

Aus der Allgemeinchirurgischen Klinik  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Evaluierung des Expressionsprofils altersassoziierter Plasmaproteine  
und Vitamin D**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin*  
der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2019

vorgelegt von: Anne Thomas  
geb. am: 14.07.1995 in Dorsten

## Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung .....	1
1.1. Zusammenfassung (deutsch) .....	1
1.2. Zusammenfassung (englisch) .....	2
2. Einleitung und Fragestellung.....	4
2.1. Einleitung .....	4
2.1.1. $\alpha$ 2-Makroglobulin.....	4
2.1.2. TIMP2 .....	5
2.1.3. Vitamin D .....	5
2.2. Fragestellung .....	7
3. Material und Methoden .....	8
3.2. Material .....	8
3.2.1. Patientenauswahl .....	8
3.2.3. Kits, Puffer, Lösungen, Enzyme.....	8
3.2.4. Geräte .....	10
3.3. Methoden.....	11
3.3.1. Gewinnung von Blutplasma .....	11
3.3.2. Isolierung von peripheren Blutlymphozyten (PBL) .....	11
3.3.3. RNA-Isolierung .....	12
3.3.4. Bestimmung der RNA-Konzentration .....	13
3.3.5. cDNA-Synthese .....	13
3.3.6. Quantitative Polymerase-Kettenreaktion in Echtzeit (TaqMan / qRT-PCR) .....	14
3.3.7. Auswertung qRT-PCR.....	16
3.3.8. ELISA.....	18
3.3.9. Statistik .....	22
4. Ergebnisse .....	23
4.1. $\alpha$ 2-Makroglobulin.....	23
4.2. TIMP2 .....	25
4.3. Vitamin D.....	28
5. Diskussion .....	31
5.1. $\alpha$ 2-Makroglobulin.....	31
5.2. TIMP2 .....	33
5.3. Vitamin D.....	38
5.5. Zusammenfassung der Diskussion .....	44
5.6. Ausblick.....	44
6. Literaturverzeichnis.....	46

7. Publikation und Dank.....	59
7.1. Publikation.....	59
7.2. Dank .....	59

## Abkürzungsverzeichnis

1,25(OH) <sub>2</sub> D	1,25-Dihydroxycholecalciferol
25(OH)D	25-Hydroxycholecalciferol
ADAM	„a disintegrin and metalloproteinases“
ADAMTS	„a disintegrin and metalloproteinases with thrombospondin motifs“
AoD	„TaqMan® Gene Expression Assay“
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
cDNA	komplementäre DNA
Ct	„Threshold Cycle“
CTL	zytotoxische T-Zell
DNA	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dUTP	Deoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	„Enzyme-linked Immunosorbent Assay“
Eppi	Mikroreaktionsgefäß
KHK	koronare Herzkrankheit
miRNA	Mikro-Ribonukleinsäure
MMP	Matrixmetalloproteinase
NTC	keine-Probe-Kontrolle
PBS	phosphatgepufferter Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
qRT-PCR	quantitativer Real-Time-PCR
rDNase	rekombinante Desoxyribonuklease
RNA	Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkription
TIMP	„tissue inhibitor of metalloproteinase“

# 1. Zusammenfassung

## 1.1. Zusammenfassung (deutsch)

### **Evaluierung des Expressionsprofils altersassoziierter Plasmaproteine und Vitamin D**

Blut beinhaltet Blutzellen und Blutplasma, in welchem viele wichtige Bestandteile mit mannigfaltigen Funktionen gelöst sind. Zu ihnen gehören unter anderem die Proteine  $\alpha$ 2-Makroglobulin und TIMP2 sowie das Steroid Vitamin D.

Die vorliegende Arbeit geht der Frage nach, ob und warum altersabhängige Konzentrationsunterschiede bei den oben genannten Plasmabestandteilen bestehen.

Hierfür wurden Blutproben von Patienten der Allgemeinchirurgie der Universität Homburg/Saar nach ihrem Alter in drei Gruppen jung (20-29 Jahre), mittelalt (36–63 Jahre) und alt (65–86 Jahre) unterteilt und gesammelt.

Die Expressionsanalyse wurde bei  $\alpha$ 2-Makroglobulin und TIMP2 auf mRNA-Ebene mittels quantitativer Real-Time-PCR und auf der Proteinebene mittels ELISA durchgeführt. Das Plasmasteroid Vitamin D wurde mittels ELISA bestimmt. Hierfür wurde die Vitamin-D-Vorstufe 25-Hydroxycholecalciferol untersucht. Diese Vorstufe spiegelt den Vitamin-D-Haushalt am ehesten wider, weil sie nicht nur bedarfsabhängig ausgeschüttet wird.

Bei  $\alpha$ 2-Makroglobulin zeigte sich mittels ELISA eine signifikant höhere Konzentration bei den alten Studienteilnehmern sowohl im Vergleich zu den jungen als auch zu den mittelalten Probanden. Die PCR ergab ebenfalls eine signifikant höhere  $\alpha$ 2-Makroglobulin-Expression bei den alten im Vergleich zu den mittelalten Probanden.

Die TIMP2-Proteinkonzentration war bei der alten und der mittelalten Gruppe im Vergleich zu der jungen Gruppe signifikant erhöht. Auf der mRNA-Ebene nahm die TIMP2-mRNA-Expression von jungen zu mittelalten Menschen ab, um dann wieder signifikant bis ins Alter anzusteigen.

Das Steroid Vitamin D zeigte eine signifikant höhere Konzentration bei den alten gegenüber den jungen Probanden. Zusätzlich wurden die Altersgruppen bezüglich der Zeitpunkte, zu denen sie Blut gespendet hatten, eingeteilt. Hierbei kristallisierte sich eine höhere Konzentration bei den jungen und den mittelalten Erwachsenen von Januar bis April heraus im Vergleich zu den Monaten Mai bis Dezember. Bei den alten Probanden gab es keine signifikante Veränderung in dieser Aufteilung.

Die Erhöhung der  $\alpha$ 2-Makroglobulin-Serumkonzentration der alten im Vergleich zu den jungen und mittelalten Probanden könnte einerseits mit den im Alter zunehmenden altersassozierten und immunsystemauslösenden Krankheiten in Verbindung stehen und sich andererseits reaktiv zu der im Alter vermehrten Zellapoptose entwickeln.

Ähnlich ist wahrscheinlich der Mechanismus bei TIMP2. Dieses ist ebenfalls bei altersassoziierten Erkrankungen erhöht und hat einen antiapoptotischen Effekt. Dementsprechend könnten die erhöhten Werte bei der alten Gruppe gleichermaßen mit der Zunahme von altersassoziierten Krankheiten und als Reaktion auf die Zellapoptose interpretiert werden.

Die Ergebniskonstellation dieser Arbeit weist darauf hin, dass eine erhöhte Serumkonzentration von  $\alpha$ 2-Makroglobulin und TIMP2 im zunehmenden Alter nicht immer als Krankheitszeichen zu werten ist, sondern zum Teil den natürlichen Alterungsprozess widerspiegelt.

Die perennal höhere Vitamin-D-Konzentration der alten Gruppe gegenüber den jüngeren Probanden könnte auf die verschiedene Lebensführung (vermehrte Freizeit im Rentenalter) und das differente Risikobewusstsein (häufigere Vitamin-D-Substitution) der alten Gruppe zurückgeführt werden.

Zukünftig ist ein Vitamin-D-Screening für die breite Bevölkerung gegen eine Vitamin-D-Substitution ohne vorherige Spiegelbestimmung abzuwägen.

Ausblickend sollte erforscht werden, ob  $\alpha$ 2-Macroglobulin, TIMP2 und weitere Plasmabestandteile mit altersassoziierten Konzentrationsschwankungen als Medikamente gegen neurodegenerative Erkrankungen des Alters fungieren könnten.

## 1.2. Zusammenfassung (englisch)

### **Evaluation of the Expression Profile of Age-Associated Plasma Proteins and Vitamin D**

Blood contains blood cells and blood plasma, in which many important components with a variety of functions are solved. Among others these include the proteins  $\alpha$ 2-macroglobulin and TIMP2 as well as the steroid vitamin D.

The present work addresses the question of whether and why age-related differences in concentration exist in the plasma constituents mentioned above.

For this purpose, blood samples from patients of general surgery of the University of Homburg/Saar were divided into three groups according to their age: young (20-29 years), middle aged (36-63 years) and old (65-86 years).

Expression analysis was performed at the mRNA level in  $\alpha$ 2-macroglobulin and TIMP2 using quantitative real-time PCR and at the protein level by ELISA. The plasmasteroid vitamin D was determined only by ELISA. Instead of vitamin D the vitamin D precursor 25-hydroxycholecalciferol was investigated as this precursor most closely reflects the vitamin D balance and unlike vitamin D is not only released on demand.

The  $\alpha$ 2-macroglobulin ELISA showed a significantly higher concentration in the old compared to both the young and the middle-aged subjects. The PCR also showed a significantly higher  $\alpha$ 2-macroglobulin expression in the old compared to the middle-aged adults.

The TIMP2 protein concentration was significantly increased in the old and middle-aged groups compared to the young group. At the mRNA level, TIMP2 mRNA expression decreased from young to middle-aged people and then increased significantly with age.

The steroid vitamin D showed a significantly higher concentration in the old compared to the young subjects. In addition, age groups were categorized according to the effective dates of blood donation. Here, a higher concentration of young and middle-aged adults crystallized from January to April compared to the months of May to December. In the old subjects no significant change according to this subdivision was observed.

The increased serum alpha-2-macroglobulin concentration observed in the old test persons compared to the young and middle-aged subjects may be related to aging-related and immune-system-triggering diseases at older age and also it may develop in reaction to age-increased cell apoptosis.

A similar mechanism may be effective for TIMP2. TIMP2 is also increased in age-associated diseases, has an anti-apoptotic effect and counteracts the aging process. Accordingly, the elevated TIMP2 levels in the old group may also be explained by an increase of age-associated diseases and in response to cell apoptosis.

The outcome of this work indicates that an increased serum concentration of  $\alpha$ 2-macroglobulin and TIMP2 in older age is not always a sign of disease, but partly reflects the natural aging process.

The perennial higher vitamin D concentration of the old group compared to the younger subjects could be attributed to the different lifestyle (increased leisure time at retirement age) and the different risk awareness (more frequent vitamin D substitution) of the old group.

In the future, careful deliberation on vitamin D screening for the general population is advised considering vitamin D substitution not without prior determination of vitamin D levels. Prospectively it should be investigated whether  $\alpha$ 2-macroglobulin, TIMP2 and other plasma components with age-associated fluctuations of concentration may act as drugs against neurodegenerative diseases of old age.

## 2. Einleitung und Fragestellung

### 2.1. Einleitung

Das Blut beinhaltet zelluläre Bestandteile und Blutplasma, welches wiederum aus Serum und Fibrinogen bzw. Fibrin besteht. Im Serum sind über 100 verschiedene Proteine mit unterschiedlichen Funktionalitäten gelöst. Zwei davon,  $\alpha$ 2-Makroglobulin und „tissue inhibitor of metalloproteinase“ (TIMP) 2, werden in dieser Arbeit hinsichtlich ihrer Genexpression und altersabhängigen Konzentration mittels quantitativer Real-Time-PCR (qRT-PCR) und „Enzyme-linkes Immunosorbent Assay“ (ELISA) untersucht. Vitamin D, ein weiterer Bestandteil des Serums, wird ebenfalls bezüglich der altersabhängigen Konzentration mithilfe der ELISA untersucht. Der aktuelle Wissensstand über die Funktionsweise der drei Plasmabestandteile wird mittels Literatur einleitend beschrieben. Die Ergebnisse dieser Arbeit werden anhand von Literaturquellen diskutiert.

Die Expressionsbestimmung der beiden Plasmaproteine, von denen die Hersteller und Vertreiber der Testverfahren nur altersneutrale Referenzbereiche angeben, variieren aber laut Literatur altersassoziiert, wobei die Hintergründe zur Zeit diskutiert werden.

Sowohl das Plasmasteroid Vitamin D als auch die beiden oben genannten Plasmaproteine treten immer mehr in das öffentliche Interesse und erlangen durch den Zugewinn an Erkenntnissen über ihre Funktionalität zunehmend an Bedeutung.

#### 2.1.1. $\alpha$ 2-Makroglobulin

$\alpha$ 2-Makroglobulin ist ein Protease-Inhibitor mit einem großen Spektrum, sodass davon ausgegangen werden kann, dass es im Wesentlichen alle Proteinase bindet. Dabei bindet es die Proteinase in einem ungefähr äquimolaren Verhältnis, sodass ein Molekül  $\alpha$ 2-Makroglobulin ein Molekül Proteinase bindet (Barrett *et al.*, 1973). Es besteht aus einem Tetramer, wobei die beiden 360 kD-Dimere durch Disulfidbrücken verknüpft sind (Gettins *et al.*; 1995).

Im Nervensystem verhält sich  $\alpha$ 2-Makroglobulin wie ein Akute-Phase-Protein. Seine Synthese kann dort durch Interleukin-6 induziert werden (Strauss *et al.*; 1992). Der eigentliche Syntheseort des  $\alpha$ 2-Makroglobulins sind jedoch Hepatozyten, wobei die Synthese durch einen Faktor, der von hepatischen Kupferzellen ausgeschüttet wird, stimuliert wird (Hirata *et al.*, 1985).



### 2.1.2. TIMP2

TIMPs sind Metalloproteinasehemmer. Zu ihnen gehören vier verschiedene Enzyme (TIMP1-4), von denen eines TIMP2 ist. TIMP wird von mesodermalen Zellen, wie Fibroblasten synthetisiert (Ito *et al.*, 1990; Selman *et al.*, 2000).

1962 wurde TIMP entdeckt (Gross *et al.*, 1962). 1975 wurde es aus Blutserum bei der Serumproteinfraktionierung isoliert und als ein kleines Molekül mit einer Molekülmasse von 40 kD beschrieben (Woolley *et al.*, 1975).

Als Metalloproteinasehemmer unterdrückt TIMP2 die mit dem Extrazellulärabbau assoziierten Matrixmetalloproteinasen (MMPs), zu denen Gelatinasen, Kollagenasen, Stromelysine, Matrilysine und andere gehören (Murphy *et al.*, 2008), sowie die extrazellulären Multidomänen-Enzyme „a disintegrin and metalloproteinases with thrombospondin motifs“ (ADAMTS) (Porter *et al.*, 2005) und „a disintegrin and metalloproteinases“ (ADAM) (Arpino *et al.*, 2015). Durch die Hemmung der Metalloproteinasen sorgen TIMPs für einen verminderten Extrazellulärabbau, sodass eine zu große Gewebeerstörung verhindert wird und ein Gleichgewicht zwischen Gewebeauf- und abbau entsteht.

TIMP2 hat jedoch auch eine paradoxe Wirkung. Es hemmt nicht nur MMP2, sondern fördert die MMP2-Produktion, indem es die proMMP2-Aktivierung begünstigt (Wang *et al.*, 2014).

Ein Missverhältnis von TIMP2 und Metalloproteinasen führt zur Entstehung von Pathologien.

### 2.1.3. Vitamin D

Um den Beginn des 20. Jahrhunderts war Rachitis ein weit verbreitetes Problem, wodurch die Erforschung von Vitamin D zunehmend in den Fokus der Wissenschaft rückte (Kumaravel Rajakumar, 2003). Um 1920 stellte Chick (Chick, 1922) durch eine Studie an Kleinkindern fest, dass Sonnenexposition und Lebertran die Rachitis heilen oder verhindern können.

In den folgenden Jahren erfolgte eine intensive Erforschung von Vitamin D. So analysierte z. B. der Chemiker Adolf Otto Reinhold Windaus (1876 - 1959) die Struktur von Vitamin D und entwickelte ein Medikament gegen den Vitamin-D-Mangel.

Das Vitamin D, auch Calciferol genannt, ist im Gegensatz zu  $\alpha$ 2-Makroglobulin und TIMP2 kein Protein, sondern ein Steroid. Der für den Menschen wichtige Vertreter der Calciferole ist das Cholecalciferol (Vitamin D<sub>3</sub>). Es wird aus einem Zwischenprodukt der Cholesterin-Synthese hergestellt, dem Provitamin 7-Dehydrocholesterin. Dieses wird durch UV-Licht zwischen C-9 und C-10 (B-Ring) des Sterangerüsts gespalten, während es sich in Blutgefäßen der Haut befindet. Das entstandene Cholecalciferol wird anschließend über zwei Schritte aktiviert. Als erstes wird es in der Leber an C-25 hydroxyliert, sodass 25-

Hydroxycholecalciferol (25(OH)D) entsteht. Dann erfolgt der Transport von der Leber zur Niere durch Bindung an das Vitamin-D-Bindeprotein. Der entstandene Komplex bindet an einen Rezeptor der Niere, wird dort durch Endozytose aufgenommen und intrazellulär abgegeben. In der Niere findet der zweite Schritt der Aktivierung statt. Hier wird das 25-Hydroxycholecalciferol an Position 1 durch die  $1\alpha$ -Hydroxylase hydroxyliert. Es entsteht die aktive Form 1,25-Dihydroxycholecalciferol (Calcitriol/1,25(OH)<sub>2</sub>D). Die Synthese wird durch das Parathormon, das die  $1\alpha$ -Hydroxylase-Transkription fördert, sowie durch Calcium- und Phosphatmangel gesteigert. Gehemmt wird sie durch negatives Feedback von 25-Hydroxycholecalciferol und durch den Fibroblasten-Wachstumsfaktor 23 (FGF23). Beide Substanzen verhindern die  $1\alpha$ -Hydroxylase-Transkription. Die wichtigste Wirkung des Calcitriols ist die Erhöhung der Calcium-Konzentration im Plasma. Dies geschieht durch die Reabsorptionssteigerung von Calcium in Niere (in Henle-Schleife und distalem Tubulus) und Darm. Im Darm führt Calcitriol zu verstärkter Calcium-Kanal-, Calcium-ATPasen- und Calbindinexpression. Eine weitere Wirkung ist die Steigerung der Phosphatkonzentration im Plasma, ebenfalls durch Reabsorptionssteigerung in Niere und Darm. Im Knochen führt Calcitriol zur erhöhten Knochenmineralisierung und Steigerung der Matrixsynthese. Diese Wirkung entsteht indirekt durch erhöhten Calciumspiegel im Blut und direkt durch die Induktion von für den Knochenauf- und -umbau wichtigen Proteinen in Osteoblasten. Zudem aktiviert es die Differenzierung von Osteoklasten abhängig von der Anwesenheit von Osteoblasten, sodass der Knochenabbau nur in Präsenz von Osteoblasten erfolgen kann. Diese Wirkungen führen insgesamt zu Knochenwachstum beim Kind und zur Homöostase beim Erwachsenen. Der Vitamin-D-Mangel lässt sich aus diesen Wirkungen ableiten. Es kommt zur Rachitis beim Kind und Osteomalazie oder Osteoporose beim Erwachsenen. Zu hohe Dosen sind. Eine Überdosierung ist praktisch nur bei Vitamin-D-Supplementierung bekannt. Hierbei kann es zur Hypercalzämie mit folgenden Kalkablagerungen in Gefäßen und Hypercalzurie mit Nierenversagen kommen (Rassow *et al.*, 2012). Des Weiteren können Schwäche, Bauchschmerzen, Anorexie, Bewusstseinsveränderungen, Oligurie und gastrointestinale Beschwerden wie Verstopfung, Übelkeit, Erbrechen und Bauchschmerzen auftreten. Dies zeigten Ergebnisse einer Studie mit Probanden, die durch fehlerhaft erhöhte Vitamin-D-Injektionen eine Intoxikation mit Hypercalzämie und akuter Nierenschädigung erlitten (Wani *et al.*, 2016).

## 2.2. Fragestellung

Im Forschungslabor der Allgemeinchirurgie, in dem diese Arbeit angefertigt wurde, wurden in den letzten Jahren Alterungsvorgänge und Regulation von altersassoziierten Genen vor allem im Hinblick auf den mTOR-Stoffwechselweg untersucht (Rubie *et al.*, 2016). Da von verschiedenen Plasmaproteinen bereits eine alterungsrelevante Bedeutung bekannt ist, geht die vorliegende Arbeit der Frage nach, ob und welche altersabhängigen Expressionsunterschiede der oben beschriebenen Plasmabestandteile bestehen.

### 3. Material und Methoden

#### 3.2. Material

##### 3.2.1. Patientenauswahl

Es wurden Blutproben von Patienten verschiedener Altersgruppen ausgewählt. Das Untersuchungskollektiv setzt sich zusammen aus gesunden Blutspendern des Hämophiliezentrum und für elektive Eingriffe vorgesehenen Patienten ohne akute Entzündungszustände der Allgemeinchirurgie der Universität Homburg/Saar

Die Patienten wurden in drei unterschiedliche Altersgruppen unterteilt. Das junge Patientenkollektiv umfasste Patienten im Alter von 20 bis 29 Jahren ( $n = 38$ ), das mittelalte Kollektiv schloss Patienten im Alter von 36 bis 63 Jahren ein ( $n = 33$ ) und das alte Patientenkollektiv umfasste Patienten im Alter von 65 bis 86 Jahren ( $n = 31$ ).

Die Probanden wurden aufgeklärt und stimmten zu, ihr Blut für wissenschaftliche Zwecke zu spenden.

	<b>Junge Gruppe</b> ( $n = 38$ )	<b>Mittelalte Gruppe</b> ( $n = 33$ )	<b>Alte Gruppe</b> ( $n = 31$ )
<b><u>Alter [Jahre]</u></b>			
<b>Mittelwert</b>	24	52	72
<b>Verteilung</b>	20 - 29	36 - 63	65 - 86
<b><u>Geschlecht</u></b>			
<b>Männlich</b>	18	19	20
<b>Weiblich</b>	20	14	11

##### 3.2.3. Kits, Puffer, Lösungen, Enzyme

- Macherey-Nagel (Isolation of small and large RNA, NucleoSpin® miRNA),  
Macherey-Nagel GmbH und Co. KG Germany
  - Lysis Buffer ML
  - Protein Precipitation Buffer MP
  - Binding Buffer MX
  - Membrane Desalting Buffer MDB
  - Reaction Buffer for rDNase
  - rDNase, RNase-free (lyophilized)
  - Wash Buffer MW1
  - Wash Buffer MW2 (Concentrate; Vor Gebrauch 48 ml Ethanol hinzugeben)

- RNase-free H<sub>2</sub>O
- NucleoSpin® Filters (violet rings)
- NucleoSpin® RNA Columns (blue rings)
- NucleoSpin® miRNA Columns (green rings)
- NucleoSpin® Protein Removal Columns (white rings)
- Collection Tubes (1,5 mL)
- Collection Tubes (2 mL)
- Reverse Transcription Kit, High Capacity cDNA (4368814), Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, USA
  - Multi Scribe Reverse Transcriptase (4308228)
  - dNTP Mix, 100 mM (4367381)
  - 10 x RT Random Primers (4319979)
  - 10 x RT Buffer (4319979)
- TaqMan® Gene Expression Master Mix (4369016 und 1608266), applied biosystems by Thermo Fisher scientific, USA
- TaqMan® Gene Expression Assay (AoD) jeweils für PSMB6,  $\alpha$ 2-Macroglobulin und TIMP-2, applied biosystems by Thermo Fisher scientific, USA
- ab108888- alpha 2 Macroglobulin Human ELISA Kit von abcam®, 2016 (GR 287030-7)
  - alpha 2 Macroglobulin Microplate (12 x 8 well strips)
  - alpha 2 Macroglobulin Standard
  - 10X Diluent M Concentrate
  - Biotinylated Human alpha 2 Macroglobulin
  - 100X Streptavidin-Peroxidase Conjugate
  - Chromogen Substrate
  - Stop Solution
  - 20X Wash Buffer Concentrate
  - Sealing Tapes
- ab213966 25(OH) Vitamin D ELISA Kit von abcam®, 2017
  - Dissociation Buffer
  - 25(OH) Vitamin D Standard (1010 ng/mL, 279 ng/mL, 71,6 ng/mL, 24,4 ng/mL, 4,8 ng/mL und 0,5 ng/mL)
  - Sample Diluent

- 25(OH) Vitamin D Conjugate (100X)
- Donkey anti-Sheep IgG coated microplate (12 x 8 well strips)
- 25(OH) Vitamin D Antibody
- 25(OH) Vitamin D3 Conjugate Diluent
- Wash Buffer 4 Concentrate (20X)
- pNpp Substrate
- Stop Solution
- Plate Sealer
- Quantikine® ELISA Human TIMP-2 Immunoassay von R&D Systems, DTM200 (P128659)
  - Human TIMP-2 Microplate (12 strips of 8 wells)
  - Human TIMP-2 Conjugate
  - Human TIMP-2 Standard
  - Assay Diluent RD1W
  - Callibrator Diluent RDSP Concentrate
  - Wash Buffer Concentrate
  - Color Reagent A
  - Color Reagent B
  - Stop Solution
  - Plate Sealers
- Sonstige Reagenzien
  - Biocoll Separating Solution , Biochrom GmbH Germany (L6715)
  - DPBS (Dubecco's Phosphate Buffered Saline), gibco® by Life Technologies Corporation, Made in UK (14190-094)
  - Aqua bidestillata

#### 3.2.4. Geräte

- DeNovix DS-11+ Spectrophotometer
- 2700 ThermalCycler GeneAMP System von Applied Biosystems
- 7500 Real Time PCR System von Applied Biosystems
- BioTek EL800 Mikroplattenleser
- Heidolph instruments UNIMAX 2010 rotierender Plattformschüttler
- Eppendorf Centrifuge 5810R

- Eppendorf Centrifuge 5417R
- Carl Roth Zentrifuge
- Eppendorf research Pipetten
- Accu-jet®pro, Brand
- Vortex-Genie 2, Scientific Industries

### 3.3. Methoden

#### 3.3.1. Gewinnung von Blutplasma

Das Blut aus dem Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Röhrchen wird spätestens eine halbe Stunde nach Abnahme zentrifugiert, sodass sich Plasma und zelluläre Bestandteile auftrennen. Dies wird unter Raumtemperatur 15 Minuten lang bei 1000xg durchgeführt. Anschließend überführt man je 2x2 ml Plasma pro Patient in ein Röhrchen, welches bei -20 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert wird. Das EDTA-Röhrchen wird dann mit steriler phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) auf die vorherige Menge aufgefüllt. Aus dem gewonnenen Plasma wird später die Bestimmung der Plasmaproteine erfolgen.

#### 3.3.2. Isolierung von peripheren Blutlymphozyten (PBL)

Um die Lymphozyten aus dem Blutzellen-Gemisch zu isolieren, wird das mit PBS vermischte EDTA-Blut als erstes in 50 ml-Falcons gefüllt (je zwei pro Patient) und im Verhältnis 1:1 mit PBS verdünnt. Damit sich das Gemisch nach der Dichte durch die Zentrifuge auftrennen kann, überschichtet man die Trennlösung Biocoll mit dem verdünnten Blut. Bei der Zentrifugation (1200xg, 20 Minuten bei Raumtemperatur) muss zudem darauf geachtet werden, die Bremse auszustellen. Es entsteht eine Auftrennung in Erythrozyten, Biocoll, Interphase und Plasma-PBS-Gemisch. Die PBL enthaltende Interphase wird abpipettiert und in ein neues sauberes 50 ml-Falcon überführt, welches mit PBS aufgefüllt wird. Nach der Abzentrifugation (600xg, 10 Minuten) kippt man den Überstand ab. Dann erfolgt das Resuspendieren des Pellets in 1 ml PBS. Beide Suspensionen des Patienten werden nun zusammengeführt und anschließend in zwei Mikroreaktionsgefäße (Eppis) gefüllt. Die Eppis werden bei 4 °C zentrifugiert (1400xg, 5 Minuten) und der Überstand anschließend abgenommen. Um aus den PBL Ribonukleinsäure (RNA) zu gewinnen, gibt man zu den Zellen 300 µl Lysispuffer ML, welcher so lange mit den Zellen gemischt werden muss, bis sich das Pellet vollständig gelöst hat. Die Zellen sind nun lysiert. Bis zur weiteren Verarbeitung müssen die Eppis bei -70 °C gelagert werden.

### 3.3.3.RNA-Isolierung

Für die RNA-Isolation wurde der „*Macherey-Nagel-Kit*“ (Isolation of small and large RNA, NucleoSpin® miRNA, Macherey-Nagel GmbH und Co. KG, Düren, Germany) eingesetzt. Vor der Durchführung müssen 24 ml Ethanol zum Puffer MW2 zugefügt werden. Des Weiteren wird die rekombinante Desoxyribonuklease I (rDNase) vorbereitet, indem 3 ml Puffer („Reaction Buffer for rDNase“) zur lyophilisierten rDNase gegeben werden. Bis zum Beginn der Isolierung werden die aliquotierten Proben bei -20 °C gelagert.

Als erstes erfolgt die Homogenisierung des Lysats. Dabei wird der NucleoSpin Filter in eine 2 ml Sammeltube mit Deckel gestellt. Nach anschließender Zentrifugation (10000xg, 1 Minute) wird der Durchfluss behalten. Nun müssen die Bedingungen zur Bindung der Nukleinsäuren an die Säule angepasst werden. Dafür werden 150 µl reines Ethanol hinzugegeben, es wird gemischt und bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert.

Beim nächsten Schritt werden RNA und Desoxyribonuklease (DNA) an die Säulenmembran gebunden. Hierfür wird eine NucleoSpin RNA Säule benötigt, die in eine 2 ml Sammeltube mit Deckel gesteckt wird. In diese wird nun das Gemisch gegeben und zentrifugiert (14000xg, 1 min.). Der Durchfluss enthält jetzt die Mikro-Ribonukleinsäuren (miRNAs) und die Säule die großen RNAs.

Dann wird die Säulenmembran entsalzt, indem 350 µl Puffer MDB auf die mit miRNA beladene Säule gegeben werden. Danach wird die DNA verdaut, indem 100 µl von der vorher vorbereiteten rDNase auf die Säule gegeben werden.

Im nächsten Schritt wird der Durchfluss mit den miRNAs von Proteinen befreit. Dafür werden 300 µl Puffer MP auf den Durchfluss gegeben, um die Proteine auszufällen. Nach der Zentrifugation (11000xg, 3 Minuten) lagern sich die Proteine als Pellet im Eppi an. Der Durchfluss wird nun zur Entfernung der Proteine auf eine Säule gegeben, die sich „Protein Removal Column“ nennt und in einer 2 ml Sammeltube steckt. Nach erneuter Zentrifugation (11000xg, 1 Minute) kann die Säule entsorgt werden. Um sowohl die großen RNAs als auch die miRNAs an der Säulen-Membran zu binden, müssen dem miRNA-Durchfluss 800 µl Puffer MX zugegeben werden und das Gemisch wird auf die mit großen RNAs beladene Säule aufgebracht. Nach Zentrifugation befinden sich nun alle RNAs auf der Säule.

Als letztes wird die Membran durch Zugabe von Puffer MW1 (600 µl) und Puffer MW2 (erst 700 µl, dann 250 µl) gewaschen und die Gesamt-RNA wird in 60 µl Ribonuklease-freiem-Wasser gelöst. Das daraus resultierende Eluat muss bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert werden.



#### 3.3.4. Bestimmung der RNA-Konzentration

Für die Konzentrationsmessung in ng/μl wird das DeNovix Spektrophotometer verwendet. Mithilfe des Spektrophotometers wird auch die Reinheit der Nukleinsäureproben bewertet, die für die Funktionalität der Proben sehr wichtig ist. Dies ist möglich durch Betrachten der Verhältnisse der Extinktionswerte von 230, 260 und 280 nm. Mit dem Verhältnis 260/280 kann die Anwesenheit von Protein und/oder Phenol nachgewiesen werden, auch wenn dadurch keine Garantie für die Reinheit der Probe besteht. Dieses Verhältnis sollte ungefähr bei 2 liegen, aber maximal bei 2,2 und minimal bei 1,9. Zu hohe Werte können für eine Basen- und zu niedrige Werte für eine Protein/Phenol-Verunreinigung sprechen. Das Verhältnis 260/230 wird verwendet, um die Anwesenheit von unerwünschten organischen Verbindungen (z. B. Trizol, Phenol, Guanidin-HCL und Guanidinthiocyanat) nachzuweisen. Die Werte sollten bei 2 - 2,2 liegen. Zu hohe Werte sprechen für organische Verbindungen (Thermo Fisher Scientific, Technical Bulletin T042 NanoDrop Spectrophotometers).

#### 3.3.5. cDNA-Synthese

Die komplementäre DNA (cDNA) entsteht durch Umschreiben aus RNA. Sie hat den Vorteil, keine Introns zu enthalten und stabiler zu sein als die RNA. Die Umschreibung der RNA in cDNA wird durch das Enzym Reverse Transkriptase durchgeführt, die eine RNA-abhängige DNA-Polymerase ist und deshalb RNA als Matrize verwenden kann. Beginn der Reaktion ist das Anhybridisieren des „Random Primers“ an das Poly(A)-Ende der RNA (Löffler *et al.*, 2007). Danach erfolgt die reverse Transkription (RT), die den „Primer“ als Ausgangspunkt nimmt. Die reverse Transkriptase benutzt die hinzugegebenen Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) zum Aufbau der cDNA. Für die optimalen Bedingungen dieser Reaktion sorgen der RT Puffer und die Temperaturen im Thermocycler (GeneAMP System 2700 von Applied Biosystems). Für das Umschreiben von RNA in cDNA wird das „*High-Capacity cDNA Reverse Transkription Kit*“ (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, Foster City, Kalifornien, USA) verwendet.

Nach dem Auftauen eingefrorener RNA wird diese gemischt und kurz zentrifugiert. Um bei jeder Probe die gleiche cDNA-Konzentration zu erhalten, nämlich 50 ng/μl, muss vorher die RNA-Konzentration mithilfe des DeNovix Spektrophotometers gemessen werden und die entnehmende Menge des RNA-Eluats und die Wasser-Menge (Nuklease-frei) angepasst werden. Hierbei wird berechnet, wie viel μl RNA-Eluat einem μg RNA entspricht. Die errechnete Menge wird in ein neues Eppi gefüllt und anschließend auf 14,2 μl mit Nuklease-freiem Wasser aufgefüllt. Nun hat man eine Konzentration von 1 μg RNA/14,2 μl Eluat. Zu den 14,2 μl werden

5,8 µl des „RT Master Mix‘s“ gegeben bestehend aus 2 µl RT Puffer, 0,8 µl dNTP Mix (100 mM), 2 µl RT „Random Primers“ und 1,0 µl Reverse Transkriptase. Diese Mengenangaben sind passend zu der RNA-Menge errechnet worden. Das daraus resultierende Gesamtvolumen beträgt nun in jedem Eppi die gewünschten 1 µg RNA/20 µl. Der „RT Master Mix“ wird vorher für 10 Proben inklusive 10 % zusätzlich für den eventuellen Verlust beim Transfer vorbereitet. Er wird bis zur Anwendung auf Eis gekühlt und auf die zuvor mit RNA-Eluaten befüllten neuen Eppis und eine keine-Probe-Kontrolle (NTC), aus 14,2 µl Nuklease-freien Wasser, verteilt. Die Eppis werden jetzt in einen Thermocycler (GeneAMP System 2700 von Applied Biosystems) gestellt, der in vier Schritten abläuft. Der erste Schritt erfolgt 10 Minuten bei 25 °C, der zweite 120 Minuten bei 37 °C, der dritte 5 Minuten bei 85 °C und der letzte Schritt bei 4 °C bis zur Entnahme der Eppis. Die dabei erhaltene cDNA-Menge ist äquivalent zur vorher verwendeten RNA-Menge. Das heißt, dass die Eppis nun 1 µg/20 µl (50 ng/µl) cDNA enthalten. Die cDNA wird bis zur Weiterbearbeitung bei -20 °C gelagert.

### 3.3.6. Quantitative Polymerase-Kettenreaktion in Echtzeit (TaqMan / qRT-PCR)

Bei einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird die cDNA-Menge vervielfältigt. Anschließend muss die Menge der gewonnenen DNA bestimmt werden. Die hier angewandte qRT-PCR hat dagegen den Vorteil, dass bei ihr die Amplifikation und die Quantifizierung gleichzeitig erfolgen.

Als Matrize wird die bei der reversen Transkriptionsreaktion entstandene cDNA verwendet. Die TaqMan-Sonde enthält einen Reporter-Farbstoff am 5'-Ende und einen „Quencher“-Farbstoff am 3'-Ende. Die Nähe des „Quencher“- zum „Reporter“-Farbstoff führt dabei zur Unterdrückung der „Reporter“-Floureszenz. Während der Reaktion hybridisiert die Sonde mit der DNA. Die Taq-Polymerase, die zusätzlich zur Polymerase-Funktion eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität besitzt, spaltet nach der Hybridisierung die Sonde. Dadurch werden der „Reporter“- und der „Quencher“-Farbstoff voneinander getrennt, was zu einer erhöhten Fluoreszenz des „Reporter“-Farbstoffes führt, da diese nicht mehr durch den „Quencher“ verhindert wird. Die Sondenfragmente werden anschließend verdrängt und die Polymerisation wird fortgesetzt. Dieser Prozess tritt in jedem Zyklus auf. Der Anstieg der Fluoreszenz wird nur dann detektiert, wenn die Zielsequenz komplementär zur Sonde ist und PCR amplifiziert wird. Die PCR-Produkt-Menge ist daher proportional zu der detektierten Zunahme der Fluoreszenz des „Reporter“-Farbstoffes. (TaqMan®Universal PCR Master Mix Protokoll, Applied Biosystems, 2002)

Zur Vorbereitung werden die cDNA-Proben und der „TaqMan®Gene Expression Assay“ (AoD), die jeweils bei -20 °C gelagert wurden, auf Eis aufgetaut. Für jedes zu untersuchende Gen wird ein eigener speziell für das Gen angefertigter AoD benutzt, der Sonden enthält, die mit einem Teil des Gens hybridisieren können. Der „TaqMan® Gene Expression Master Mix“, der vorher bei 2-8 °C gelagert wurde, wird auch auf Eis gehalten. Dieser „TaqMan® Gene Expression Master Mix“ beinhaltet die AmpliTaq Gold DNA Polymerase, dNTP's mit Deoxyuridintriphosphat (dUTP) und Pufferkomponente. Außerdem müssen die Eppis für die Proben, für den Standard (250 ng-, 100 ng-, 50 ng-, 25 ng-, 5 ng- und 1 ng-Standard) und für zwei NTC-Kontrollen beschriftet werden.

Nach dem Auftauen der Komponenten wird der Mastermixansatz für die Proben pipettiert. Dafür gibt man 21,0 µl des „TaqMan® Gene Expression Master Mix“, 2,1 µl AoD und 16,8 µl HPLC-Wasser jeweils mal die Probenanzahl (inklusive der beiden NTC-Kontrollen) plus 10 % in ein Eppi als Master Mix. Von diesem Master Mix gibt man je 39,9 µl pro Eppi und danach 2,1 µl cDNA aus der jeweils passenden Probe in jedes für die Proben vorbereitete Eppi.

Dann werden die NTCs pipettiert. In die cDNA-Kontrolle (NTC-1) wird 39,9 µl des Mastermixansatzes der Proben und 2,1 µl der NTC-Kontrolle, die man bei der cDNA-Synthese mit angefertigt hat, gegeben. In die TaqMan-Kontrolle (NTC-2) wird 39,9 µl des Probenmastermixansatzes und 2,1 µl HPLC-Wasser gegeben.

Für den Standard, der später für die Standardkurve von Bedeutung ist, wird auch ein Mastermixansatz benötigt. Dafür werden 14,7 µl AoD und 147 µl „TaqMan® Gene Expression Master Mix“ zusammengegeben und davon jeweils 23,1 µl in die Standard-Eppis pipettiert. Nun muss die cDNA des Standards, die eine Konzentration von 50 ng/µl hat, hinzugegeben werden. In den ersten Standard (250 ng-Standard) werden 10,5 µl, in den zweiten Standard (100 ng-Standard) 4,2 µl und in den dritten Standard (50 ng-Standard) 2,1 µl der cDNA gegeben. Zu den Proben wird so viel HPLC-Wasser gegeben bis die cDNA und Wasser-Menge zusammen 18,9 µl betragen, sodass die Konzentration 250 ng/µl, 100 ng/µl bzw 50 ng/µl erreicht wird. Bevor man die cDNA zu den anderen Standard-Proben hinzugeben kann, muss die cDNA vorverdünnt werden. Für die Vorverdünnung des vierten Standards (25 ng-Standard) werden 5 µl cDNA mit 5 µl HPLC-Wasser verdünnt. Aus der erhaltenen 25 ng/µl-Verdünnung werden 2 µl mit 8 µl HPLC-Wasser vermischt, sodass eine Konzentration von 5 ng/µl resultiert, die für die Vorverdünnung des fünften Standards (5 ng-Standard) verwendet wird. Um eine Konzentration von 1 ng/µl für die Vorverdünnung des sechsten Standards (1 ng-Standard) zu erhalten, werden 2 µl von der 5 ng/µl-Vorverdünnung entnommen und mit 8 µl HPLC-Wasser

vermischt. Aus den Vorverdünnungen für Standard vier, fünf und sechs werden jeweils 2,1 µl entnommen und zusammen mit 16,8 µl HPLC-Wasser in die jeweiligen Eppis gefüllt.

Wenn alle Eppis mit cDNA, Mastermix und HPLC-Wasser gefüllt sind, werden 20 µl dieses Gemischs pro Well der Platte übertragen. Alle Proben, Standards und Kontrollen werden in Duplikaten auf die Platte pipettiert. Nach der Übertragung wird die befüllte Platte mit einer Klebefolie abgedichtet, die Lösungen 5 min bei 1000 U an zentrifugiert und dann in den TaqMan (Applied Biosystems, 7500 Real Time PCR System) gestellt. Im TaqMan wird als erstes die Uracil-DNA-Glycosylase (UDG) bei 50 °C zwei Minuten inkubiert, dann das Enzym bei 95 °C (10 Minuten) aktiviert und zum Schluss erfolgen 40 PCR-Zyklen. Ein PCR-Zyklus besteht aus der Denaturierung bei 95 °C 15 Sekunden, dem Annealing (Hybridisierung der Sonden mit der DNA) und der Elongation bei 60 °C 60 Sekunden lang.

Insgesamt wurde für jede der drei Gruppen für  $\alpha$ 2-Macroglobulin, TIMP2 und PSMB6 („housekeeper“) die RNA-Expression untersucht. Das Vitamin D wurde nur mithilfe der ELISA gemessen und nicht mit der qRT-PCR, da es aus einem Zwischenprodukt der Cholesterin-Synthese (7-Dehydrocholesterin) synthetisiert wird. Dementsprechend ist keine messbare RNA vorhanden.

### 3.3.7. Auswertung qRT-PCR

Bevor die Werte der qRT-PCR verglichen werden können, müssen sie normiert werden.

In der qRT-PCR werden nicht nur die RNA-Konzentrationen von  $\alpha$ 2-Macroglobulin und TIMP2 bestimmt, sondern auch die eines sogenannten Haushaltsgenes. Im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen wurde das Haushaltsgen PSMB6 für die Normierung ausgewählt, da PSMB6 in allen Proben eine einheitliche Expression seiner RNA aufweist (Rubie *et al.*, 2005). In den Ergebnissen der qRT-PCR treten Fehler dadurch auf, dass es Unterschiede in der eingesetzten cDNA-Menge der Proben gibt. Diese Abweichungen entstehen auf Grund von unterschiedlichen Faktoren. Hierzu gehören unter anderem die nicht ganz gleiche Effizienz in der cDNA-Herstellung (PBL-Isolierung, RNA-Isolierung und Reverse Transkription), Unterschiede in der Blutprobenlagerung vor der Isolierung und die Effizienzunterschiede in der qRT-PCR. Misst man nun zusätzlich die RNA-Expression des Haushaltsgenes bei allen verwendeten Proben, kann man diese mit der RNA-Expression normieren. Es entstehen normierte Werte, die direkt miteinander verglichen werden können. Hierdurch wird die Zuverlässigkeit der qRT-PCR verbessert.

Zusätzlich muss ein Schwellenwert („Threshold value“) relativ willkürlich festgelegt werden. Dabei muss die Bedingung, dass der Verlauf der normierten Reportersignale

(Amplifikationsplots) aller Wells sich in der exponentiellen Phase befindet, eingehalten werden. Die Anzahl der Zyklen bis zum Überschreiten des „Threshold“ wird als „Threshold Cycle“ (Ct) bezeichnet. Der Ct gibt die relative Menge für die Summe der cDNA-Startkopien für die betreffende Reaktion an. Ist in einem Well der Ct-Wert geringer als in einem anderen Well bedeutet dies, dass der Schwellenwert in einem früheren Zyklus erreicht wird und dementsprechend mehr cDNA als Startkonzentration vorhanden war. Da jede qRT-PCR-Platte einen anderen Schwellenwert besitzt, können nur Ct-Werte einer Platte miteinander verglichen werden.

Es gibt nun zwei Möglichkeiten die qRT-PCR auszuwerten, nämlich mithilfe der absoluten (Standardkurve) und der direkten relativen Quantifizierung. Bei der absoluten Quantifizierung wird ein Standard mit bekannter Startkopienzahl und Verdünnungen dieses Standards verwendet. Die daraus entstehenden Ct-Werte werden gegen den dekadischen Logarithmus Startkopienzahl als Standardkurve dargestellt. Daraus lassen sich nun die übrigen Startkopienzahlen ableiten. Bei der hier verwendeten relativen Quantifizierung wird das Verhältnis der Startkopienzahlen von Ziel- und „Houskeeping“-Gen bestimmt. Man benutzt zusätzlich eine Gruppe, die als Kalibrator verwendet wird und gleich 1 gesetzt wird. Die anderen Gruppen nutzen nun den Kalibrator als Orientierungspunkt. Dadurch lassen sich Aussagen darüber treffen, ob und um wie viel z.B. die Proteinkonzentration der alten Probanden erhöht/verringert ist gegenüber der Proteinkonzentration der mittelalten Probanden (hier wären die mittelalten Probanden der Kallibrator). Damit diese Methode aussagekräftig ist, wird zusätzlich eine Standardkurve benötigt. Diese wird mit einer beliebigen Probe durchgeführt, von der man die Startkopienzahl im Voraus nicht wissen muss (Rawer D *et al.*, 2003).

Die Quantity-Werte werden wie folgt berechnet:

➤ Quantity<sub>jung</sub>-Werte:

$$\text{Quantity}_{\text{jung}} = \frac{\text{Zielgen-Quantity}_{\text{jung}}}{\text{PSMB6-Quantity}_{\text{jung}}}$$

➤ Quantity<sub>mittelalt</sub>-Werte normiert auf junge Probanden:

$$\text{Quantity}_{\text{mittelalt}} = \frac{\text{Zielgen-Quantity}_{\text{mittelalt}} / \text{PSMB6-Quantity}_{\text{mittelalt}}}{\text{Quantity-Mittelwert}_{\text{jung}}}$$

➤ Quantity<sub>alt</sub>-Werte normiert auf junge Probanden:

$$\text{Quantity}_{\text{alt}} = \frac{\text{Zielgen-Quantity}_{\text{alt}} / \text{PSMB6-Quantity}_{\text{alt}}}{\text{Quantity-Mittelwert}_{\text{jung}}}$$

- Quantity<sub>alt</sub>-Werte normiert auf mittelalte Probanden:

$$\text{Quantity}_{\text{alt}} = \frac{\text{Zielgen-Quantity alt} / \text{PSMB6-Quantity alt}}{\text{Quantity-Mittelwert mittelalt}}$$

### 3.3.8. ELISA

Bei den ELISAs werden zusätzlich zu den Probandenproben auch Standardproben auf die Platte pipettiert. Diese sind wichtig für die Auswertung. Die Standardkurve wird mithilfe der gemessenen Extinktion der Standardproben erstellt. Die schon vorher bekannten Konzentrationen (in ng/μl) werden dabei auf die Abszisse und die gemessene Extinktion auf die Ordinate aufgetragen. Aus der Standardkurve können nun die Proteinkonzentrationen der anderen Proben bestimmt werden. Der Unterschied zwischen den Standardkurven der kompetitiven und der Sandwich-ELISA ist, dass bei der kompetitiven die Standardproben mit geringer Konzentration eine höhere Extinktion haben als die mit größerer Konzentration. Bei der Sandwich-ELISA wiederum haben Standardproben mit geringer Konzentration auch eine geringere Extinktion als die mit größerer Konzentration.

#### 3.3.8.1. Kompetitive ELISA (α2-Makroglobulin, Vitamin D)

Um den α2-Makroglobulin- bzw. den Vitamin-D-Gehalt der Plasmaprobe bestimmen zu können, wird ein kompetitiver ELISA verwendet. Dabei ist die Platte mit Antikörpern gegen das α2-Makroglobulin bzw. gegen das Vitamin D behaftet.

##### 3.3.8.1.1. α2-Makroglobulin

Wenn bei der α2-Makroglobulin-Platte die Probe bzw. der Standard und das biotinylierte Antigen hinzugegeben werden, konkurrieren sie um die auf der Platte befindlichen Antikörper. Durch anschließende Zugabe von Streptavidin-Peroxidase-Konjugaten, die sich an das biotinylierte Antigen heften, und chromogenen Substraten, entsteht eine blaue Farbe. Je intensiver die Farbe, desto mehr biotinyliertes Antigen hat an die Antikörper gebunden und desto weniger α2-Makroglobulin ist in der Probe enthalten. Zum Schluss wird eine Stopp-Lösung hinzugegeben, wodurch eine gelbe Färbung entsteht. Durch die Bestimmung der Extinktion der Proben in den Wells wird die Konzentration des Proteins bestimmt (ab108888-alpha 2 Macroglobulin Human ELISA Kit, Instructions for Use, Version 10, 2016).

Es wurde das „*ab108888 alpha 2 Macroglobulin Human ELISA Kit*“ von abcam® (Abcam, Cambridge, England) benutzt. Zur Vorbereitung der ELISA müssen alle Reagenzien angesetzt werden. Von dem „Diluent M“ werden zweimal 50 ml vorbereitet (je 5 ml 10X „Diluent M“ Konzentrat und 45 ml Aqua bidestillata), dieses muss bei 4 °C gelagert werden, maximal

vier Wochen lang. Für den Waschpuffer werden 30 ml von dem 20X Waschpuffer Konzentrat mit 300 ml Aqua bidestillata verdünnt.

Für die Probenvorbereitung wird das Plasma aufgetaut gemischt und anschließend bei 3000 g 10 Minuten zentrifugiert. Um die benötigte Verdünnung von 1:400 zu erreichen, wird das Plasma zweimal verdünnt. Bei der ersten Verdünnung (1:10) werden je 10 µl Plasma mit 90 µl „Diluent M“ verdünnt. Die entstandene Plasmaverdünnung wird dann 1:40 verdünnt, indem je 10 µl mit 390 µl „Diluent M“ verdünnt werden.

Dann wird das letzte Reagenz, „Biotinylated Human  $\alpha$ 2-Macroglobulin“, vorbereitet. Dafür werden 4 ml Diluent M (1X) zu dem „Biotinylated alpha 2 Macroglobulin Vial“ hinzugegeben, sodass 2X „Biotinylates alpha 2 Macroglobulin“ entsteht. Dieses wird dann 1:1 verdünnt mit 1X „Diluent M“. Es entsteht 1X „Biotinylated alpha 2 Macroglobulin“.

Für den ELISA werden sieben Standardproben benötigt. Für den ersten Standard (40 µl/ ml) werden 1200 µl „Diluent M“ (1X) zu den 48 µg „alpha 2 Macroglobulin Standard“ hinzugegeben und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Standards 2-6 werden 120 µl Diluent M (1X) in Eppis vorgelegt und je 120 µl des vorigen Standards in den jeweils nächsten Standard überpipettiert. Standard 7 ist ein Blank, in den nur 120 µl „Diluent M“ (1X) hinzugegeben werden.

Wenn diese Vorbereitungen gemacht wurden, wird die Platte pipettiert. In jedes Well wird 25 µl Standard bzw. Probe gegeben. Nach jeder Befüllung wird direkt 25 µl „Biotinylated Human alpha 2 Macroglobulin“ in das gleiche Well hinzugefügt, bevor man den nächsten Standard/die nächste Probe in den folgenden Well gibt. Dann erfolgt die zweistündige Inkubation der Platte bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C, wobei die Platte vorher zugeklebt wird. Währenddessen wird das Konjugat angesetzt. Dafür wird das 100X „Streptavidin-Peroxidase Conjugate“ aufgetaut, an zentrifugiert und anschließend 1:100 mit 1X „Diluent M“ verdünnt (60 µl auf 6 ml 1X Diluent M). Um die nicht gebundenen Bestandteile zu entfernen wird die Platte gewaschen, indem in jedes Well 200 µl Waschpuffer gegeben werden. Die Platte wird dann auf einem Tuch ausgeklopft. Diesen Waschschrift führt man insgesamt fünfmal durch. Dann wird in jedes Well 50 µl Streptavidin-Peroxidase-Konjugat gegeben, welches an die biotinylierten Antigene binden. Es erfolgt eine weitere Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die ungebundenen Konjugate werden durch fünf Waschschrift, die genauso wie die vorherigen durchgeführt werden, abgewaschen. Damit eine Farbreaktion entsteht, wird das Chromogensubstrat (50 µl pro Well) hinzupipettiert. Spätestens nach einer Inkubationszeit von acht Minuten bei Raumtemperatur wird eine Blaufärbung sichtbar. Nach Hinzugabe der „Stop Solution“ (50 µl pro Well) wird aus dem blau eine gelbe Färbung. Zum Schluss wird die

optische Dichte der Proben in dem Mikroplattenleser BioTek EL800 gemessen, der auf 450 nm eingestellt ist.

#### 3.3.8.1.2. Vitamin D

Statt des aktiven Vitamin Ds wurde die Konzentration der inaktiven Vitamin-D-Vorstufe gemessen, nämlich das 25(OH)D, welches als geeigneter Messparameter angesehen wird (Holick *et al.*, 2011). Das 25(OH)D spiegelt wider, wie viel aktives Vitamin D der Körper produzieren könnte und ist damit ein geeigneter Messparameter. Das aktive Vitamin D (1,25(OH)<sub>2</sub>D) wird nur bei Bedarf, also z.B. bei Calcium- oder Phosphatmangel, aus seiner aktiven Vorstufe synthetisiert (Anderson *et al.*, 2004). Es ist so vermehrt Schwankungen ausgesetzt und daher nicht aussagekräftig.

Bei der Vitamin-D-ELISA werden Proben/Standards und das „Alkaline phosphatase Conjugate“ hinzugegeben. Beide konkurrieren um die Antikörper, die sich auf der Platte befinden. Durch Zugabe eines Antikörperkonjugats, welches sich an das „Alkaline phosphate Conjugate“ heftet, und der „pNpp Substrat Solution“ entsteht eine Farbreaktion. Diese wird durch die „Stop solution“ beendet und mit dem BioTek EL800 bei 405 nm gemessen (ab213966 25(OH) Vitamin D ELISA kit, Abcam, Version 2, 2017).

Es wurde das ab213966 25(OH) Vitamin D ELISA Kit (Abcam, Cambridge, England) verwendet. Als Vorbereitung werden alle Reagenzien und Plasmaproben auf Raumtemperatur gebracht. Von dem „Wash Buffer Concentrate“ (20X) werden 20 ml mit 380 ml Aqua Bidestillata vermischt und 50 µl 25(OH) „Vitamin D Conjugate“ (100X) werden mit 5 ml „25(OH) Vitamin D Conjugate Diluent“ verdünnt. Dann wird in alle Wells 90 µl „Dissociation Buffer“ gegeben und 10 µl von der jeweiligen Plasmaprobe bzw. dem jeweiligen Standard. In die Bo- und NSB- Wells werden 10 µl „Sample Diluent“ gegeben. Die Platte wird nach diesem Vorgang fünf Minuten auf dem rotierenden Plattformschüttler (200 rpm) bei Raumtemperatur inkubiert. Beim nächsten Schritt werden 50 µl 1X „25(OH) Vitamin D Conjugate“ in alle Wells, 50 µl „25(OH) Vitamin D Conjugate Diluent“ in das NSB-Well und 50 µl „25(OH) Vitamin D Antibody“ in alle Wells außer das NSB-Well pipettiert. Die befüllte Platte wird zugeklebt und eine Stunde auf dem rotierenden Plattformschüttler bei 120 rpm und Raumtemperatur inkubiert. Um die nicht gebundenen Bestandteile von der Platte zu entfernen, erfolgen drei Waschschritte mit je 400 µl „Wash Buffer“. Daraufhin werden die Wells mit je 200 µl „pNpp Substrate“ befüllt. Die Platte wird vor Licht abgedichtet und 30 Minuten lang auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Als letztes wird in jedes Well 50 µl „Stop Solution“ gegeben und die Extinktion bei 405 nm gemessen.



### 3.3.8.2. Quantitative Sandwich ELISA (TIMP2)

Das TIMP2 wurde im Gegensatz zu den anderen beiden Plasmabestandteilen mit der quantitativen Sandwich-ELISA bestimmt. Die dafür vorgesehene 96-Well-Platte ist mit Antikörpern gegen TIMP2 behaftet. Wenn man nun die Plasmaproben bzw. den Standard hinzugibt, binden die TIMP2-Antigene an die Antikörper der Platte. Als nächstes werden mit Enzymen verbundene polyklonale Antikörper in die Wells gegeben. Diese binden sich an die Antikörper der Proben. Um eine Farbreaktion entstehen zu lassen, wird dann noch die Substratlösung hinzugegeben. Die entstehende Blaufärbung wird zum Schluss gestoppt. Je stärker die Farbtintensität, desto mehr TIMP2 ist in der Probe bzw. in dem Standard enthalten. Die Intensität der Farbe wird wie bei der kompetitiven ELISA mit dem Mikroplattenleser bei 450 nm gemessen (Quantikine® ELISA Human TIMP-2 Immunoassay, R&D).

Es wurde das „*Quantikine® ELISA Human TIMP-2 Immunoassay Kit*“ (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA) verwendet.

Am Vortag werden die Eppis beschriftet und die Eppis für die Proben jeweils mit 245 µl „Assay Diluent RD5P Concentrate“ gefüllt. Die Eppis werden dann über Nacht in den Kühlschrank gelagert. Am nächsten Tag wird das Plasma und die mit „Assay Diluent RD5P Concentrate“ befüllten Eppis bis zur Weiterverarbeitung bei Raumtemperatur aufgewärmt. Wenn das Plasma aufgetaut ist, werden für jede Probe 5 µl in die vorbereiteten Eppis pipettiert, sodass die Plasmaproben um den Faktor 50 verdünnt werden.

Nun werden die anderen Reagenzien vorbereitet. 20 ml „Wash Buffer Concentrate“ wird mit 480 ml Aqua destillata verdünnt, sodass 500 ml Waschpuffer entsteht. Außerdem wird der Standard gebrauchsfertig gemacht. Dafür wird das „Human TIMP-2 Standard“ mit 1 ml Aqua destillata rekonstituiert und mindestens 15 Minuten bei Raumtemperatur stengelassen. Dann werden 7 Standards und ein Blank bereit. In Standard 1 werden 450 µl „Calibrator Diluent RD5P Concentrate“ gefüllt. In die übrigen sechs Standarddeppis und das Blankeppi werden je 250 µl „Calibrator Diluent RD5P Concentrate“ gefüllt. Nun pipettiert man 50 µl des Standard Konzentrats in das erste Standarddeppi, sodass eine Konzentration von 10 ng/ml entsteht. Von diesem ersten Standard, der vorher gemischt wird, nimmt man nun 250 µl und füllt es in Standard 2. Es entsteht eine Konzentration von 5 ng/ml. Von diesem Standard füllt man wiederum 250 µl in Standard 3 (2,5 ng/ml). Von diesem Standard 3 füllt man 250 µl in Standard 4 (1,25 ng/ml) u.s.w. Es entstehen im weiteren Standard 5 (0,625 ng/ml), Standard 6 (0,313 ng/ml) und Standard 7 (0,156 ng/ml).

Wenn die Vorbereitungen abgeschlossen sind, werden die Wells der Platte befüllt. Als erstes werden 100 µl „Assay Diluent RD1W“ in jedes Well pipettiert und dann 50 µl des Standards

bzw. der Probe hinzugegeben. Die Platte wird zugeklebt und zwei Stunden bei Raumtemperatur auf den rotierenden Plattformschüttler bei 220 rpm inkubiert. Nach den zwei Stunden wird die Platte mit dem vorbereiteten Waschpuffer viermal mit je 400 µl gewaschen. In die Wells wird daraufhin je 200 µl „Human TIMP-2 Conjugate“ gegeben, die Platte wird wieder zugeklebt und auf den rotierenden Plattformschüttler bei 220 rpm und Raumtemperatur 2 Stunden lang inkubiert. Dann erfolgt erneut ein Waschschrift viermal mit je 400 µl Waschpuffer. Das Substrat, welches im nächsten Schritt benötigt wird, wird erst kurz vor Gebrauch vorbereitet. Hierzu werden 10 ml „Color Reagent A“ und 10 ml „Color Reagent B“ gemischt. Von dem daraus resultierenden Substrat werden je 200 µl in jedes Well pipettiert. Die befüllte Platte wird 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (ohne den rotierenden Plattformschüttler). Um die Farbreaktion zu stoppen, wird abschließend 50 µl „Stop Solution“ pro Well hinzugegeben. Die Messung der Extinktion erfolgt im Mikroplattenleser BioTek EL800 bei 450 nm.

### 3.3.9. Statistik

Für die statistische Auswertung wurde das Programm MedCalc® (Version 5.00.012, Mariakerke; Belgien) verwendet. Die experimentell ermittelten Ergebnisse wurden mit ihrem Mittelwert und mit Berücksichtigung des Standardfehlers ausgewertet. Wenn eine Normalverteilung vorlag, wurde der T-Test angewendet. Wenn wiederum keine vorlag, wurde der Wilcoxon-Test benutzt.

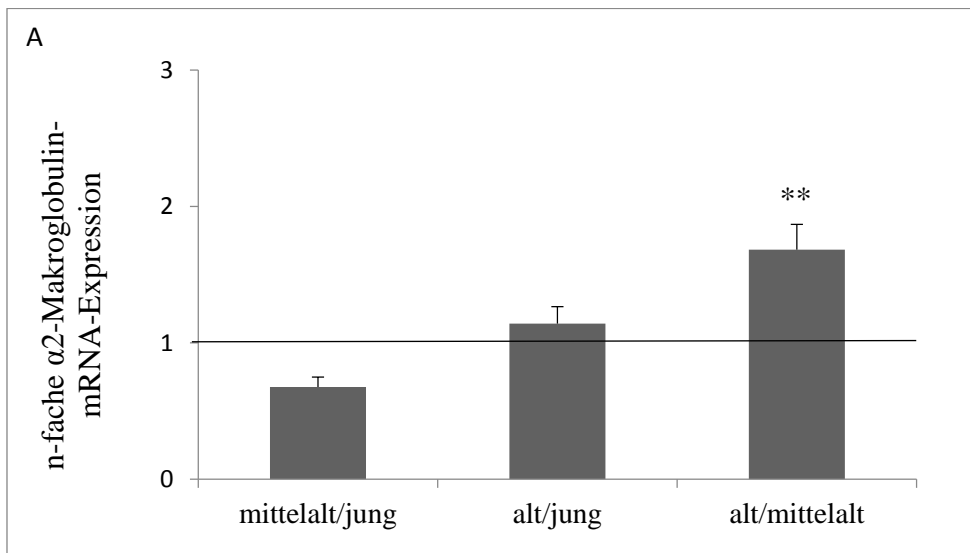
## 4. Ergebnisse

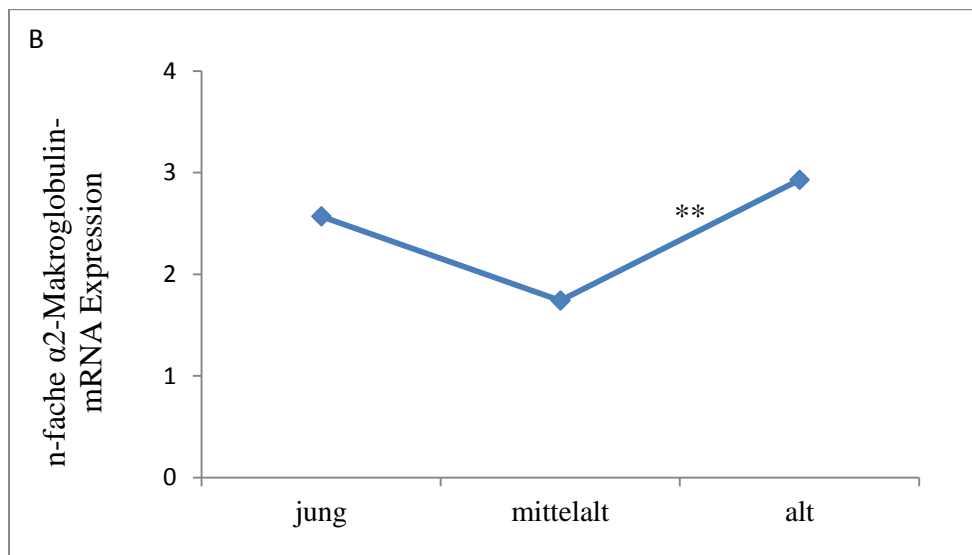
### 4.1. $\alpha$ 2-Makroglobulin

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die  $\alpha$ 2-Makroglobulin-Expression im Plasma von jungen, mittelalten und alten Studienteilnehmern auf mRNA- und Proteinebene bestimmt.

Als erstes wurde die  $\alpha$ 2-Makroglobulin-Expression mittels qRT-PCR im Plasma von jungen, mittelalten und alten Probanden bestimmt. Es werden die Expressionsverhältnisse von mittelalten zu jungen, alten zu jungen und alten zu mittelalten Probanden dargestellt. Es handelt sich hierbei um eine relative Darstellung, normiert auf das jeweilige Haushaltsgen wie unter Material und Methoden erläutert.

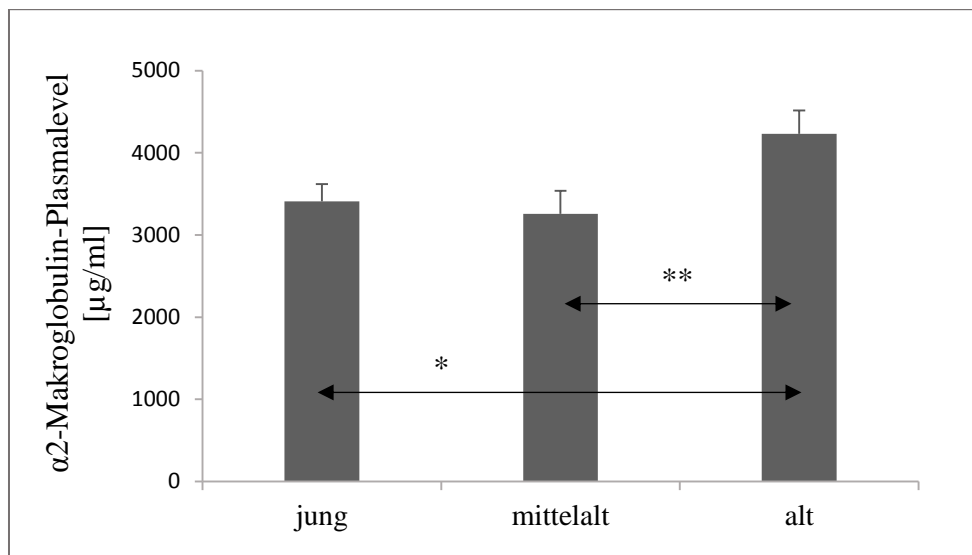
Die mittelalte Probandengruppe zeigt zwar tendenziell eine geringere  $\alpha$ 2-Makroglobulin-Expression im Vergleich zu den jungen Studienteilnehmern, diese ist jedoch nicht signifikant (Abb.1). Auch die  $\alpha$ 2-Makroglobulin-Expression im Plasma junger und alter Probanden weicht nicht signifikant voneinander ab. Ein signifikanter Anstieg der  $\alpha$ 2-Makroglobulin-Expression um 68 % ließ sich jedoch von den mittelalten Probanden zu den alten Studienteilnehmern beobachten ( $p = 0,0032$ ) wie in Abbildung 1 dargestellt.





**Abbildung 1: Relative  $\alpha$ 2-Makroglobulin-mRNA-Expression im Plasma verschiedener Altersgruppen.** Die  $\alpha$ 2-Makroglobulin-mRNA-Expression wird im Plasma alter Probanden (65-86 Jahre) signifikant hochreguliert im Verhältnis zu Probanden mittleren Alters (36-63 Jahre), ( $p = 0,0032$ ). Die RNA-Analyse wurde mittels Realtime PCR durchgeführt. Fehlerbalken beziehen sich auf den jeweiligen Standardfehler (jung:  $n = 38$ , mittelalt:  $n = 33$ , alt:  $n = 31$ ). A: Säulendiagramm, Normierung auf die junge bzw. mittelalte Studiengruppe; B: Liniendiagramm, relative Normierung der  $\alpha$ 2-Makroglobulin-mRNA-Expression auf die Expression des Haushaltsgens.

Als nächstes wurde die  $\alpha$ 2-Makroglobulin-Proteinexpression mittels ELISA im Plasma der drei Altersgruppen bestimmt. Abbildung 2 zeigt den Mittelwert der jeweiligen  $\alpha$ 2-Makroglobulin-Proteinkonzentration in Probanden jungen, mittleren und hohen Alters mit ihren jeweiligen Standardfehlern. Der Mittelwert liegt bei den jungen Probanden bei  $3407,9 \mu\text{g/ml}$  ( $\cong 3,41 \text{ g/L}$ ), bei den mittelalten Probanden bei  $3257,99 \mu\text{g/ml}$  ( $\cong 3,26 \text{ g/L}$ ) und bei den alten Probanden bei  $4230,37 \mu\text{g/ml}$  ( $\cong 4,23 \text{ g/L}$ ). Es ist ein signifikanter Anstieg der Proteinkonzentration von jungen zu alten Probanden ( $p = 0,0268$ ) zu beobachten. In Übereinstimmung mit der mRNA-Ebene zeigte sich auch ein signifikanter Anstieg von mittelalten zu alten Probanden ( $p = 0,0029$ ), während ebenfalls wie auf der mRNA-Ebene keine signifikante Veränderung der  $\alpha$ 2-Makroglobulin-Proteinexpression von jungen zu mittelalten Studienteilnehmern erkennbar war.



**Abbildung 2: α2-Makroglobulin-Proteinexpression im Plasma verschiedener Altersgruppen.** Die α2-Makroglobulin-Proteinexpression wird im Plasma alter Probanden (65-86 Jahre) signifikant hochreguliert im Verhältnis zu Probanden mittleren Alters (36-63 Jahre), ( $p = 0,0029$ ) und im Verhältnis zu jungen Studienteilnehmern (20-29 Jahre), ( $p = 0,0268$ ). Die Proteinkonzentrationen wurden mittels ELISA im Plasma der Studienteilnehmer ermittelt und sind als µg/ml dargestellt. Fehlerbalken beziehen sich auf den jeweiligen Standardfehler (jung:  $n = 38$ , mittelalt:  $n = 33$ , alt:  $n = 31$ ).

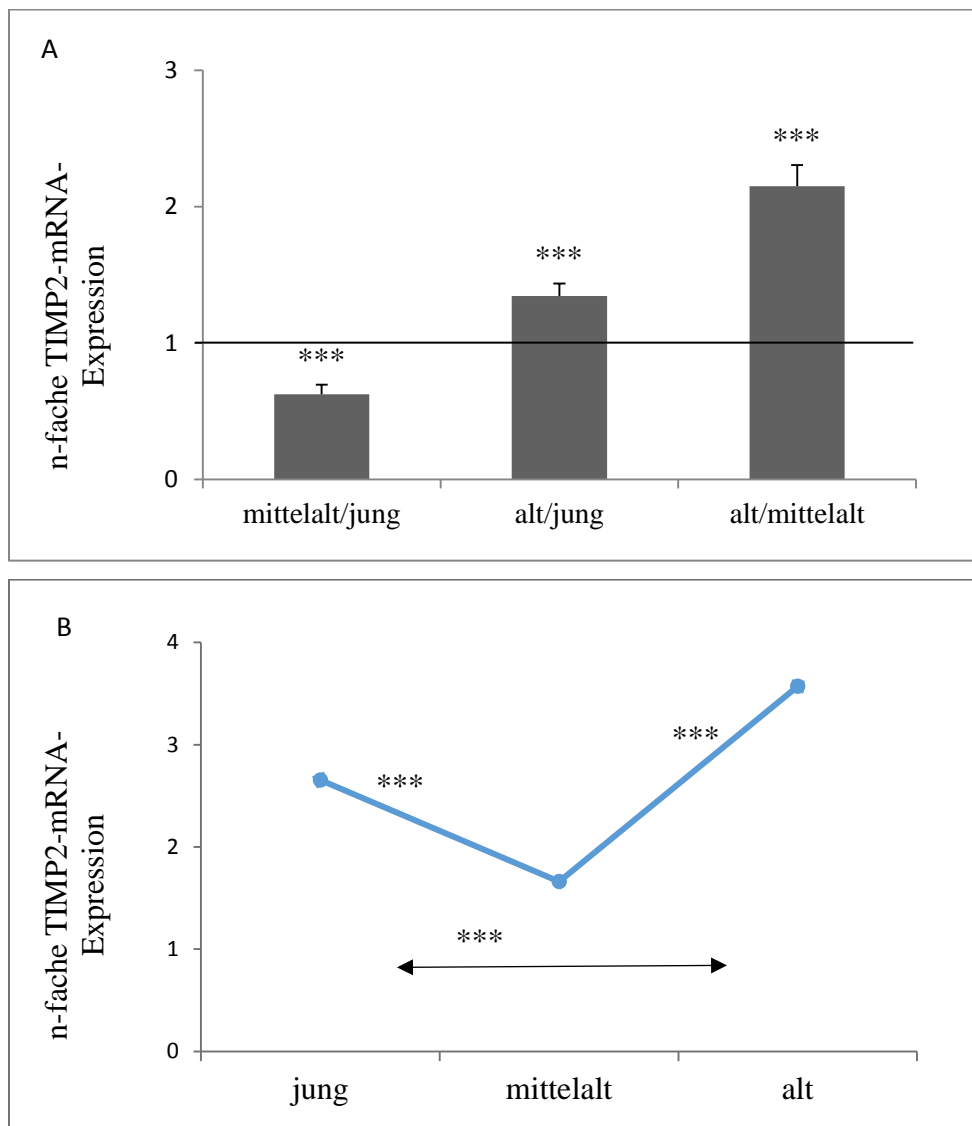
Eine signifikante Veränderung der α2-Makroglobulin Expression von jungen zu mittelalten Probanden konnte somit weder auf der mRNA- noch auf der Proteinebene beobachtet werden, sodass davon auszugehen ist, dass der Expressionsanstieg von α2-Makroglobulin erst in mittlerem Lebensalter beginnt. Nach dem Erreichen der Lebensmitte allerdings erfolgt ein signifikanter Anstieg der α2-Makroglobulin Expression von mittlerem Lebensalter bis hin zum hohen Lebensalter, wie ebenfalls sowohl auf der mRNA-Ebene als auch auf der Proteinebene in diesen Untersuchungen gezeigt werden konnte.

#### 4.2. TIMP2

Im nächsten Schritt wurde die TIMP2-Expression im Plasma der drei Altersgruppen auf mRNA- und Proteinebene bestimmt.

Zunächst wurde auch für TIMP2 die mRNA-Expression mittels qRT-PCR im Plasma von jungen, mittelalten und alten Probanden bestimmt. Es werden die Expressionsverhältnisse der verschiedenen Altersgruppen zueinander angezeigt, d. h. es werden die TIMP2-mRNA-Expressionen von mittelalten zu jungen, alten zu jungen und alten zu mittelalten Probanden dargestellt. Die mittelalte Probandengruppe (36-63 Jahre) zeigt eine signifikant geringere TIMP2-mRNA-Expression im Vergleich zu den jungen (20-29 Jahre,  $p < 0,0001$ ) wie auch zu alten Studienteilnehmern (66-85 Jahre,  $p < 0,0001$ ) (Abb. 3). Ein signifikanter Anstieg der

TIMP2-mRNA-Expression ließ sich jedoch sowohl von den jungen wie auch von den mittelalten Probanden zu den alten Studienteilnehmern beobachten ( $p < 0,0001$ ). Somit zeichnet sich folgendes Bild des altersabhängigen Expressionsverlaufes von TIMP2 auf mRNA-Ebene ab: Zunächst fällt die TIMP2-mRNA-Expression im Rahmen des Alterungsprozesses von jungen zu Menschen mittleren Lebensalters ab, um in der Lebensmitte wieder signifikant bis ins Alter anzusteigen (Abb.3).

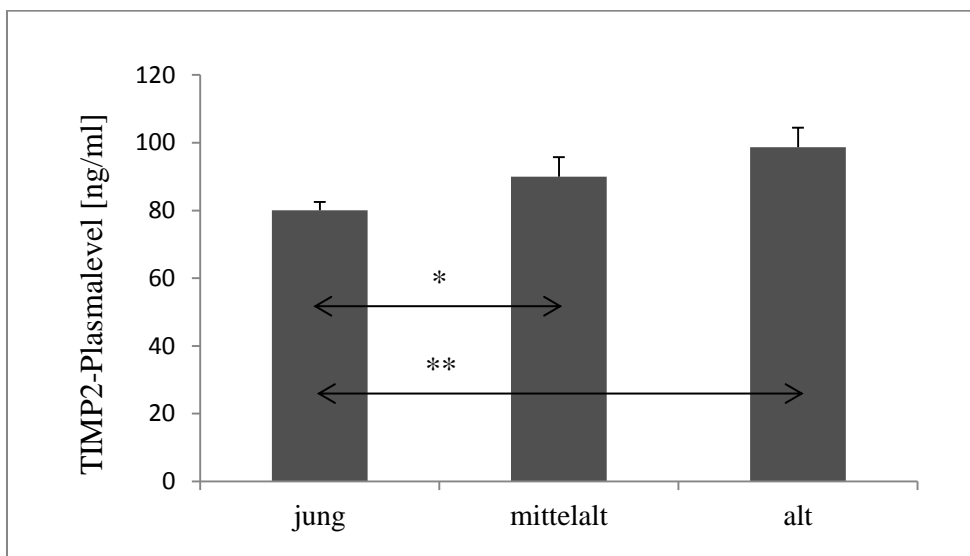


**Abbildung 3: Relative TIMP2-mRNA-Expression im Plasma verschiedener Altersgruppen.** Die TIMP2-mRNA-Expression wird im Plasma alter Probanden (65-86 Jahre) signifikant hochreguliert im Verhältnis zu Probanden mittleren Alters (36-63 Jahre,  $p < 0,0001$ ) und im Verhältnis zu jungen Probanden (20-29 Jahre,  $p < 0,0001$ ). Probanden mittleren Alters zeigen die geringste TIMP2-mRNA-Expression im Vergleich zu jungen und alten Probanden. Die RNA-Analyse wurde mittels Realtime PCR durchgeführt. Fehlerbalken beziehen sich auf den jeweiligen Standardfehler (jung:  $n = 38$ , mittelalt:  $n = 33$ , alt:  $n = 31$ ). A: Säulendiagramm, Normierung auf die junge bzw. mittelalte Studiengruppe; B: Liniendiagramm, relative Normierung der TIMP2-mRNA-Expression auf die Expression des Haushaltsgens.

Als nächstes wurde die TIMP2-Proteinexpression mittels ELISA im Plasma der drei Altersgruppen bestimmt. Abbildung 4 zeigt den Mittelwert der jeweiligen TIMP2-Proteinkonzentration in Probanden jungen, mittleren und hohen Alters mit ihren jeweiligen Standardfehlern.

Der Mittelwert der jungen Probanden beträgt 80,09 ng/ml, der Mittelwert für mittelalte Probanden 89,94 ng/ml und der Mittelwert für die alten Probanden 98,7 ng/ml. Es ist ein signifikanter Anstieg der TIMP2-Proteinkonzentration von jungen Probanden zu Probanden mittleren Alters ( $p = 0,029$ ) wie auch zu den alten Probanden ( $p = 0,003$ ) zu beobachten. Es erfolgte auch ein tendenzieller Expressionsanstieg von der mittelalten Probandengruppe zu den alten Studienteilnehmern, sodass man auf der Proteinebene von einem kontinuierlichen Anstieg der TIMP2-Proteinexpression von den jungen Studienteilnehmern über die mittelalte Gruppe hin zu den alten Probanden sprechen kann.

Es wurde somit sowohl auf der mRNA-Ebene wie auch auf der Proteinebene ein signifikanter Anstieg der TIMP2-Expression gemessen, so dass davon ausgegangen werden darf, dass die TIMP2-Expression zum Alter hin zunimmt.



**Abbildung 4: TIMP2-Proteinexpression im Plasma verschiedener Altersgruppen.** Die TIMP2-Proteinexpression wird sowohl im Plasma alter Probanden (65-86 Jahre) wie auch im Plasma mittelalter Studienteilnehmer (36-63 Jahre) im Verhältnis zu den jungen Probanden (20-29 Jahre) signifikant hochreguliert ( $p = 0,029$  und  $0,003$  respektive).

Die Proteinkonzentrationen wurden mittels ELISA im Plasma der Studienteilnehmer ermittelt und sind als ng/ml dargestellt. Fehlerbalken beziehen sich auf den jeweiligen Standardfehler (jung:  $n = 38$ , mittelalt:  $n = 33$ , alt:  $n = 31$ ).

### 4.3. Vitamin D

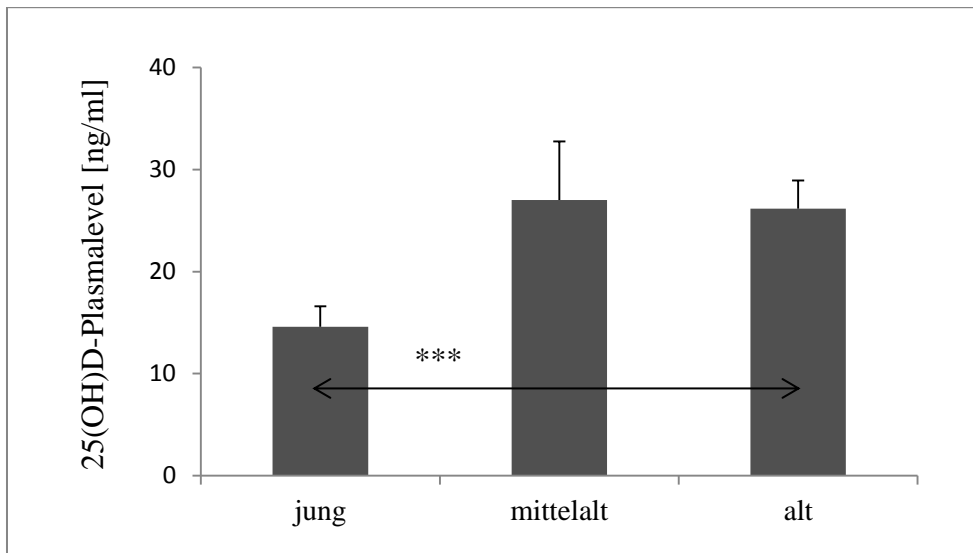
Nach der Untersuchung der zwei Plasmaproteine  $\alpha$ 2-Makroglobulin und TIMP2 wurde abschließend noch die Expression eines Vitamins im Plasma der drei Altersgruppen bestimmt. Es handelt sich hierbei um Vitamin D, auch Calciferol genannt, welches im Gegensatz zu  $\alpha$ 2-Makroglobulin und TIMP2 kein Protein, sondern ein Steroid darstellt. Die hier beschriebene Untersuchungsform ist das 25(OH)D und wurde in dieser Arbeit gemessen, da sie eine Synthesestufe des Vitamin D ist, die im Gegensatz zu Vitamin D nicht nur bei Bedarf ausgeschüttet wird. 25(OH)D ist daher ein zuverlässiger Messparameter des Vitamin-D-Haushalts.

Das in Abbildung 5 dargestellte Diagramm der ELISA-Ergebnisse gibt die durchschnittliche 25(OH)D-Konzentrationen [ng/ml] von jungen, mittelalten und alten Probanden mit dem jeweiligen Standardfehler wieder.

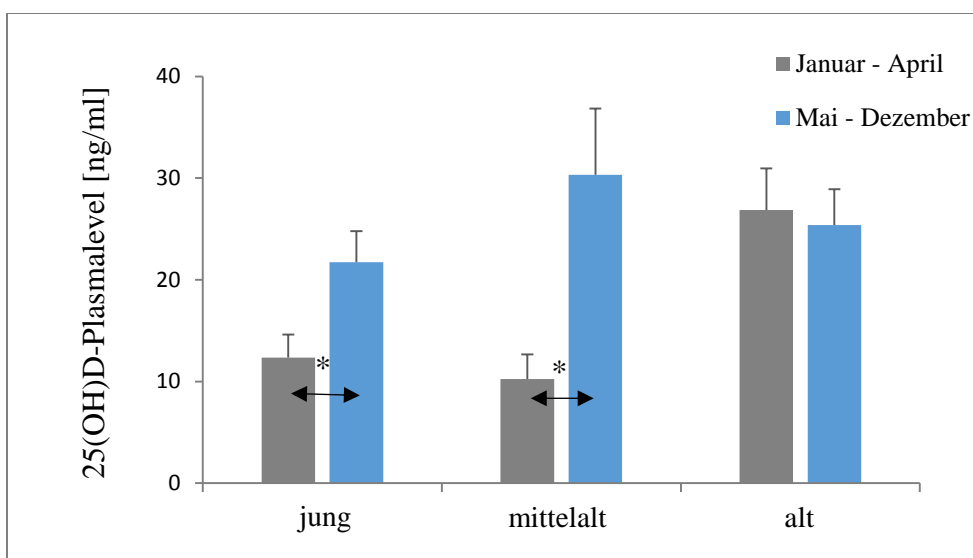
Laut Erhebungen aus dem Iran und aus Rumänien (Asadi *et al.*, 2013; Chirita-Emandi *et al.*, 2015) sind 25(OH)D-Konzentrationen von 30-100 ng/ml ausreichend, um eine normale Versorgung mit Vitamin D zu gewährleisten. Von einer Insuffizienz spricht man bei einer 25(OH)D-Konzentration von 21-29 ng/ml und von einem Mangel bei einer 25(OH)D-Konzentration unter 20 ng/ml. Laut dieser Definition wiesen die jungen Studienteilnehmer einen Vitamin-D-Mangel auf, während die mittelalten und alten Probanden eine Vitamin-D-Insuffizienz zeigten wie dargestellt in Abbildung 5. Laut dem Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) deuten jedoch schon 25(OH)D-Serumwerte von  $\geq 20$  ng/ml ( $\geq 50$  nmol/L) auf eine adäquate Versorgung hin, währenddessen Werte zwischen 12 und 20 ng/ml (30 -50 nmol/L) auf eine Insuffizienz und Werte kleiner 12 ng/ml ( $< 30$  nmol/L) einen Mangel darstellen (Ehlers, 2013). Bei dieser Einteilung würde sich eine insuffiziente Versorgung mit Vitamin D bei den jungen Probanden und eine adäquate Vitamin-D-Versorgung bei den mittelalten und alten Probanden ergeben. Beiden Einteilungen gemeinsam sind die nicht ausreichende Vitamin-D-Versorgung bei den jungen Probanden.

Junge Probanden zeigen eine mittlere Konzentration von 14,61 ng/ml, mittelalte Probanden von 27 ng/ml und alte Probanden von 26,18 ng/ml. Ein signifikanter Anstieg der Vitamin-D-Konzentration erfolgt von jungen zu alten Probanden ( $p = 0,0004$ ). Weder der Anstieg von jung zu mittelalt noch die Veränderung von mittelalt zu alt ist signifikant.





**Abbildung 5: 25(OH)D-Expression im Plasma verschiedener Altersgruppen.** Die 25(OH)D-Expression wird im Plasma alter Probanden (65-86 Jahre) im Verhältnis zu den jungen Probanden (20-29 Jahre) signifikant hochreguliert ( $p=0,0004$ ). Die 25(OH)D-Konzentrationen wurden mittels ELISA im Plasma der Studienteilnehmer ermittelt und sind als ng/ml dargestellt. Fehlerbalken beziehen sich auf den jeweiligen Standardfehler (jung:  $n = 38$ , mittelalt:  $n = 33$ , alt:  $n = 31$ ).



**Abbildung 6: Konzentration von 25(OH)D im Plasma junger, alter und mittelalter Probanden im 1.-4. Monat im Vergleich zum 5.-12. Monat des Jahres**

In Abbildung 6 ist die Plasmakonzentration des 25(OH)D in ng/ml in Abhängigkeit von der Altersgruppe und den Monaten des Jahres angegeben. Die jungen und die mittelalten Probanden bilden in den Monaten von Januar bis April weniger Vitamin D als im restlichen Jahr. Die jungen Probanden zeigen in den Monaten Januar bis April eine 25(OH)D-Konzentration von durchschnittlich 12,34 ng/ml, im restlichen Jahr hingegen eine signifikant höhere Konzentration von durchschnittlich 21,73 ng/ml ( $p = 0,0191$ ). Damit ergibt sich für die jungen

Probanden in den ersten Monaten des Jahres im Vergleich zum restlichen Jahr ein signifikanter Anstieg ihrer 25(OH)D-Expression. Die mittelalten Probanden zeigen in den Monaten Januar bis April einen 25(OH)D-Mittelwert von 10,25 ng/ml und im restlichen Jahresverlauf einen signifikant höheren Mittelwert von 30,34 ng/ml ( $p = 0,0469$ ). Damit ergibt sich auch für die Studienteilnehmer mittleren Alters in den ersten Monaten des Jahres im Vergleich zum restlichen Jahr ein signifikanter Anstieg ihrer 25(OH)D-Expression Die alten Probanden zeigen im Jahresverlauf keine signifikante Veränderung ihrer 25(OH)D-Konzentration.

## 5. Diskussion

### 5.1. $\alpha$ 2-Makroglobulin

Im Rahmen dieser Arbeit wurde  $\alpha$ 2-Makroglobulin bei jungen (Altersspanne: 20 - 29 Jahre), mittelalten (Altersspanne: 36 -63 Jahre) und alten Erwachsenen (Altersspanne: 65 – 86 Jahre) auf Proteinebene mittels ELISA und auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR untersucht. Es stellte sich beim ELISA eine signifikant höhere  $\alpha$ 2-Makroglobulin-Konzentration bei den alten sowohl im Vergleich zu den jungen als auch zu den mittelalten Erwachsenen heraus. Bei der PCR zeigte sich eine signifikant höhere  $\alpha$ 2-Makroglobulin-Expression bei den alten im Vergleich zu den mittelalten Erwachsenen.

An humanen Leukozyten stellte man bereits mittels Northern Blot und qRT-PCR fest, dass die  $\alpha$ 2-Makroglobulin-Expression bei den alten Leukozyten, die aus 65– bis 70- jährigen Menschen gewonnen wurden, im Vergleich zu Neugeborenenleukozyten signifikant hochreguliert war. Die Leukozytenisolation erfolgte aus peripheren Blutproben. Die Autoren schlossen aus ihren Ergebnissen, dass die  $\alpha$ 2-Makroglobulin-mRNA-Expression ein geeigneter Biomarker für das Altern *in vivo* wäre (Ma *et al.*, 2004). Die Ergebnisse und die darausgewonnene Schlussfolgerung entsprechen den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, in der ebenfalls eine Altersassoziation festgestellt wurde mit einer erhöhten  $\alpha$ 2-Makroglobulin-mRNA-Expression bei alten im Gegensatz zu jüngeren Probanden. Allerdings wurden in der vorliegenden Arbeit keine Neugeborenen untersucht, dafür aber junge und mittelalte Erwachsene.

$\alpha$ 2-Makroglobulin könnte bei der alten Gruppe im Gegensatz zu der jungen und mittelalten Gruppe wegen des vermehrten Vorkommens von altersassoziierten Krankheiten erhöht sein. Denn bei den Krankheiten Myokardinfarkt (Annapoorani *et al.*, 2006), Alzheimer Demenz (Blacker *et al.*, 1998), Parkinson (Hu *et al.*, 1996), Atherosklerose (Grabowska-Bochenek *et al.*, 1990) und koronare Herzkrankheit (KHK) (Mori *et al.*, 1995) spielt  $\alpha$ 2-Makroglobulin eine wichtige Rolle. All diese Krankheiten sind mit dem Alter assoziiert (Stewart *et al.*, 2016; Guerreiro *et al.*, 2015; Kotagal *et al.*, 2014; Beaufrère *et al.*, 2013).

In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass Diabetiker mit einem Postmyokardinfarkt eine höhere Konzentration an  $\alpha$ 2-Makroglobulin aufweisen als Diabetiker ohne Postmyokardinfarkt (Annapoorani *et al.*, 2006).

Bei der Alzheimer-Demenz wurde eine signifikante Verbindung zwischen  $\alpha$ 2-Makroglobulin und dieser neuronalen Erkrankung festgestellt (Blacker *et al.*, 1998).  $\alpha$ 2-Makroglobuline sind

in Alzheimer-Demenz-Gehirnen erhöht, weil die Neuronen bei Gehirnen von Alzheimer Patienten die Orte der  $\alpha 2$ -Makroglobulin-Synthese sind (Bauer *et al.*, 1991).

Eine andere Studie zeigte, dass eine  $\alpha 2$ -Makroglobulin-Akkumulation im zentralen Nervensystem neurodegenerative Veränderungen bewirken kann, die bei der Parkinson-Erkrankung auftreten (Hu *et al.*, 1996).

Bei der Untersuchung der Korrelation zwischen  $\alpha 2$ -Makroglobulin und Atherosklerose verglich man Kaninchen, die eine experimentell herbeigeführte Atherosklerose hatten, mit gesunden Kaninchen. Kaninchen mit Atherosklerose hatten eine um 86% erhöhte  $\alpha 2$ -Makroglobulin-Konzentration im Blut, welches eine eindeutige Verbindung zwischen  $\alpha 2$ -Makroglobulin und dieser Gefäßerkrankung darstellt (Grabowska-Bochenek *et al.*, 1990). Dementsprechend war  $\alpha 2$ -Makroglobulin auch signifikant mit der Atherosklerose der Koronargefäße assoziiert, was zu der im Alter häufiger auftretenden KHK führt (Mori *et al.*, 1995).

Ein weiterer Grund für die  $\alpha 2$ -Makroglobulin-Erhöhung im Alter könnte die antiapoptotische Wirkung des  $\alpha 2$ -Makroglobulins sein (De Souza *et al.*, 2008; Ikari *et al.*, 2001). Die Apoptose ist genetisch festgelegt und im Alter erhöht. Der Körper könnte  $\alpha 2$ -Makroglobulin daher vermehrt im Alter ausschütten, um der Apoptose entgegen zu wirken. Die Verhinderung der genetisch festgelegten Apoptose gelingt aber nicht vollständig, sondern wäre nur in abschwächender Form möglich.

Außerdem ist  $\alpha 2$ -Makroglobulin bei Immunreaktionen von Bedeutung. Es könnte daher auch bei Krankheiten erhöht sein, die das Starten von Immunreaktionen bewirken. Denn bei  $\alpha 2$ -Makroglobulin handelt es sich um einen Protease-Hemmer (Cheng *et al.*, 1990). Diese spielen eine wichtige Rolle bei der Unterstützung des Immunsystems (Bowers *et al.*, 2009), bei Entzündungsreaktionen (Canova *et al.*, 2015) und bei der Kontrolle des Gerinnungssystems (Harpel, 1970).

Das Immunsystem wird durch  $\alpha 2$ -Makroglobulin unterstützt, indem  $\alpha 2$ -Makroglobulin die Antigen-spezifische zytotoxische T-Zell(CTL)-Immunität steigert. Bei Mäusen wurde dies untersucht. Es zeigte sich eine gesteigerte humorale und CTL-Antwort (Bowers *et al.*, 2009).

Bei Entzündungsreaktionen hat  $\alpha 2$ -Makroglobulin modulatorische Eigenschaften. Es fördert die Leukozytenmigration in entzündliche Gewebe und verstärkt die phagozytische Makrophagenfunktion (Canova *et al.*, 2015).

Da alte Menschen anfälliger für immunsystemauslösende Krankheiten, wie z. B. die Influenza (Buda *et al.*, 2018) sind, was eine vermehrte Bildung des  $\alpha 2$ -Makroglobulins notwendig

machen könnte, wäre dies eine weitere mögliche Erklärung für die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit.

Desweiteren ist  $\alpha$ 2-Makroglobulin bei dem Gleichgewicht der Hämostase von Bedeutung. Denn es hemmt sowohl Plasmin (Schaller *et al.*, 2011) als auch Thrombin (Straight *et al.*, 1984). Die Bedeutung der Thrombin-Hemmung wird bei Mangel des Globulins deutlich. Denn hierbei kommt es zu einem erhöhten Verbrauch von Heparin-Cofaktoren durch exogene Thromben (Fischer *et al.*, 1981). Außerdem erhöht sich reaktiv der  $\alpha$ 2-Makroglobulin-Spiegel, wenn der andere Gegenspieler des Thrombins, nämlich das Antithrombin, durch einen angeborenen Mangel vermindert ist. Hierdurch erklärt sich der besonders hohe  $\alpha$ 2-Makroglobulin-Spiegel asymptomatischer Menschen, die durch das hohe  $\alpha$ 2-Makroglobulin gut vor Thrombosen geschützt sind (Tripodi *et al.*, 2000).

Deshalb haben Menschen mit angeborenem  $\alpha$ 2-Makroglobulin-Mangel die gesteigerte Tendenz, auch arterielle Thrombosen zu bilden (Branson *et al.*, 1984).

Multimorbide ältere Menschen (Violan *et al.*, 2014) zeigen eine zunehmende Immobilität und damit eine höhere Thromboseneigung. Dies wiederum könnte den erhöhten  $\alpha$ 2-Makroglobulin-Spiegel im Alter als Reaktion darauf erklären.

Zusammenfassend könnte  $\alpha$ 2-Makroglobulin im Alter aufgrund von in diesem Lebensabschnitt vermehrten altersassoziierten und immunsystemauslösenden Krankheiten und als Reaktion auf die Zellapoptose erhöht sein. Dieses würde die erhöhte  $\alpha$ 2-Makroglobulin-Expression bei den alten Probanden im Gegensatz zu den jungen und mittelalten Probanden erklären.

## 5.2. TIMP2

Das zweite Plasmaprotein, das im Rahmen dieser Arbeit analysiert wurde, war TIMP2, das in den gleichen Probandengruppen wie  $\alpha$ 2-Makroglobulin hinsichtlich seiner mRNA- und Proteinexpression mittels qRT-PCR und ELISA untersucht wurde. Es zeigte sich auf der Proteinebene sowohl bei den alten Studienteilnehmern wie auch bei den Studienteilnehmern mittleren Alters eine signifikant höhere TIMP2-Plasmakonzentration im Vergleich zu den jungen Probanden. Auf der mRNA-Ebene zeigte der altersabhängige Expressionsverlauf von TIMP2 zunächst einen signifikanten Abfall, d. h. die TIMP2-mRNA-Expression nahm im Rahmen des Alterungsprozesses von jungen zu Menschen mittleren Lebensalters ab, um in der Lebensmitte jedoch wieder signifikant bis ins Alter anzusteigen. Somit ergeben sich

Unterschiede auf der Transkriptions- und Translationsebene für die altersabhängige TIMP-2-Expression.

Diese Expressionsunterschiede zwischen ELISA und qRT-PCR lassen sich durch posttranskriptionelle und posttranslationale Prozesse erklären, die die Regulation der TIMP-2 Synthese und Menge beeinflussen.

Ebenso wie die vorliegende Arbeit überprüfte auch die Studie von Komosinska-Vassev (Komosinska-Vassev *et al.*, 2011) die TIMP2-Konzentration im menschlichen Plasma. Sie teilten die Probanden im Alter von 6-62 Jahren in Dekaden mit je 8-15 Probanden ein und benutzten die ELISA zur Bestimmung. Das Ergebnis war ein erniedrigter TIMP2-Plasmagehalt im Alter (Komosinska-Vassev *et al.*, 2011). Im Gegensatz dazu wurde in der vorliegenden Dissertationsarbeit die Einteilung in drei Altersgruppen mit je 31-38 Personen gemacht, wobei die Gruppe der jungen Probanden erst mit 20 Jahren und die Gruppe der alten Probanden mit 65 Jahren beginnt und bis 86 Jahre reicht. Sie umfasst also ältere Probanden als in der von Komosinska-Vassev durchgeführten Untersuchung und keine Probanden im Kindesalter. Zudem wurde zum TIMP2-Nachweis nicht nur die Proteinbestimmung mittels ELISA vollzogen, sondern auch die mRNA-Expressionsbestimmung mittels qRT-PCR. Im Vergleich zur Studie von Komosinska-Vassev, bei der die TIMP2-Plasmakonzentration mit zunehmendem Alter abnimmt, war TIMP2 in der vorliegenden Arbeit sowohl bei der ELISA-Bestimmung als auch bei der qRT-PCR im Alter signifikant erhöht.

Für die anderen Studien, die die TIMP2-Konzentration altersabhängig prüften, wurden Gewebeproben untersucht. Die Vergleichbarkeit mit diesen ist daher nur eingeschränkt möglich. Die TIMP2-Menge im Gewebe könnte aber mit der Menge, die zuvor im Blutkreislauf transportiert wurde, korrelieren. So könnte das Blut, in dem die Konzentration von TIMP2 in der vorliegenden Arbeit bestimmt wurde, als Transportmedium des Körpers betrachtet werden, um TIMP2 an die jeweiligen pathologischen Loci zu bringen.

Ein im Alter gleichbleibender TIMP2-Gehalt im Gewebe war bei paradontalen Ligament-Zellen mit 15-20-jährigen und über 60-jährigen Probanden mithilfe einer Genexpressionsanalyse festgestellt worden (Benatti *et al.*, 2008).

Jedoch fehlte die mittelalte Gruppe (20-30-Jährige). Es wurde nur eine sehr junge Gruppe (15-20-Jährige) und eine alte Gruppe (> 60-Jährige) untersucht. Die vorliegende Arbeit verglich keine unter 20-Jährigen, sie untersuchte jedoch mittelalte Probanden. Daher kann man keinen direkten Vergleich ziehen zwischen den Ergebnissen von Benatti *et al.* (Benatti *et al.*, 2008) und

den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, die einen Unterschied zwischen 20-30-Jährigen, 40-60-Jährigen und > 65-jährigen herausstellte.

Wiederum andere Studien untersuchten tierisches Gewebe. So bestimmte eine experimentelle Studie die Fibrosierung des linken Ventrikels in Abhängigkeit von Alter, Passivzigarettenrauch und TIMP2- bzw. MMP-Konzentrationen bei zwölf Ratten. Sie überprüften die TIMP2 Proteinexpression in Ventrikelgewebe von Ratten mit der Western Blot Technik. Ein zunehmendes Alter und Passivrauchen gingen mit einer verstärkten Fibrose einher sowie mit einer TIMP2-Verminderung und MMP-Erhöhung (Wu *et al.*, 2016).

Allerdings benutzte Ja-Ping Wu (Wu *et al.*, 2016) insgesamt nur zwölf Ratten, in der vorliegenden Arbeit wurden dahingegen über 30 menschliche Probanden pro Altersgruppe untersucht (38, 33 bzw. 31 Probanden) und tierexperimentelle Studienergebnisse korrelieren nicht notwendigerweise mit humanen Studienergebnissen.

Andere tierexperimentelle Studien, die allerdings den TIMP2-Gehalt in isolierten Organen und Gewebe untersucht haben, haben im Alter erhöhte TIMP2-Werte in Ratten- und Mäusegewebe gefunden (Calabresi *et al.*, 2007; Koike *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2004).

In Zusammenschau der Literaturfälle und der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist die Altersabhängigkeit der TIMP2-Konzentration wahrscheinlich, wobei in verschiedenen anderen Untersuchungen im Alter ebenfalls eine signifikante Konzentrationserhöhung beobachtet wurde.

Die im Alter vorliegende Erhöhung des TIMP2s könnte als eine Reaktion des Körpers auf Alterung und Apoptose interpretiert werden.

Denn eine TIMP2-Erhöhung führt laut Yu (Yu *et al.*, 2014) zu einer Alterungsverzögerung in der Haut bzw. laut Lei (Lei *et al.*, 2010) zu einer Alterungsverzögerung in den Gefäßen.

Im jungen Alter ist TIMP2 für die Verzögerung noch nicht nötig, da die Alterung noch nicht oder kaum ein schädliches Maß angenommen hat. Eine TIMP2-Erhöhung könnte also die Folge eines Kompensationsversuches des Körpers gegen Organalterung sein. Dieser bleibt aber erfolglos aufgrund der genetisch festgelegten Apoptose der Körperzellen. Diese im Alterungsprozess festgelegte Apoptose kann jedoch auch durch die anti-apoptotische Wirkung des TIMP2 herunterreguliert werden (Smame *et al.*, 2013; Liang *et al.*, 2015), was wiederum die vermehrte TIMP2-Expression im Alter erklären könnte.

Eine weitere Erklärung für die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit könnte die im Alter vorhandene Multimorbidität sein.

Laut der DEGAM-Leitlinie von 2017 bedeutet Multimorbidität „das gleichzeitige Vorliegen mehrerer chronischer Erkrankungen (drei oder mehr)“ (Scherer *et al.*, 2017) und liegt bei alten Menschen bei 55 %-98 %, d. h. je älter man wird, desto häufiger tritt Multimorbidität auf (Violan *et al.*, 2014; Marengoni *et al.*, 2011).

Zu den Erkrankungen, in denen die TIMP2-Konzentration signifikant erhöht ist, gehören unter anderem Krebs, die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD), Thrombosen und Fibrose.

Es gibt Hinweise, dass eine erhöhte TIMP2-Konzentration vor Krebs schützt. So verhindert TIMP2 das Tumorwachstum durch Hemmung der für das Tumorwachstum verantwortlichen Metalloproteasen (Cal *et al.*, 2015; Kaimal *et al.*, 2013). Zudem hat TIMP2 eine Metalloprotease-unabhängige tumorhemmende Wirkung und einen regulierenden Effekt auf die Tumormikroumgebung. Es kommt durch TIMP2 zu einer reduzierten endothelialen Zellproliferation und reduzierten Migration des Tumors (Remillard *et al.*, 2014). Außerdem sorgt ein erhöhter TIMP2-Spiegel für weniger Angiogenese im gealterten Gewebe (Koike *et al.*, 2003), was dem Tumorwachstum entgegenwirkt. Mutationen, die zu Tumoren führen, sind im Alter viel häufiger als in jungen Jahren und werden nicht mehr entsprechend repariert.

Dies könnte auch als Erklärung herangezogen werden, warum TIMP2 im Alter erhöht ist.

So sind viele Erhebungen vorhanden, die eine erhöhte TIMP2-Konzentration bei Tumorkranken nachgewiesen haben (Shaker *et al.*, 2011; Gültekin *et al.*, 2015; Pietruszewska *et al.*, 2016; Rooprai *et al.*, 2016).

Jedoch gibt es auch Studien, die eine erniedrigte TIMP2-Konzentration in Tumorkranken nachgewiesen haben (Yi *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2017), möglicherweise weil die TIMP2-Expression von den Tumorzellen inhibiert werden könnte.

Ein anderer Grund für die Assoziation von TIMP2 mit altersbedingten Krankheiten könnte die Imbalance zwischen Metalloproteinasen und TIMP2 sein. Es ist wichtig, dass der Organismus eine ausgewogene Menge an TIMP2 und Metalloproteinasen hat. Ein Ungleichgewicht würde zu erhöhtem Abbau (wegen relativ zu viel MMPs) oder erhöhtem Aufbau (wegen relativ zu viel TIMP2) der Extrazellulärmatrix führen. Wenn Metalloproteinasen im Alter zu stark erhöht wären, müsste der Körper reaktiv auch mehr TIMP2 exprimieren.



Dass ein Missverhältnis von TIMP2 und Metalloproteinasen Krankheiten zur Folge hat, wird in der Lunge bei COPD (Mocchegiani *et al.*, 2011) deutlich. Bei der COPD führt ein MMP/TIMP-Ungleichgewicht oder ein ADAM/TIMP-Ungleichgewicht zu einer vermehrten Extrazellulärmatrix-Zerstörung. Es ist eine Metalloproteasen-Überproduktion vorhanden. Das heißt, dass zusätzlich zu den Hauptrisikofaktoren der COPD (Rauchen, schädliche Gase und toxische Schadstoffe) auch Veränderungen in den Verhältnissen der Proteasen und Antiproteasen wichtig sind (Mocchegiani *et al.*, 2011).

Bei Überproduktion der Metalloproteasen könnte es reaktiv zu einer vermehrten TIMP2-Bildung kommen, die aber erfolglos bleiben und die Imbalance nicht ausgleichen würde, so dass der Krankheitsprozess fortschreitet.

Eine weitere Studie zeigt, dass eine nachgewiesene TIMP2-Erhöhung einhergeht mit exazerbationsfreien Intervallen der COPD (Ghanei *et al.*, 2010). Somit könnte TIMP2 als Schutzfaktor bei der COPD reaktiv gebildet werden.

COPD gilt als Erkrankung des fortgeschrittenen Erwachsenenalters. Daher könnte die TIMP2-Erhöhung in der alten Gruppe der vorliegenden Arbeit durchaus auch auf solche chronischen Lungenerkrankungen zurückgeführt werden.

Zudem sind TIMP2/MMP9-Komplexe erhöht in Thromben, die sich im Lumen von Bauchortenaneurysmen befinden (Piechota-Polanczyk *et al.*, 2015), ebenso sind TIMP2 und MMPs vermehrt in frischen aber nicht in lytischen oder organisierten Thromben (Li *et al.*, 2016). Eine erhöhte TIMP2-Konzentration könnte also auch für Thromben im Organismus sprechen. Da eine Thromben-Prävalenzsteigerung von jung zu alt im Menschen vorliegt (Engbers *et al.*, 2015), könnte dies unter anderem auch ein Grund für die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sein.

Der TIMP2-Wert sollte schließlich auch nicht zu hoch sein, da sich dann ein Ungleichgewicht zwischen MMPs und TIMP2 bilden würde. Dies kann einen zu hohen Extrazellulärmatrixaufbau wie bei der Fibrose zur Folge haben.

Es gibt Erhebungen, die ein erhöhtes TIMP2 bei Gewebsfibrose festgestellt haben. Ein erhöhtes TIMP2 wurde in Penisfibrosen nachgewiesen (Wan *et al.*, 2018). Zudem führen erniedrigte MMP2/TIMP2-Verhältnisse (d. h. MMP ist niedrig und TIMP2 ist hoch) zu vermehrter Extrazellulärmatrixablagerung und damit zu Leberfibrose und zu einer Verschlechterung der Leberfunktion (Yang *et al.*, 2011).

Dadurch, dass Alter ein Prädiktor für Fibrose ist (Cochet *et al.*, 2015), wäre dies noch eine andere Erklärung der Untersuchungsergebnisse der vorliegenden Arbeit.

Zusammenfassend könnte die TIMP2-Erhöhung im Alter als eine Reaktion des Körpers auf Alterung, Apoptose und zunehmende Multimorbidität interpretiert werden.

Die Folge der Ergebnisse bei der alten Gruppe im Gegensatz zur jungen und mittelalten Gruppe könnte ein sich günstig auf die altersgeschwächte Gesundheit der Probanden auswirkendes Resultat sein. Die Multimorbiditätsprävalenz ist zwar bei älteren Menschen hoch, sie wird jedoch durch die höheren TIMP2-Konzentrationen alter Menschen verbessert.

Andererseits ist TIMP2 ein Indikator für das Vorliegen alterungsassoziierter Erkrankungen wie Krebs, COPD, Thromben und Fibrose. Ein stetig zunehmender TIMP2-Wert von jung zu mittelalt und zu alt spricht daher auch für ein häufigeres Auftreten dieser Krankheiten.

### 5.3. Vitamin D

Als letztes wurde das Steroid Vitamin D bei den drei Altersgruppen mit Hilfe der ELISA untersucht. Hierbei wurde der zuverlässige Messparameter 25(OH)D im Serum bestimmt, der im Gegensatz zur aktiven Vitamin-D-Form (1,25(OH)<sub>2</sub>D) nicht nur bedarfsabhängig ausgeschüttet wird. Es stellte sich eine signifikant höhere 25(OH)D-Konzentration bei den jungen (20–29 Jahre) im Vergleich zu den alten Probanden (65–86 Jahre) heraus. Schließlich wurden die Altersgruppen bezüglich ihrer Blutspendezeitpunkte eingeteilt. Hierbei äußerte sich eine höhere 25(OH)D-Konzentration bei den jungen und den mittelalten (36–63 Jahre) Probanden in der ersten Hälfte des Jahres (Januar–April) im Gegensatz zum restlichen Jahr (Mai–Dezember). Bei den alten Probanden war kein Unterschied in dieser Aufteilung zu erkennen.

Es stellte sich nach der Einteilung von Asadi und Chirita-Emandi (Asadi *et al.*, 2013; Chirita-Emandi *et al.*, 2015) und der Einteilung des BfR (Ehlers, 2013) eine Vitamin-D-Unterversorgung bei den jungen Probanden heraus. Eine zusätzliche Unterversorgung bei den mittelalten und alten Probanden ergab sich nur bei der Einteilung von Asadi und Chirita-Emandi, jedoch nicht bei der BfR-Einteilung.

In mehreren Studien wurde die 25(OH)D-Konzentration in verschiedenen Altersgruppen bestimmt, um einen Rückschluss auf das Mangelmaß der Bevölkerung zu bekommen. Die Studien wurden in unterschiedlichen Gebieten durchgeführt, sodass Menschen mit anderen Gewohnheiten und Sitten erfasst wurden, die unterschiedlichen Sonnenexpositionen ausgesetzt waren. Insgesamt stellte man dabei fest, dass die Vitamin D-Unterversorgung ein weit verbreitetes Problem darstellt.

So stellte z. B. die Erhebung in Norddeutschland, die von 2008-2011 retrospektiv durchgeführt wurde, mit Hilfe eines direkten kompetitiven Chemilumineszenz Immuno-Assays eine Unterversorgung mit Vitamin D in allen Altersgruppen fest. Dabei ergab sich ein schwerer Mangel ( $< 27,5$  nmol/l) bei 30 % der Untersuchten in den Monaten von Januar bis April, wobei 25 % der jüngeren Menschen einen schweren Mangel aufwiesen (Kramer *et al.*, 2014).

Die Studien aus Rumänien (Chirita-Emandi *et al.*, 2015) und aus Australien (Daly *et al.*, 2012) wiesen wie in der vorliegenden Arbeit ein Defizit in der Vitamin-D-Versorgung nach. Jedoch dokumentierten sie konträr zu der vorliegenden Arbeit eine geringere 25(OH)D-Konzentration im höheren Alter.

Die rumänische Untersuchung stellte eine normale Vitamin-D-Versorgung nur bei 40 % der nach Alter sortierten Probanden fest. 1 % hatte eine potentiell schädliche Konzentration ( $> 100$  ng/ml), 33 % eine Insuffizienz (21-29 ng/ml), 22 % einen Mangel (10-20 ng/ml) und 4 % einen schweren Mangel ( $< 10$  ng/ml). Außerdem waren die Konzentrationen bei Frauen im Vergleich zu Männern niedriger und insgesamt in den Wintermonaten geringer. Die 80-84-Jährigen hatten den geringsten Anteil ausreichender Vitamin-D-Versorgung, nämlich nur 21 % (Chirita-Emandi *et al.*, 2015).

Ein größeres Vorkommen des Vitamin-D-Mangels bei älteren Probanden, Frauen und in Wintermonaten wurde auch bei der Studie in Australien festgestellt. Es wurden  $\geq 25$ -Jährige untersucht, von denen 31 % einen Mangel ( $< 50$  nmol/l) zeigten (Daly *et al.*, 2012). Im Gegensatz dazu nahm die Vitamin-D-Versorgung in der vorliegenden Arbeit im hohen Alter zu.

Eine Bestätigung des Ergebnisses der vorliegenden Arbeit, dass die Vitamin-D-Versorgung mit höheren Alter zunimmt, ergab sich in der von Gill (Gill *et al.*, 2014) durchgeführten Studie in Australien, bei der iranischen Studie mit postmenopausalen Frauen (Asadi *et al.*, 2013) und bei den männlichen Probanden in der DEGS1-Studie aus Deutschland (Scheidt-Nave *et al.*, 2012; Kamtsiuris *et al.*, 2013; Rabenberg *et al.*, 2015).

Die von Gill (Gill *et al.*, 2014) in Australien durchgeführte Studie fand eine erhebliche Häufigkeit für Vitamin-D-Mangel in der Bevölkerung (22,7 % hatten  $< 50$  nmol/L). Es lagen niedrigere Konzentrationen im Winter vor. Aber es gab keinen bedeutsamen Unterschied zwischen Männern und Frauen, jedoch war die Konzentration bei den älteren Probanden höher als bei den jüngeren Probanden. Auch die Supplementierungshäufigkeit stieg mit dem Alter, obwohl nur ein geringer Anteil (4,1 %) Vitamin-D-Präparate zu sich nahmen.  $\geq 75$ -Jährige nahmen am häufigsten Vitamin D ein. Hier war auch die gemessene 25(OH)D-Konzentration am höchsten.

In der iranischen Studie wurden postmenopausale Frauen mit einem Alter von  $52,67 \pm 5$  Jahren untersucht. 17,3 % von ihnen hatten eine Vitamin-D-Insuffizienz (21-29 ng/ml) und 52,7 % einen -Mangel ( $< 20$  ng/ml) (Asadi *et al.*, 2013). Diese untersuchte Gruppe entspricht der mittelalten Gruppe der vorliegenden Arbeit, die in dieser keinen Mangel sondern nur eine Insuffizienz laut dieser Einteilung aufweist. Aber bei den Untersuchungen von Asadi (Asadi *et al.*, 2013). ergab sich auch eine positive Korrelation zwischen der Vitamin-D-Versorgung und dem Alter wie es der vorliegenden Arbeit entspricht.

Die Studie zur Gesundheit Erwachsener (DEGS1) wurde in Deutschland zwischen 2008 und 2011 vom Robert Koch-Institut durchgeführt mit 6995 Teilnehmern zwischen 18 und 79 Jahren (Scheidt-Nave *et al.*, 2012; Kamtsiuris *et al.*, 2013; Rabenberg *et al.*, 2015). Die Einteilung entspricht der des BfR. Eine ausreichende Vitamin-D-Versorgung wurde ab der 25(OH)-D-Serumkonzentration von  $> 50$  nmol/l ( $> 20$  ng/ml) definiert, zwischen 30 und  $< 50$  nmol/l (12–20 ng/ml) war sie suboptimal und  $< 30$  nmol/l ( $< 12$  ng/ml) mangelhaft. 30,2 % der Erwachsenen (29,7 % der Frauen, 30,8 % der Männer) waren mangelhaft mit Vitamin D versorgt. Der Anteil der ausreichend mit Vitamin D versorgten Frauen nahm mit zunehmendem Alter ab. Der Prozentsatz der mangelhaft versorgten Männer verminderte sich hingegen bei zunehmendem Alter. Als Ursache des geschlechterspezifischen Unterschiedes wurde das bessere Sonnenschutzverhalten der älteren Frauen sowie ihr höherer Fettanteil vermutet (Perna *et al.*, 2012). Im Winter war der Mangel an Vitamin D am größten. (Scheidt-Nave *et al.*, 2012; Kamtsiuris *et al.*, 2013; Rabenberg *et al.*, 2015).

Da die Vitamin-D-Produktion ein sonneneinstrahlungsabhängiger Faktor ist, müssen auch die Blutabnahmedaten mitberücksichtigt werden. Vergleicht man die saarländischen Globalstrahlungswerte [ $\text{kWh/m}^2$ ] der Monate miteinander, lässt sich die höchste Sonneneinstrahlung (110-160  $\text{kWh/m}^2$ ) in den Monaten April bis August erkennen. Die niedrigsten Werte ( $< 50$   $\text{kWh/m}^2$ ) sind von November bis Februar festzustellen (Amt für Klima- und Umweltschutz Saarbrücken, 2018). Teilt man die Blutentnahmedaten der vorliegenden Studie in dieses Schema ein, ergeben sich jedoch zunächst keine schlüssigen Ergebnisse.

Gruppiert man die Blutentnahmedaten der Probanden in eine Gruppe, bei der die Entnahme von Januar-April stattfand, und eine zweite, bei der die Entnahme Mai-Dezember war, ergibt sich ein logischeres Ergebnis. Bei den jungen und mittelalten Probanden waren die 25(OH)D-Werte der Blutproben vom Januar-April deutlich niedriger als die Werte des restlichen Jahres.

Eine geringere 25(OH)D-Konzentration im Winter wurde auch bei der DEGS1-Studie (Scheidt-Nave *et al.*, 2012; Kamtsiuris *et al.*, 2013; Rabenberg *et al.*, 2015), der Studie aus Rumänien

(Chirita-Emandi *et al.*, 2015), beiden Studien aus Australien (Daly *et al.*, 2012; Gill *et al.*, 2014) und der Studie aus Norddeutschland (Kramer *et al.*, 2014) bestätigt.

Grund für die verminderten 25(OH)D-Konzentrationen könnte die reduzierte Sonneneinstrahlung von November bis Februar sein. Die Vitamin-D-Reserven, die sich im Fettgewebe eingelagert haben, könnten aufgebraucht sein (Lawson *et al.*, 1986). Einschränkend ist allerdings zu erwähnen, dass diese Art von Speicher nur von Nutzen wäre, wenn bei einem hohen BMI ein Fettverlust das Freisetzen des Vitamin Ds bewirken würde (Gangloff *et al.*, 2016).

Wenn auch im April die Zeit der höchsten Sonneneinstrahlung beginnt, so würde aber die erhöhte Syntheserate dieses Monats noch nicht ausreichen die 25(OH)D-Konzentration signifikant anzuheben.

Zudem könnte die zu dieser Jahreszeit übliche wärmere bedeckendere Bekleidung verhindern, dass ausreichend UV-Licht auf die Haut gelangt. Der Aufenthalt im Freien dürfte zudem bei ungemütlichen Wetterlagen geringer sein mit konsekutiv geringerer Sonnenexposition.

Zusammenfassend könnte die in der jungen und mittelalten Gruppe unterschiedlichen 25(OH)D-Konzentrationen von Januar-April im Gegensatz zu dem restlichen Jahr auf die unterschiedlichen Wetterbedingungen dieser Monate zurückgeführt werden.

Die verringerte 25(OH)D-Konzentration der jungen im Vergleich zur alten Gruppe könnte auf das unterschiedliche Risikobewusstsein und die differente Lebensführung zurückgeführt werden.

In einer von Gill (Gill *et al.*, 2014) durchgeführten Studie wurde aber in allen Altersgruppen insgesamt nicht viel mit Vitamin D substituiert (4,1 %). Zu dem Ergebnis der geringen Substitutions-Bereitschaft kam auch eine in den Niederlanden durchgeführte Studie. Es wurden  $\geq 70$ -Jährige auf ihr Verhalten in der Vitamin-D-Substitution untersucht. Von ihnen nahmen nur 28 % Vitamin D ohne ärztliche und 5 % mit ärztlicher Dosis-Empfehlung (20  $\mu\text{g}/\text{d}$ ) ein (van Ballegooijen *et al.*, 2015).

Jedoch hatten die älteren Probanden im Dezember bis Januar ungefähr gleich viel 25(OH)D wie im restlichen Jahr. Dies konnte auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

Daher kann man vermuten, dass sie eine Vitamin-D-Supplementation durchführen.

Ein weiterer Hinweis hierfür könnte die Studie von Gill (Gill *et al.*, 2014) liefern, in der die Vitamin-D-Einnahme im höheren Alter von mehr Menschen durchgeführt wird, mit dem Gipfel bei  $\geq 75$ -Jährigen. Dies entspricht den alten Probanden der vorliegenden Arbeit.

Ältere Menschen müssten zudem längere Zeit in der Sonne verbringen, um die gleiche Vitamin D-Produktion wie jüngere Menschen zu erreichen. Denn die Fähigkeit der Haut, das Provitamin D<sub>3</sub> zu produzieren kann im Alter um mehr als das Zweifache abnehmen (MacLaughlin *et al.*, 1985). Da die älteren Menschen in der vorliegenden Arbeit jedoch mehr 25(OH)D-Mengen im Blut besitzen als jüngere Menschen, müssen sie entweder sehr viel mehr und häufiger der Sonnenexposition ausgesetzt sein oder/und zusätzliche Maßnahmen (wie z. B. Vitamin D-Supplementationen) für eine höhere 25(OH)D-Konzentration ergreifen.

Die junge Gruppe hat eine geringere 25(OH)D-Konzentration von Januar bis April verglichen mit dem restlichen Jahr. Dementsprechend könnte man davon ausgehen, dass sie nicht oder zumindest weniger Vitamin D substituieren.

Zudem leiden ältere Menschen häufiger an Osteoporose (Veiga Silva *et al.*, 2015). Da zur Osteoporoseprophylaxe eine tägliche Zufuhr von 800 IE Vitamin D mit der Nahrung oder bei nicht Erreichen dieser Menge eine Substitution empfohlen wird (Dachverbands der Deutschsprachigen Wissenschaftlichen Osteologischen Gesellschaften e.V., 2017), nehmen mehr ältere Menschen vom Arzt verordnetes Vitamin D ein. Diese Therapie ist sehr wichtig, um das Knochenfrakturrisiko zu senken (Avenell *et al.*, 2014).

Zu der anderen Hypothese, der Unterschied zwischen jungen und alten Probanden in der 25(OH)D-Konzentration könnte an der differenten Lebensführung liegen, gehört der sehr unterschiedliche Alltag bzw. Tagesablauf zwischen den Altersgruppen. Während sich die Probanden der jungen Gruppe berufsbedingt wahrscheinlich meist in Gebäuden aufhalten müssen, sind die älteren Probanden möglicherweise berentet und nicht mehr an einen von Sonnenexposition geschützten Raum gebunden und könnten daher eine höhere autonome Vitamin-D-Produktion durchführen, wenn sie auch hierfür mehr als die doppelte Zeit an Sonnenexposition haben müssten (MacLaughlin *et al.*, 1985).

Aber nicht nur über die eigene Produktion können Menschen Vitamin D erhalten, sondern auch über Lebensmittel. Vitamin D ist vor allem in tierischen Nahrungsmitteln wie z. B. Fisch, Fleischprodukten, Innereien, Eier und Milch bzw. Milchprodukten vorhanden. Die höchsten Werte sind in Fisch, insbesondere in Fischleber enthalten (Schmid *et al.*, 2013). Eine Studie in Australien zeigte, dass die Aufnahme von Fleisch, Fisch, Hähnchen, Eiern und Milchprodukten durchschnittlich 4,3 µg Vitamin-D-Äquivalente pro Tag bei > 18-Jährigen im Zeitraum von 2011-2013 beigetragen haben könnten (Liu *et al.*, 2015). Ein Lebensstil, gekennzeichnet durch z. B. mangelnde Zeit für gesundes Essen im Berufsleben oder unausgewogene Ernährung ohne kontrollierte ausreichende Nahrungsergänzungsmittel oder ausgleichende UV-Strahlung könnte zusätzlich den Vitamin-D-Haushalt des Körpers gefährden.

Da jüngere Menschen durch ihr Berufsleben vermutlich oft nicht so viel Zeit für ausgewogene Ernährung haben wie berentete ältere Menschen und sich ältere Menschen wahrscheinlich eher aufgrund von höheren Risikobewusstsein ärztlich kontrollieren lassen und supplementieren, könnte das ein entscheidender Punkt sein für die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit.

Reduzierte Vitamin-D-Spiegel im Blut haben negative Auswirkungen auf die Gesundheit der Menschen. Laut der Studie von Wang (Wang *et al.*, 2004) können Abwehrstörungen drohen, da Vitamin D direkt die Expression von gegen Mikroorganismen gerichtete Cathelicidin und Defensin reguliert. Laaksi *et al.* stellten 2007 fest, dass Soldaten einer Militärbasis (n = 800) mit einem geringen 25(OH)D-Gehalt (< 40nmol/l) signifikant häufiger wegen respiratorischer Infekte fehlten als Soldaten mit höheren Werten.

Bei Autoimmunerkrankungen wie z.B. Typ I Diabetes, Multiple Sklerose, Morbus Crohn, Colitis Ulcerosa und rheumatischer Arthritis war ein geringer 25(OH)D-Gehalt im Blut mit der Entwicklung dieser Krankheiten assoziiert (Skaaby *et al.*, 2015).

Die Vitamin-D-Konzentration im Blut verhält sich umgekehrt proportional zu dem Risiko, an der altersassoziierten Demenz zu erkranken (Littlejohns *et al.*, 2014).

Bei der Alterskrankheit Parkinson haben höhere Vitamin-D-Spiegel möglicherweise eine positive Wirkung auf den Schweregrad und die Entwicklung der Krankheit (Peterson *et al.*, 2014).

Die Sterblichkeit der Gesamtbevölkerung verringert sich um 20% pro 10 ng 25(OH)D-Konzentration (Rohrmann *et al.*, 2013).

Das Risiko an Lungenkrebs zu erkranken ist assoziiert mit einem niedrigen 25(OH)D-Blutspiegel (Zhang *et al.*, 2015). Eine ausreichende Vitamin-D-Versorgung des Körpers ( $\geq 30$  ng/ml) kann daher auch Krebs verhindern, z. B. Tabak-induzierten Krebs bei Rauchern (Deschasaux *et al.*, 2015). Andere bösartige Veränderungen und Krebsprogressionen wie Prostata- und Brustkrebs können durch Vitamin D verhindert werden (Giammanco *et al.*, 2015).

Eine dem Hauttyp angepasste Sonnenexposition sollte daher durchgeführt werden unter Beachtung eines ausreichenden UV-Schutzes, da Sonnenlicht andererseits auch als Risikofaktor für Hautkrebs gilt (Leitlinienprogramm Onkologie, 2014). Eine Supplementierung ist in Betracht zu ziehen, nämlich laut *Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V.* 20µg/Tag bei fehlender endogener Vitamin-D-Synthese (Deutsche Gesellschaft für Ernährung e. V., 2018).

Zusammenfassend könnte der Unterschied der 25(OH)D-Konzentration zwischen jung und alt zu Ungunsten der jungen Generation auf die differente Lebensführung zurückgeführt werden sowie auf ihr wahrscheinlich unzureichendes Risikobewusstsein bezüglich ihrer Gesundheit. Da Vitamin D viele wichtige Funktionen in der Gesundheit eines Menschen übernimmt, sollten alle Altersgruppen auf eine ausreichende Vitamin-D-Versorgung achten.

### 5.5. Zusammenfassung der Diskussion

Sowohl die Serumproteine  $\alpha$ 2-Makroglobulin und TIMP2 als auch das Vitamin D haben eine große Bedeutung bei der Gesunderhaltung des Menschen. Die erhöhte Blutkonzentration der Serumproteine  $\alpha$ 2-Makroglobulin und TIMP2 mit zunehmendem Alter, die in der vorliegenden Arbeit dokumentiert wurde, weisen auf verschiedene Alterserkrankungen hin und könnten möglicherweise auch als Reaktion des Körpers auf Alterungsprozesse und das zunehmende Vorkommen von Erkrankungen im Alter betrachtet werden.

Vitamin D wird ebenfalls benötigt, um die Immunabwehr gegen Infektionen und multiple Erkrankungen zu stärken. Die im Alter höhere Konzentration, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, könnte durch das bessere Risikobewusstsein des alternden Menschen bedingt sein mit besserem Substitutionsverhalten. Die saisonalen Unterschiede könnten sich durch die Varianz der Sonneneinstrahlung erklären. In allen Altersgruppen sollte aber auf eine ausreichende Vitamin-D-Versorgung geachtet werden.

### 5.6. Ausblick

Die im Alter erhöhten Serumkonzentrationen von  $\alpha$ 2-Makroglobulin und TIMP2 könnten als mögliche Reaktion auf Apoptose interpretiert werden, sodass diese Serumproteine vielleicht altersprotektive Effekte auf den Organismus haben könnten.

Dies sollte in der Alterforschung näher analysiert werden und die Forschung auf diesem Gebiet könnte nach weiteren im Alter zunehmenden Plasmabestandteilen fahnden.

Konkret wäre es ein interessanter Forschungsansatz,  $\alpha$ 2-Makroglobulin, TIMP2 und weitere Plasmabestandteile mit altersassoziierten Konzentrationsschwankungen dahingehend zu untersuchen, ob sie als Medikamente gegen neurodegenerative Erkrankungen des Alters fungieren könnten.

Vitamin D hat nicht nur eine zentrale Aufgabe in der Regulierung des Kalzium- und Phosphat-Stoffwechsels, sondern ist auch für unser Immunsystem von großer Bedeutung. Vitamin D-Mangel steigert sogar die Mortalität.



Daher ist zukünftig abzuklären, was sinnvoller ist: Die Einführung eines von den Krankenkassen empfohlenen Vit-D-Screening für die breite Bevölkerung oder eine direkte Vitamin-D-Substitution ohne vorherige Spiegelbestimmung.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Amt für Klima- und Umweltschutz Saarbrücken (2018) Klima- und Wetterdaten. URL: [www.saarbruecken.de/leben\\_in\\_saarbruecken/umwelt\\_und\\_klima/klima\\_und\\_wetterdaten](http://www.saarbruecken.de/leben_in_saarbruecken/umwelt_und_klima/klima_und_wetterdaten) [18.01.2018]
2. Anderson PH, O'Loughlin PD, May BK, Morris HA (2004). Determinants of circulating 1,25-dihydroxyvitamin D3 levels: the role of renal synthesis and catabolism of vitamin D. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 89-90:111-113
3. Annapoorani P, Dhandapany PS, Sadayappan S, Ramasamy S, Rathinavel A, Selvam GS (2006) Cardiac isoform of alpha-2 macroglobulin--a new biomarker for myocardial infarcted diabetic patients. *Atherosclerosis* 186:173-176
4. Arpino V, Brock M, Gill SE (2015) The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. *Matrix Biol* 44-46:247-254
5. Asadi M, Jouyandeh Z, Nayebzadeh F, Qorbani M (2013) Does Aging Increase Vitamin D Serum Level in Healthy Postmenopausal Women? *Acta Medica Iranica* 51:701-704
6. 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
7. Ballegooijen AJ van, Visser M, Brouwer IA (2015) Determinants of vitamin D supplement use among community-dwelling older adults. *Tijdschr Gerontol Geriatr* 46:282-289
8. Barrett AJ, Starkey PM (1973) The interaction of alpha 2-macroglobulin with proteinases. Characteristics and specificity of the reaction, and a hypothesis concerning its molecular mechanism. *Biochem J* 133:709-724
9. Bauer J, Strauss S, Schreiter-Gasser U, Ganter U, Schlegel P, Witt I, Yolk B, Berger M (1991) Interleukin-6 and alpha-2-macroglobulin indicate an acute-phase state in Alzheimer's disease cortices. *FEBS Lett* 285:111-114

10. Beaufrère H, Ammersbach M, Reavill DR, Garner MM, Heatley JJ, Wakamatsu N, Nevarez JG, Tully T.N. (2013). Prevalence of and risk factors associated with atherosclerosis in psittacine birds. *J Am Vet Med Assoc* 242:1696-1704
11. Benatti BB, Silvério KG, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH (2008) Influence of aging on biological properties of periodontal ligament cells. *Connect Tissue Res* 49:401-408
12. Blacker D, Wilcox MA, Laird NM, Rodes L, Horvath SM, Go RC, Perry R, Watson B Jr., Bassett SS, McInnis MG, Albert MS, Hyman BT, Tanzi RE (1998) Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet* 19:357-360
13. Bowers EV, Horvath JJ, Bond JE, Cianciolo GJ, Pizzo SV (2009) Antigen delivery by alpha(2)-macroglobulin enhances the cytotoxic T lymphocyte response. *J Leukoc Biol* 86:1259-1268
14. Branson HE, Endo Y, Fagin AR, Schlutz M (1984) Heritable alpha 2-macroglobulin deficiency in a patient with arterial thrombosis: alpha 2-macroglobulin deficiency Irvine. *J Natl Med Assoc* 76:1107-1112
15. Buda S, Dürrwald R, Biere B, Buchholz U, Tolksdorf K, Prahm K, Gau P, Preuß U, Haas W, AGI-Studiengruppe (2018) Influenza-Wochenbericht. Kalenderwoche 7. Arbeitsgemeinschaft Influenza, Robert Koch Institut
16. Cal S, López-Otín C (2015) ADAMTS proteases and cancer. *Matrix Biol* 44-46:77-85
17. Calabresi C, Arosio B, Galimberti L, Scanziani E, Bergottini R, Annoni G, Vergani C (2007) Natural aging, expression of fibrosis-related genes and collagen deposition in rat lung. *Exp Gerontol* 42:1003-1011
18. Canova DF, Pavlov AM, Norling LV, Gobbetti T, Brunelleschi S, Le Fauder P, Cenac N, Sukhorukov GB, Perretti M (2015) Alpha-2-macroglobulin loaded microcapsules enhance human leukocyte functions and innate immune response. *J Control Release* 217:284–292

19. Chen RQ, Chen XM, Cui SW, Cai GY, Shi SZ, Xie YS, Lu Y, Peng LX (2004) Significance of imbalance between matrix metalloproteinases and tissue type inhibitor of metalloproteinases in renal tubulointerstitial lesions of aging rats. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 84:937-942
20. Cheng CY, Grima J, Stahler MS, Guglielmotti A, Silvestrini B, Bardin CW (1990) Sertoli cell synthesizes and secretes a protease inhibitor, alpha 2-macroglobulin. *Biochemistry* 29:1063-1068
21. Chick H (1922) Study of Rickets in Vienna 1919-1922. *Med Res Counc Spec Rep Ser* 77
22. Chirita-Emandi A, Socolov D, Haivas C, Calapiş A, Gheorghiu C, Puiu M (2015) Vitamin D Status: A Different Story in the Very Young versus the Very Old Romanian Patients. *PLoS One* 10
23. Cochet H, Mouries A, Nivet H, Sacher F, Derval N, Denis A, Merle M, Relan J, Hocini M, Haïssaguerre M, Laurent F, Montaudon M, Jaïs P (2015) Age, atrial fibrillation, and structural heart disease are the main determinants of left atrial fibrosis detected by delayed-enhanced magnetic resonance imaging in a general cardiology population. *J Cardiovasc Electrophysiol* 26:484-492
24. Dachverbands der Deutschsprachigen Wissenschaftlichen Osteologischen Gesellschaften e.V. (2017) Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei postmenopausalen Frauen und bei Männern. AWMF-Register-Nr.: 183/001. AWMF online
25. Daly RM, Gagnon C, Lu ZX, Magliano DJ, Dunstan DW, Sikaris KA, Zimmet PZ, Ebeling PR, Shaw JE (2012) Prevalence of vitamin D deficiency and its determinants in Australian adults aged 25 years and older: a national, population-based study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 77:26-35

26. Deschasaux M, Souberbielle JC, Latino-Martel P, Sutton A, Charnaux N, Druesne-Pecollo N, Galan P, Hercberg S, Le Clerc S, Kesse-Guyot E, Ezzedine K, Touvier M (2015) Prospective associations between vitamin D status, vitamin D-related gene polymorphisms, and risk of tobacco-related cancers. *Am J Clin Nutr* 102:1207-1215
27. Deutsche Gesellschaft für Ernährung e. V. (2018) Vitamin D (Calciferole). URL: <https://www.dge.de/wissenschaft/referenzwerte/vitamin-d/> [09.03.2018]
28. Ehlers A (2013) Vitamin D – der aktuelle D-A-CH-Referenzwert aus Sicht der Risikobewertung. *ÖGD* 13-15
29. Engbers MJ, Karasu A, Blom JW, Cushman M, Rosendaal FR, van Hylckama Vlieg A (2015) Clinical features of venous insufficiency and the risk of venous thrombosis in older people. *Br J Haematol* 171:417-423
30. Fischer AM, Tapon-Bretonnière J, Bros A, Josso F (1981) Respective roles of antithrombin III and alpha 2 macroglobulin in thrombin inactivation. *Thromb Haemost* 45:51-54
31. Gangloff A, Bergeron J, Lemieux I, Després JP (2016) Changes in circulating vitamin D levels with loss of adipose tissue. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 19:464-470
32. Gettins PGW, Hahn K, Crews BC (1995)  $\alpha$ 2-Macroglobulin Bait Region Variants. A role for the bait region in tetramer formation. *Journal of Biological Chemistry* 270:14160-14167
33. Ghanei M, Ghalejooghi NAZ, Nourani MR, Harandi AA, Fooladi AAI (2010) Effect of TGF $\beta$ 1 and TIMP2 on Disease Activity in Asthma and COPD. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 9:79-86
34. Giammanco M, Di Majo D, La Guardia M, Aiello S, Crescimannno M, Flandina C, Tumminello FM, Leto G (2015) Vitamin D in cancer chemoprevention. *Pharm Biol* 53:1399-1434

35. Gill TK, Hill CL, Shanahan EM, Taylor AW, Appleton SL, Grant JF, Shi Z, Grande ED, Price K, Adams RJ (2014) Vitamin D levels in an Australian population. *BMC Public Health* 14:1001
36. Grabowska-Bochenek R, Drózd M, Kopieczna-Grzebieniak E, Piekarski M (1990) Concentration of some proteinase inhibitors: alpha 1-antitrypsin and alpha 2-macroglobulin in rabbit blood serum in two models of experimental atherosclerosis. *Acta Biochim Pol* 37:125-127
37. Gross J, Lapiere CM (1962) Collagenolytic Activity In Amphibian Tissues: A Tissue Culture Assay. *Proc Natl Acad Sci* 48:1014–1022
38. Guerreiro R., Bras J. (2015) The age factor in Alzheimer’s disease. *Genome Med* 7:106
39. Gültekin GD, Çabuk B, Vural Ç, Ceylan S (2015) Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2: Prognostic biological markers in invasive prolactinomas. *J Clin Neurosci* 22:1282-1287
40. Harpel PC (1970) Human plasma alpha 2-macroglobulin. An inhibitor of plasma kallikrein. *J Exp Med* 132:329-352
41. Hirata Y, Ishibashi H, Kimura H, Hayashida K, Nagano M, Okubo H (1985) Alpha 2-macroglobulin secretion enhanced in rat hepatocytes by partially characterized factor from Kupffer cells. *Inflammation* 9:201-209
42. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, Murad MH, Weaver CM (2011) Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 96:1911-1930
43. Hu YQ, Liu BJ, Dluzen DE, Koo PH (1996) Alteration of dopamine release by rat caudate putamen tissues superfused with alpha 2-macroglobulin. *J Neurosci Res* 43:71-77

44. Ikari Y, Mulvihill E, Schwartz SM (2001)  $\alpha$ 1-Proteinase Inhibitor,  $\alpha$ 1-Antichymotrypsin, and  $\alpha$ 2-Macroglobulin Are the Antiapoptotic Factors of Vascular Smooth Muscle Cells. *Journal of Biological Chemistry* 276:11798-11803
45. Ito A, Sato T, Iga T, Mori Y (1990) Tumor necrosis factor bifunctionally regulates matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) production by human fibroblasts. *FEBS Lett* 269:93-95
46. Kaimal R, Aljumaily R, Tressel SL, Pradhan RV, Covic L, Kuliopulos A, Zarwan C, Kim YB, Sharifi S, Agarwal A (2013) Selective blockade of matrix metalloprotease-14 with a monoclonal antibody abrogates invasion, angiogenesis and tumor growth in ovarian cancer. *Cancer Res* 73:2457–2467
47. Kamtsiuris P, Lange M, Hoffmann R, Schaffrath Rosario A, Dahm S, Kuhnert R, Kurth BM (2013) The first wave of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1) Sampling design, response, weighting, and representativeness. *Bundesgesundheitsbl* 56:620–630
48. Koike T, Vernon RB, Gooden MD, Sadoun E, Reed MJ (2003) Inhibited angiogenesis in aging: a role for TIMP-2. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 58:798-805
49. Komosinska-Vassev K, Olczyk P, Winsz-Szczotka K, Kuznik-Trocha K, Klimek K, Olczyk K (2011) Age- and gender-dependent changes in connective tissue remodeling: physiological differences in circulating MMP-3, MMP-10, TIMP-1 and TIMP-2 level. *Gerontology* 57:44-52
50. Kotagal V, Albin RL, Müller ML, Koeppe RA, Studenski S, Frey KA, Bohnen NI (2014) Advanced age, cardiovascular risk burden, and timed up and go test performance in Parkinson disease. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 69:1569-1575
51. Kramer J, Diehl A, Lehnert H (2014) Epidemiologische Untersuchung zur Häufigkeit eines Vitamin-D-Mangels in Norddeutschland. *Dtsch med Wochenschr* 139:470-475

52. Kumaravel Rajakumar MD (2003) Vitamin D, Cod-Liver Oil, Sunlight, and Rickets: A Historical Perspective. *Pediatrics* 112:132-135
53. Lawson DE, Douglas J, Lean M, Sedrani S (1986) Estimation of vitamin D<sub>3</sub> and 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> in muscle and adipose tissue of rats and man. *Clin Chim Acta* 157:175-181
54. Lei Y, Yang J, Zhao H (2010) Experimental study on extracts from ginseng, notoginseng and chuanxiong for delaying vascular aging in senescent mice. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zh* 30:946-951
55. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) (2014). S3-Leitlinie Prävention von Hautkrebs. AWMF-Nr.: 032/052OL, URL: <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html> [04.09.2018]
56. Li X, de Boer OJ, Ploegmaker H, Teeling P, Daemen MJ, de Winter RJ, van der Wal AC (2016) Granulocytes in coronary thrombus evolution after myocardial infarction--time-dependent changes in expression of matrix metalloproteinases. *Cardiovasc Pathol* 25:40-46
57. Li X, Zhou Q, Tao L, Yu C (2017) MicroRNA-106a promotes cell migration and invasion by targeting tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 2 in cervical cancer. *Oncol Rep* 38:1774-1782
58. Liang B, Yin J, Zhan X (2015) miR-301a promotes cell proliferation by directly targeting TIMP2 in multiple myeloma. *Int J Clin Exp Pathol* 8:9168–9174
59. Littlejohns TJ, Henley WE, Lang IA, Annweiler C, Beauchet O, Chaves PH, Fried L, Kestenbaum BR, Kuller LH, Langa KM, Lopez OL, Kos K, Soni M, Llewellyn DJ (2014) Vitamin D and the risk of dementia and Alzheimer disease. *Neurology* 83:920-928
60. Liu H, Zhao Z, Clarke RB, Gao J, Garrett IR, Margerrison EE (2013) Enhanced tissue regeneration potential of juvenile articular cartilage. *Am J Sports Med* 41:2658-2667



61. Liu J, Arcot J, Cunningham J, Greenfield H, Hsu J, Padula D, Strobel N, Fraser DR (2015) New data for vitamin D in Australian foods of animal origin: impact on estimates of national adult vitamin D intakes in 1995 and 2011-13. *Asia Pac J Clin Nutr* 24:464-471
62. Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC (2007) *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer Medizin Verlag Heidelberg, 8. Auflage
63. Ma H, Li R, Zhang Z, Tong T (2004) mRNA level of alpha-2-macroglobulin as an aging biomarker of human fibroblasts in culture. *Experimental Gerontology* 39:415–421
64. MacLaughlin J, Holick MF (1985) Aging Decreases the Capacity of Human Skin to Produce Vitamin D3. *J Clin Invest* 76:1536-1538
65. Marengoni A, Angleman S, Melis R, Mangialasche F, Karp A, Garmen A, Meinow B, Fratiglioni L (2011) Aging with multimorbidity: a systematic review of the literature. *Ageing Res Rev* 10:430-439
66. Mocchegiani E, Giacconi R, Costarelli L (2011) Metalloproteases/anti-metalloproteases imbalance in chronic obstructive pulmonary disease: genetic factors and treatment implications. *Curr Opin Pulm Med* 17:11-19
67. Mori T, Sasaki J, Kawaguchi H, Handa K, Takada Y, Matsunaga A, Kono S, Arakawa K (1995) Serum glycoproteins and severity of coronary atherosclerosis. *Am Heart J* 129:234-238
68. Murphy G, Nagase H (2008) Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Aspects Med* 29:290–308
69. Peterson AL (2014) A review of vitamin D and Parkinson's disease. *Maturitas* 78:40-44

70. Piechota-Polanczyk A, Demyanets S, Mittlboeck M, Hofmann M, Domenig CM, Neumayer C, Wojta J, Klinger M, Nanobachvili J, Huk I (2015) The Influence of Simvastatin on NGAL, Matrix Metalloproteinases and Their Tissue Inhibitors in Human Intraluminal Thrombus and Abdominal Aortic Aneurysm Tissue. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 49:549-555
71. Pietruszewska W, Bojanowska-Poźniak K, Kobos J (2016) Matrix metalloproteinases MMP1, MMP2, MMP9 and their tissue inhibitors TIMP1, TIMP2, TIMP3 in head and neck cancer: an immunohistochemical study. *Otolaryngol Pol* 70:32-43
72. Porter S, Clark IM, Kevorkian L, Edwards DR (2005) The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem J* 386:15–27
73. Rabenberg M, Scheidt-Nave C, Busch MA, Rieckmann N, Hintzpeter V, Mensink GBM (2015) Vitamin D status among adults in Germany – results from the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1). *BMC Public Health* 15:641
74. Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R (2012) *Duale Reihe, Biochemie*. Georg Thieme Verlag KG, 3. Auflage
75. Rawer D, Borkhardt A, Wilda M, Kropf S, Kreuder J (2003) Influence of stochastics on quantitative PCR in the detection of minimal residual disease. *Leukemia* 17:2527-2531
76. Remillard TC, Bratslavsky G, Jensen-Taubman S, Stetler-Stevenson WG, Bourbouli D (2014) Molecular mechanisms of tissue inhibitor of metalloproteinase 2 in the tumor microenvironment. *Mol Cell Ther* 2:17
77. Rohrmann S, Braun J; Bopp M, Faeh D (2013) Inverse association between circulating vitamin D and mortality – dependent on sex and cause of death? *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases (NMCD)* 23:960-966

78. Rooprai HK, Martin AJ, King A, Appadu UD, Jones H, Selway RP, Gullan RW, Pilkington GJ (2016) Comparative gene expression profiling of ADAMs, MMPs, TIMPs, EMMPRIN, EGF-R and VEGFA in low grade meningioma. *Int J Oncol* 49:2309-2318
79. Rubie C, Kempf K, Hans J, Su T, Tilton B, Georg T, Brittner B, Ludwig B, Schilling M (2005) Housekeeping gene variability in normal and cancerous colorectal, pancreatic, esophageal, gastric and hepatic tissues. *Mol Cell Probes* 19:101-109
80. Rubie C, Kölsch K, Halajda B, Eichler H, Wagenpfeil S, Roemer K, Glanemann M (2016) microRNA-496 - A new, potentially aging-relevant regulator of mTOR. *Cell Cycle* 15:1108-1116
81. Schaller J, Gerber SS (2011) The plasmin-antiplasmin system: structural and functional aspects. *Cell Mol Life Sci.* 68:785-801
82. Scheidt-Nave C, Kamtsiuris P, Gößwald A, Hölling H, Lange M, Busch MA, Dahm S, Döller R, Ellert U, Fuchs J, Hapke U, Heidemann C, Knopf H, Laussmann D, Mensink GBM, Neuhauser H, Richter A, Sass A, Schaffrath Rosario A, Stolzenberg H, Thamm M, Kurth B (2012) German health interview and examination survey for adults (DEGS) - design, objectives and implementation of the first data collection wave. *BMC Public Health* 12:730
83. Scherer M, Wagner HO, Lüthmann D, Muche-Borowski C, Schäfer I, Dubben HH, Hansen H, Thiesemann R, von Renteln-Kruse W, Hofmann W, Fessler J, van den Bussche H (2017) Multimorbidität S3-Leitlinie. AWMF online
84. Schmid A, Walther B (2013) Natural Vitamin D Content in Animal Products. *Adv Nutr* 4:453–462
85. Selman M, Ruiz V, Cabrera S, Segura L, Ramírez R, Barrios R, Pardo A (2000) TIMP-1, -2, -3, and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing nondegradative lung microenvironment? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279:562-574

86. Shaker M, Yokoyama Y, Mori S, Tsujimoto M, Kawaguchi N, Kiyono T, Nakano T, Matsuura N (2011) Aberrant expression of disintegrin-metalloprotease proteins in the formation and progression of uterine cervical cancer. *Pathobiology* 78:149-161
87. Skaaby T, Husemoen LL, Thuesen BH, Linneberg A (2015) Prospective population-based study of the association between vitamin D status and incidence of autoimmune disease. *Endocrine* 50:231-238
88. Smane L, Pilmane M, Akota I (2013) Apoptosis and MMP-2, TIMP-2 expression in cleftlip and palate. *Stomatologija, Baltic Dental and Maxillofacial Journal* 15:129-134
89. Souza EM de, Meuser-Batista M, Batista DG, Duarte BB, Araújo-Jorge TC, Soeiro MN (2008) Trypanosoma cruzi: alpha-2-macroglobulin regulates host cell apoptosis induced by the parasite infection in vitro. *Exp Parasitol* 118:331-337
90. Stewart TL, Chipperfield JG, Perry RP, Hamm JM (2016) Attributing heart attack and stroke to "Old Age": Implications for subsequent health outcomes among older adults. *J Health Psychol* 21:40-49
91. Straight DL, McKee PA (1984) Characterization of Thrombin Binding to  $\alpha$ -Macroglobulin. *Journal of Biological Chemistry* 259:1272-1278
92. Strauss S, Bauer J, Ganter U, Jonas U, Berger M, Volk B (1992) Detection of interleukin-6 and alpha 2-macroglobulin immunoreactivity in cortex and hippocampus of Alzheimer's disease patients. *Lab Invest* 66:223-230
93. Thermo Fisher Scientific - NanoDrop products Wilmington, Delaware USA. Technical support. T042-Technical Bulletin NanoDrop Spectrophotometers, 260/280 and 260/230 Ratios. URL: [www.nhm.ac.uk/content/dam/nhmwww/our-science/dpts-facilities-staff/Coreresearchlabs/nanodrop.pdf](http://www.nhm.ac.uk/content/dam/nhmwww/our-science/dpts-facilities-staff/Coreresearchlabs/nanodrop.pdf) [04.09.2018]
94. Tripodi A, Chantarangkul V, De Stefano V, Mannucci P (2000) Alpha(2)-macroglobulin levels are high in adult patients with congenital antithrombin deficiency. *Thromb Res* 98:117-122

95. Veiga Silva AC, da Rosa MI, Fernandes B, Lumertz S, Diniz RM, dos Reis Damiani ME (2014) Factors associated with osteopenia and osteoporosis in women undergoing bone mineral density test. *Rev Bras Reumatol* 55:223-228
96. Violan C, Foguet-Boreu Q, Flores-Mateo G, Salisbury C, Blom J, Freitag M, Glynn L, Muth C, Valderas JM (2014) Prevalence, Determinants and Patterns of Multimorbidity in Primary Care: A Systematic Review of Observational Studies. *PLoS One* 9:102149
97. Wan ZH, Li GH, Guo YL, Li WZ, Chen L, Zhang YJ (2018) Amelioration of Cavernosal Fibrosis and Erectile Function by Lysyl Oxidase Inhibition in a Rat Model of Cavernous Nerve Injury. *J Sex Med* 15:304-313
98. Wang T, Nestel FP, Bourdeau V, Nagai Y, Wang Q, Liao L, Tavera-Mendoza L, Lin R, Hanrahan JW, Mader S, White JH (2004) Cutting Edge: 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Is a Direct Inducer of Antimicrobial Peptide Gene Expression. *J Immunol* 173:2909-2912
99. Wang Z, Famulski K, Lee J, Das SK, Wang X, Halloran P, Oudit GY, Kassiri Z (2014) TIMP2 and TIMP3 have divergent roles in early renal tubulointerstitial injury. *Kidney Int* 85:82-93
100. Wani M, Wani I, Banday K, Ashraf M (2016) The other side of vitamin D therapy: a case series of acute kidney injury due to malpractice-related vitamin D intoxication. *Clin Nephrol* 86:236-241
101. Woolley DE, Roberts R, Evanson JM (1975) Inhibition of human collagenase activity by a small molecular weight serum protein. *Biochem Biophys Res Commun* 66:747-754
102. Wu J, Chang-Lee SN, Day CH, Ho T, Viswanadha VP, Chung L, Hwang J, Jong G, Kuo W, Huang C (2016) Secondhand Smoke Exposure Enhances Cardiac Fibrosis Effects on the Aging Rat Hearts. *Acta Cardiol Sin* 32:594–603

103. Xu J, Du Y, Liu WJ, Li L, Li Y, Wang XF, Yi HF, Shan CK, Xia GM, Liu XJ, Zhen YS (2018) Intensive fibrosarcoma-binding capability of the reconstituted analog and its antitumor activity. *Drug Deliv* 25:102-111
104. Yang J, Zheng J, Wu L, Shi M, Zhang H, Wang X, Xia N, Wang D, Liu X, Yao L, Li Y, Dou K (2011) NDRG2 Ameliorates Hepatic Fibrosis by Inhibiting the TGF- $\beta$ 1/Smad Pathway and Altering the MMP2/TIMP2 Ratio in Rats. *PLoS One* 6:27710
105. Yi X, Guo J, Guo J, Sun S, Yang P, Wang J, Li Y, Xie L, Cai J, Wang Z (2017) EZH2-mediated epigenetic silencing of TIMP2 promotes ovarian cancer migration and invasion. *Sci Rep* 7:3568
106. Yu Q, Zou HM, Wang S, Xu YM, Li JM, Zhang N (2014) Regulative effect of bakuchiol on ESF-1 cells anti-aging gene. *Zhong Yao Cai* 37:632-635
107. Zhang L, Wang S, Che X, Li X (2015) Vitamin D and lung cancer risk: a comprehensive review and meta-analysis. *Cell Physiol Biochem* 36:299-305

## 7. Publikation und Dank

### 7.1. Publikation

**Thomas A, Rubie C, Glanemann M (2018)** Evaluierung des Expressionsprofils altersassoziierter Plasmaproteine. Kongress Deutsche Gesellschaft für Geriatrie, Köln

### 7.2. Dank

An dieser Stelle möchte ich mich als erstes bei meiner Doktormutter PD Dr. C. Rubie für die gute Betreuung und die vielen hilfreichen Verbesserungsvorschläge bedanken. Auch bedanke ich mich bei B. Kruse für ihre Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchungen.

Weiteren Dank gilt meinem Vater, der mir über den gesamten Entstehungsprozess der Arbeit eine große Stütze war.