bragg SM, Andersen SW, Landry J, Krull JH, Downing AM, Willis BA, Shcherbinin S, Mullen J, Barker P, Schumi J, Shering C, Matthews BR, Stern RA, Vellas B, Cohen S, MacSweeney E, Boada M, Sims JR (2020) Efficacy and Safety of Lanabecestat for Treatment of Early and Mild Alzheimer Disease: The AMARANTH and DAYBREAK-ALZ Randomized Clinical Trials. *JAMA Neurol* 77:199-209
435. Wilcock GK, Esiri MM, Bowen DM, Smith CC (1982) Alzheimer's disease. Correlation of cortical choline acetyltransferase activity with the severity of dementia and histological abnormalities. *J Neurol Sci* 57:407-417
436. Willbold D, Strodel B, Schroder GF, Hoyer W, Heise H (2021) Amyloid-type Protein Aggregation and Prion-like Properties of Amyloids. *Chem Rev* 121:8285-8307
437. Woo HN, Park JS, Gwon AR, Arumugam TV, Jo DG (2009) Alzheimer's disease and Notch signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 390:1093-1097

438. Wootton AM (2005) Improving the measurement of 25-hydroxyvitamin D. *Clin Biochem Rev* 26:33-36
439. World Alzheimer Report (2021) Journey through the diagnosis of dementia. Alzheimer's Disease International
440. Wu W, Fan H, Jiang Y, Liao L, Li L, Zhao J, Zhang H, Shrestha C, Xie Z (2018) Regulation of 25-hydroxyvitamin D-1-hydroxylase and 24-hydroxylase in keratinocytes by PTH and FGF23. *Exp Dermatol* 27:1201-1209
441. Xiang W, Liao W, Yi Z, He X, Ding Y (2017) 25-Hydroxyvitamin D-1-alpha-hydroxylase in apolipoprotein E knockout mice: The role of protecting vascular smooth muscle cell from calcification. *Biomed Pharmacother* 88:971-977
442. Xu H, Garcia-Ptacek S, Trevisan M, Evans M, Lindholm B, Eriksdotter M, Carrero Pharm JJ (2021) Kidney Function, Kidney Function Decline, and the Risk of Dementia in Older Adults: A Registry-Based Study. *Neurology*
443. Xu W, Tan L, Wang HF, Jiang T, Tan MS, Tan L, Zhao QF, Li JQ, Wang J, Yu JT (2015) Meta-analysis of modifiable risk factors for Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 86:1299-1306
444. Xu X (2009) Gamma-secretase catalyzes sequential cleavages of the AbetaPP transmembrane domain. *J Alzheimers Dis* 16:211-224
445. Yang K, Chen J, Li X, Zhou Y (2019) Vitamin D concentration and risk of Alzheimer disease: A meta-analysis of prospective cohort studies. *Medicine (Baltimore)* 98:e16804
446. Yao P, Bennett D, Mafham M, Lin X, Chen Z, Armitage J, Clarke R (2019) Vitamin D and Calcium for the Prevention of Fracture: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Netw Open* 2:e1917789
447. 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 AbetaPP transgenic mice. *J Alzheimers Dis* 25:295-307
448. Yu JT, Xu W, Tan CC, Andrieu S, Suckling J, Evangelou E, Pan A, Zhang C, Jia J, Feng L, Kua EH, Wang YJ, Wang HF, Tan MS, Li JQ, Hou XH, Wan Y, Tan L, Mok V, Tan L, Dong Q, Touchon J, Gauthier S, Aisen PS, Vellas B (2020) Evidence-based prevention of Alzheimer's disease: systematic review and meta-analysis of 243 observational prospective studies and 153 randomised controlled trials. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 91:1201-1209
449. Yu TM, Chuang YW, Sun KT, Yu MC, Kung SC, Lee BK, Huang ST, Chen CH, Lin CL, Kao CH (2017) Polycystic kidney disease is significantly associated with dementia risk. *Neurology* 89:1457-1463
450. Yuan Q, Wang CW, Shi J, Lin ZX (2017) Effects of Ginkgo biloba on dementia: An overview of systematic reviews. *J Ethnopharmacol* 195:1-9
451. Zaheer S, de Boer I, Allison M, Brown JM, Psaty BM, Robinson-Cohen C, Ix JH, Kestenbaum B, Siscovick D, Vaidya A (2016) Parathyroid Hormone and the Use of Diuretics and Calcium-Channel Blockers: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *J Bone Miner Res* 31:1137-1145

452. Zanatta L, Goulart PB, Goncalves R, Pierozan P, Winkelmann-Duarte EC, Woehl VM, Pessoa-Pureur R, Silva FR, Zamoner A (2012) 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) mechanism of action: modulation of L-type calcium channels leading to calcium uptake and intermediate filament phosphorylation in cerebral cortex of young rats. *Biochim Biophys Acta* 1823:1708-1719
453. Zand L, Kumar R (2017) The Use of Vitamin D Metabolites and Analogues in the Treatment of Chronic Kidney Disease. *Endocrinol Metab Clin North Am* 46:983-1007
454. 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) 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 up-regulates IL-34 expression in SH-SY5Y neural cells. *Innate Immun* 23:584-591
455. Zhang H, Ma Q, Zhang YW, Xu H (2012a) Proteolytic processing of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein. *J Neurochem* 120 Suppl 1:9-21
456. Zhang M, Deng Y, Luo Y, Zhang S, Zou H, Cai F, Wada K, Song W (2012b) Control of BACE1 degradation and APP processing by ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1. *J Neurochem* 120:1129-1138
457. Zhang N, Gordon ML (2018) Clinical efficacy and safety of donepezil in the treatment of Alzheimer's disease in Chinese patients. *Clin Interv Aging* 13:1963-1970
458. Zhang R, Engler A, Taylor V (2018a) Notch: an interactive player in neurogenesis and disease. *Cell Tissue Res* 371:73-89
459. Zhang X, Wen J, Zhang Z (2018b) Statins use and risk of dementia: A dose-response meta analysis. *Medicine (Baltimore)* 97:e11304
460. Zhang YW, Thompson R, Zhang H, Xu H (2011) APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain* 4:3
461. Zhao Y, Sun Y, Ji HF, Shen L (2013) Vitamin D levels in Alzheimer's and Parkinson's diseases: a meta-analysis. *Nutrition* 29:828-832
462. Zhou S, Chan E, Lim LY, Boelsterli UA, Li SC, Wang J, Zhang Q, Huang M, Xu A (2004) Therapeutic drugs that behave as mechanism-based inhibitors of cytochrome P450 3A4. *Curr Drug Metab* 5:415-442
463. Zhu JG, Ochalek JT, Kaufmann M, Jones G, Deluca HF (2013) CYP2R1 is a major, but not exclusive, contributor to 25-hydroxyvitamin D production in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:15650-15655
464. Ziegler U, Doblhammer G (2009) [Prevalence and incidence of dementia in Germany--a study based on data from the public sick funds in 2002]. *Gesundheitswesen* 71:281-290
465. Zinser EG (2009) Pleiotroper Effekt der Ganglioside auf die APP-Prozessierung in der Alzheimer Krankheit, Universität Heidelberg.
466. Zmijewski MA (2022) Nongenomic Activities of Vitamin D. *Nutrients* 14
467. 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. *J Biol Chem* 279:34302-34310

## 7 Publikationen

### 7.1 Erstautorenschaften

**Thiel A.**, Hermanns C., Lauer AA., Reichrath J., Erhardt T., Hartmann T., Grimm MOW\*, Grimm HS.\* (2023). Vitamin D and Its Analogues: From Differences in Molecular Mechanisms to Potential Benefits of Adapted Use in the Treatment of Alzheimer's Disease. *Nutrients*.

**Thiel A.\***, Grimm MOW\*, 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- $\beta$  (A $\beta$ ) Formation and Increase A $\beta$ -Degradation. *International Journal of Molecular Sciences*.

### 7.2 Mitautorenschaften

Lauer AA.\* , Mett J.\* , Janitschke D., **Thiel A.**, Stahlmann C., Bachmann C., Ritzmann F., Schrul B., Müller U., Stein R., Riemenschneider M., Grimm H., Hartmann T., Grimm MOW (2020) Regulatory feedback cycle of the insulin-degrading enzyme and the amyloid precursor protein intracellular domain: Implications for Alzheimer's disease. *Aging Cell*.

Grimm MOW\* , Lauer AA.\* , Grösgen S., **Thiel A.**, Lehmann J., Winkler J., Janitschke D., Herr C., Beisswenger C., Bals R., Grimm HS., Hartmann T. (2019) Profiling of Alzheimer's disease related genes in mild to moderate vitamin D hypovitaminosis. *The Journal of Nutritional Biochemistry*.

Janitschke D.\* , Nelke C.\* , Lauer AA., Regner L., Winkler J., **Thiel A.**, Grimm H., Hartmann T., Grimm MOW (2019) Effect of Caffeine and Other Methylxanthines on A $\beta$ -Homeostasis in SH-SY5Y Cells, *Biomolecules*.

Grimm MOW\* , Regner L.\* , Mett J., Stahlmann C., Schorr P., Nelke C., Streidenberger O., Stöetzel H., Winkler J., Zaidan S., **Thiel A.**, Endres K., Grimm H., Volmer D., Hartmann T.

(2016) Tocotrienol Affects Oxidative Stress, Cholesterol Homeostasis and the Amyloidogenic Pathway in Neuroblastoma Cells: Consequences for Alzheimer's Disease. International Journal of Molecular Sciences.

*\*geteilte Autorenschaft*

### 7.3 Poster

Lauer AA., **Thiel A.**, Lehmann J., Janitschke D., Winkler J., Griebisch LV., Theiss EL., Bals R., Riemenschneider M. Grimm HS., Hartmann T., Grimm MOW (2022). Influence of a mild vitamin D hypovitaminosis on the Alzheimer's disease pathology. Joint International Symposium Vitamin D In Prevention And Therapy & Biologic Effects Of Light 2022, Homburg, Germany

Lauer AA., Janitschke D., **Thiel A.**, Bachmann C., Winkler J., Herr C., Bals R., Grimm H., Hartmann T., Grimm MOW (2020). Vitamin D and its analogues in Alzheimer's disease & A $\beta$  homeostasis. The 14<sup>th</sup> World Congress on Controversies in Neurology (CONy), CONy Virtual 2020 Congress

Lauer AA., **Thiel A.**, Lehmann J., Janitschke D., Winkler J., Riemenschneider M., Bals R., Grimm HS., Hartmann T., Grimm MOW (2019). Impact of vitamin D and its analogues on Alzheimer's disease. Joint International Symposium Vitamin D In Prevention And Therapy & Biologic Effect of Light 2019, Homburg, Germany

Lauer AA., **Thiel A.**, Lehmann J., Stahlmann C., Winkler J., Regner L., Nelke C., Grimm H., Riemenschneider M., Bals R., Hartmann T., Grimm MOW (2017). Vitamin D and their analogues: A mechanistical link to Alzheimer's disease. Lipids & Brain IV: Lipids in Alzheimer Disease. Nancy, France.



## 8 Danksagung

Abschließend möchte ich allen Personen, die mich auf dem Weg der Entstehung und Fertigstellung der vorliegenden Arbeit begleitet haben, von Herzen danken.

Insbesondere danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. Marcus Grimm für das in mich gesetzte Vertrauen, da er mir die Möglichkeit gegeben hat, die vorliegende Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen. Durch zahlreiche inspirierende Gespräche und wertvolle, konstruktive Anregungen durfte ich eine enorme Unterstützung erfahren, die mich sehr geprägt hat.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei meiner Betreuerin Dr. rer. nat. Heike Grimm für ihre wertvollen Hilfestellungen und wissenschaftlichen Ratschläge bedanken. Auch Herrn Prof. Dr. rer. nat. Tobias Hartmann danke ich für die vielfältige Unterstützung.

Darüber hinaus danke ich allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für experimentelle Neurologie der Universität des Saarlandes für ihre Kooperations- und Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor. Ein besonders großer Dank gilt Anna Lauer für ihre unermüdliche Geduld, die sorgfältige Korrektur der vorliegenden Arbeit und die schönen gemeinsamen Erinnerungen, auch außerhalb des Labors.

Letztlich möchte ich meiner lieben Familie, insbesondere meinen Eltern, meinen Großeltern, meiner Schwester sowie meinen Freunden danken, die mich auf meinem Weg stets liebevoll unterstützt haben, immer ein offenes Ohr hatten und mir, wann immer es nötig war, mit motivierenden und aufmunternden Worten zur Seite standen.

## 9 Lebenslauf