

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

**Der Einfluss bioaktiver Substanzen auf die
molekularen Mechanismen der Alzheimer-Erkrankung**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.
der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes

2022

vorgelegt von Anna Andrea Lauer
geboren am 13.12.1992 in Wadern

Tag der Promotion: 15. April 2024
Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger
Berichterstatter: Prof. Marcus O. W. Grimm
Prof. Barbara Niemeyer-Hoth
Prof. Jochen Walter

Für Johannes, Andrea & Dietmar
in Dankbarkeit.

Erklärung gemäß § 7 Abs. 1 Nr. 2

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

Die in den Kooperationstabellen der entsprechenden Kapitel aufgeführten Personen haben mir in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen.

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

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

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

Die Bedeutung der eidesstattlichen Erklärung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Erklärung sind mir bekannt.

Homburg,

Anna A. Lauer

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung / Summary	1
1.1	Der Einfluss bioaktiver Substanzen auf die molekularen Mechanismen der Alzheimererkrankung	1
1.2	Influence of bioactive compounds on molecular mechanisms of Alzheimer's disease	3
2	Einleitung.....	5
2.1	Die Alzheimer-Krankheit	5
2.1.1	Epidemiologische und klinische Aspekte.....	5
2.1.1.1	Klinische Symptomatik und Stadien.....	5
2.1.1.2	Differenzierung zwischen der sporadischen und familiären Form	7
2.1.1.3	Die Neuropathologie	7
2.1.2	Molekulare Mechanismen der Amyloid- β Pathologie	9
2.1.3	Lipide in der Alzheimererkrankung	13
2.1.4	Therapeutische Behandlungsansätze	15
2.2	Vitamin D	17
2.2.1	Der Metabolismus sowie die physiologischen Funktionen von Vitamin D.....	17
2.2.2	Der Versorgungszustand mit Vitamin D in der Bevölkerung	19
2.2.3	Vitamin D und Morbus Alzheimer.....	20
2.3	Fragestellung der Arbeit.....	24
3	Material und Methoden.....	26
3.1	Material.....	26
3.1.1	Verbrauchsmaterialien und Chemikalien	26
3.1.2	Geräte	28
3.1.3	Zelllinien	30
3.1.4	Gewebeproben.....	31
3.1.4.1	Verwendete Mausstämme	31
3.1.4.2	Fütterungsexperiment Vitamin D-Hypovitaminose.....	32
3.1.4.3	Acitretinbehandlung.....	32
3.1.4.4	Fütterungsexperiment MCT-Fette.....	33
3.1.4.5	Humane <i>post mortem</i> Gehirnproben	33
3.1.5	Vitamin D-Analoga	38
3.1.6	Lipide.....	38
3.1.7	Antikörper	39
3.1.8	Kommerzielle Kits	39
3.1.9	Plasmide	40
3.2	Methoden.....	40
3.2.1	Mikro- und molekularbiologische Methoden.....	40
3.2.1.1	Chemokompetente Bakterien.....	40
3.2.1.2	Retransformation chemokompetenter Bakterien mit Plasmid-DNS	41
3.2.1.3	Isolation von Plasmid-DNS aus transformierten Bakterien.....	42
3.2.1.4	Isolation von Gesamt-Ribonukleinsäure (RNS) aus Zellen und Gewebe.....	42
3.2.1.5	Synthese komplementärer DNS (cDNS).....	43
3.2.1.6	Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)	43
3.2.1.7	IDE-Promotor-Aktivitätsmessungen mittels Luciferase-Analyse	47
3.2.2	Zellbiologische Methoden	48
3.2.2.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen	48
3.2.2.2	Kryokonservierung und Rekultivierung eukaryotischer Zellen.....	48
3.2.2.3	Transfektion eukaryotischer Zellen durch Lipofektion	49
3.2.2.4	Inkubation von Zellen mit additiven Substanzen.....	50
3.2.2.5	Bestimmung der Zellviabilität mittels LDH-Analyse und Propidiumiodidfärbung	51

3.2.2.6	Analyse der Proteinsekretion über das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) mittels SEAP-Analyse.....	51
3.2.3	Proteinbiochemische Methoden	52
3.2.3.1	Prozessierung von Zellen und konditioniertem Medium.....	52
3.2.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bicinchoninsäure-Analyse	53
3.2.3.3	Immunpräzipitation von Amyloid- β	53
3.2.3.4	Elektrophoretische Trennung von Proteinen mittels vertikaler diskontinuierlicher Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	54
3.2.3.5	Western Blot-Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen.....	55
3.2.3.6	Immunologischer Nachweise von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen.....	55
3.2.3.7	Nachweis von A β mittels ELISA.....	57
3.2.3.8	Nachweis von IL-1 β mittels ELISA	57
3.2.3.9	Messung der Degradation von A β ₄₀	57
3.2.3.10	Fluorometrische Bestimmung von Enzymaktivitäten.....	59
3.2.3.10.1	Bestimmung der IDE-Enzymaktivität aus Zellen.....	60
3.2.3.10.2	Bestimmung der Enzymaktivität rekombinanten IDEs nach Lipidinkubation	61
3.2.3.10.3	Analyse der IDE-Enzymaktivität in murinen Serumproben	61
3.2.3.10.4	Bestimmung der NEP-Enzymaktivität aus Zellen und Gewebe.....	62
3.2.3.10.5	Messung der α -, β - und γ -Sekretase-Enzymaktivitäten in metabolisch aktiven Zellen.....	62
3.2.3.10.6	Messung der β -Sekretase-Enzymaktivität in isolierten Membranen.....	62
3.2.3.10.7	Bestimmung des Sauerstoff-Verbrauches	63
3.2.4.1	Färbung von Lipidtropfen mittels Ölrot O-Lösung.....	63
3.2.4.2	Extraktion von Lipiden mittels Fest-Flüssig-Extraktion.....	64
3.2.4.3	Massenspektrometrie	66
3.2.4.3.1	Detektion von Phosphatidylcholinen mittels ESI-MS/MS.....	69
3.2.4.3.2	Detektion von Phosphatidylethanolaminen mittels ESI-MS/MS	71
3.2.4.3.3	Detektion von Sphingomyelinen mittels ESI-MS/MS	74
3.2.4.3.4	Detektion von Triacylglyceriden mittels ESI-MS/MS	75
3.2.4.3.5	Detektion von Carnitinen mittels ESI-MS/MS.....	76
3.2.5.1	Statistische Analyse	78
3.2.5.2	Auswertung lipidanalytischer Daten.....	78
3.2.5.3	Graphische Datendarstellung	79
4	Ergebnisse.....	80
4.1	Analyse des potenziellen Zusammenhangs zwischen dem Secosteroid Vitamin D und der Pathologie der Alzheimererkrankung.....	80
4.1.1	Der Einfluss von Vitamin D und seinen Analoga auf die APP-Pathologie der Alzheimererkrankung.....	81
4.1.1.1	Der Effekt von Vitamin D und seinen Analoga auf die A β -Spiegel	83
4.1.1.2	Der Effekt von Vitamin D und seinen Analoga auf den A β -Katabolismus.....	84
4.1.1.3	Der Effekt von Vitamin D und seinen Analoga auf den A β -Anabolismus	87
4.1.2	Der Einfluss von Vitamin D auf die Expression von Genen, die mit der Alzheimerpathologie assoziiert sind	94
4.1.3	Der Einfluss einer Vitamin D-Hypovitaminose auf die Lipidhomöostase.....	100
4.1.3.1	Der Effekt eines Vitamin D-Mangels auf Phospholipide	102
4.1.3.2	Der Effekt eines Vitamin D-Mangels auf TAG- und Carnitin-Spezies.....	109
4.2	Der Einfluss des Vitamin A-Derivates Acitretin auf Hirn- und Leber-Lipidhomöostase von transgenen Alzheimer-Mäusen.....	111
4.2.1	Analyse der Triacylglyceride im Leber- und Hirngewebe von Acitretin-behandelten transgenen Alzheimer-Mäusen.....	114
4.2.2	Acitretin-induzierte Veränderungen der Phospholipide im Leber- und Hirngewebe von transgenen Alzheimer-Mäusen.....	116

4.2.3	Gehalt an (Acyl- / Acetyl-) Carnitinen in Anwesenheit von Acitretin im Leber- und Hirngewebe von transgenen Alzheimer-Mäusen	120
4.3	Der Einfluss gesättigter mittelkettiger Fettsäuren auf die IDE-vermittelte A β -Degradation	121
4.3.1	Der Effekt der Fettsäure-Kettenlänge auf die IDE-abhängige A β -Degradation	124
4.3.2	Der Einfluss der Fettsäure-Kettenlänge auf die Sekretion von IDE sowie dessen katalytische Aktivität.....	126
4.4	Analyse eines regulatorischen Rückkopplungszyklus zwischen der APP-Intrazellulären Domäne (AICD) und IDE	129
4.4.1	Validierung der in diesem Projekt verwendeten Zelllinien.....	130
4.4.2	Analyse der A β -Degradation in PS1/2-, APP/APLP2- und AICD-defizienten embryonalen Maus-Fibroblasten.....	131
4.4.3	Analyse der IDE-Aktivität und des IDE-Proteingehaltes in PS1/2-, APP/APLP2- und AICD-defizienten embryonalen Maus-Fibroblasten	135
4.4.4	Der Einfluss von Presenilin, APP und AICD auf die IDE-Genexpression in embryonalen Maus-Fibroblasten und humanen Neuroblastomzellen	137
4.4.5	Die Wirkung der AICD auf IDE-Genexpression und Proteinspiegel	139
4.4.6	Der Einfluss einer funktionalen AICD auf die IDE-Promotoraktivität.....	141
4.4.7	Die Alzheimer-Relevanz der AICD-abhängigen IDE-Genexpression.....	142
4.5	Im Rahmen von Kooperationen generierte Ergebnisse weiterer Projekte.....	145
4.5.1	Methylxanthine und die Alzheimererkrankung.....	145
4.5.2	Der Einfluss von Capsaicinoiden auf die APP-Prozessierung in SH-SY5Y-Zellen	150
4.5.3	Spleißvarianten von STIM1 und die Alzheimererkrankung	151
4.5.4	Lipidomics-Analyse der Mitochondrien eines zellulären Alzheimer Modells.....	153
4.5.5	Der Zusammenhang zwischen PEX19 und der Speicherung von Neutrallipiden.....	156
5	Diskussion	163
5.1	Mechanistischer Zusammenhang zwischen Vitamin D und der Alzheimererkrankung	163
5.1.1	Die Relevanz von Vitamin D für neuronale Funktionen.....	163
5.1.2	Der Einfluss von Vitamin D und seinen Analoga auf die molekularen Mechanismen der Amyloid- β -Pathologie.....	167
5.1.2.1	Der Effekt von Vitamin D und seinen Analoga auf die A β -Spiegel	170
5.1.2.2	Der Effekt von Vitamin D und seinen Analoga auf die amyloidogene Prozessierung von APP	172
5.1.2.3	Der Effekt von Vitamin D und seinen Analoga auf die Nepriylsin-vermittelte A β -Degradation.....	175
5.1.2.4	Vergleich der Effektstärken zwischen Vitamin D und seinen Analoga in ihrer protektiven Wirkung hinsichtlich der Amyloidpathologie	176
5.1.3	Die Vitamin D-Rezeptor-vermittelte Expressionswirkung von Vitamin D auf Alzheimerpathologie-assoziierte Prozesse	177
5.1.3.1	Vitamin D-Hypovitaminose und die APP-Homöostase.....	178
5.1.3.2	Vitamin D-Hypovitaminose und oxidativer Stress	179
5.1.3.3	Vitamin D-Hypovitaminose und Inflammation	180
5.1.3.4	Vitamin D-Hypovitaminose und der Lipidmetabolismus.....	181
5.1.3.5	Vitamin D-Hypovitaminose und die Signaltransduktion.....	183
5.1.3.6	Vitamin D-Hypovitaminose und die Neurogenese	184
5.1.4	Der Einfluss einer Hypovitaminose D auf den Metabolismus Alzheimer-assoziiertes Lipide.....	185
5.1.4.1	Der Einfluss einer Vitamin D-Hypovitaminose auf Phospholipide.....	186
5.1.4.2	Der Einfluss einer Vitamin D-Hypovitaminose auf TAG- und Carnitin-Spezies ...	190
5.2	Der Einfluss des Vitamin A-Derivates Acitretin auf Hirn- und Leber-Lipidhomöostase von transgenen Alzheimermäusen.....	193
5.3	Der Einfluss mittelkettiger gesättigter Fettsäuren auf die IDE-vermittelte A β -Degradation	200
5.4	Die Analyse eines regulatorischen Rückkopplungszyklus zwischen der AICD und IDE ..	207

5.4.1.1	Der Einfluss der AICD auf die IDE-Gen- und Proteinexpression	208
5.4.1.2	Effekte der AICD auf die Aktivität des <i>Ide</i> -Promotors	210
5.4.1.3	Die Relevanz der AICD-abhängigen <i>IDE</i> -Genexpression <i>in vivo</i>	210
5.4.1.4	Der regulatorische Rückkopplungszyklus zwischen der AICD und IDE	210
5.5	Ausblick.....	212
6	Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge.....	213
6.1	Publikationen im Rahmen der vorliegenden Arbeit	213
6.2	Weitere Publikationen	213
6.3	Konferenzbeiträge	215
6.4	Durch <i>Web of Science</i> verifizierte <i>peer reviewer</i> Tätigkeiten.....	215
7	Literaturverzeichnis	216
8	Danksagung	247
9	Lebenslauf.....	248

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
α -CTF	englisch: <i>α C-terminal fragment</i> , α -C-terminales Fragment
β -CTF	englisch: <i>β C-terminal fragment</i> , β -C-terminales Fragment
μ	Mikro
Abb.	Abbildung
A β	Amyloid β
ABCA1	englisch: <i>ATP-binding cassette subfamily A member 1</i> , ATP-bindende Kasette Transporter A1
ADAM	englisch: <i>a disintegrin- and metalloprotease</i> , eine Disintegrin- und Metalloprotease
AFT	AICD/Fe65/Tip60
AICD	englisch: <i>APP intracellular domain</i> , APP intrazelluläre Domäne
AD	englisch: <i>Alzheimer's disease</i> , Alzheimererkrankung
ANOVA	englisch: <i>analysis of variance</i> , Varianzanalyse
APLP	englisch: <i>amyloid precursor like protein</i> , APP-ähnliches Protein
APOE	Apolipoprotein E
APP	englisch: <i>amyloid precursor protein</i> , amyloides Vorläuferprotein
APP ^{sw} e	englisch: <i>amyloid precursor protein swedish</i> , APP mit schwedischer Mutation
B&B	Braak-Stadien (Einteilung nach Braak & Braak)
BACE1	englisch: <i>β-site APP cleaving enzyme</i> , APP-spaltendes Enzym an der β -Stelle
BCA	englisch: <i>bicinchoninic acid</i> , Bicinchoninsäure
bp	Basenpaare
BSA	englisch: <i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
c	centi
C50	AICD50
CaCl ₂	Kalziumchlorid
Cas	englisch: <i>CRISPR associated</i> , CRISPR-assoziiert
CE	englisch: <i>collision energy</i> , Kollisionsenergie
CERAD	englisch: <i>Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease</i> , Konsortium zur Erstellung eines Registers für die Alzheimererkrankung
CO ₂	Kohlendioxid
CoA	Coenzym A
cps	englisch: <i>counts per second</i> , Zählimpulse pro Sekunde
CRISPR	englisch: <i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i> , gehäuft auftretende, regelmäßig unterbrochene, kurze Palindrom-Wiederholungen
C-Terminus	Carboxyl-Terminus (endständige Aminosäure mit freier Carboxylgruppe, COOH)
Cu	Kupfer
CUR	englisch: <i>curtain gas</i> , Vorhang-Gas
CuSO ₄	Kupfersulfat
CXP	englisch: <i>collision cell exit potential</i> , Kollisionszellen-Austrittspotential
Da	Dalton
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DP	englisch: <i>declustering potential</i>
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	englisch: <i>enhanced chemo luminescence</i> , verstärkte Chemolumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EP	englisch: <i>entrance potential</i> , Eingangspotenzial
ER	endoplasmatisches Retikulum

ESI	Elektrospray-Ionisation
eV	Elektronenvolt
FAD	englisch: <i>familial Alzheimer's disease</i> , familiäre Form der Alzheimererkrankung
FCS	englisch: <i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FRET	Förster Resonanzenergietransfer
g	Gramm
GS1	englisch: <i>ion source gas 1</i> , Ionenquellen-Gas 1
GS2	englisch: <i>ion source gas 2</i> , Ionenquellen-Gas 2
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HDAC1	Histondeacetylase 1
HKG	engl: <i>housekeeping gene</i> , Haushaltsgen
HMGCR	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
HPLC	englisch: <i>high performance liquid chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	englisch: <i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
Hyg.	Hygromycin
IDE	Insulin-degradierendes Enzym
ihe	englisch: <i>interface heater</i> , Schnittstellenheizung
IS	englisch: <i>ion spray voltage</i> , Ionensprühspeisung
IU	englisch: <i>international units</i> , internationale Einheiten
kb	Kilobase
KCl	Kaliumchlorid
KD	Knockdown
kDa	Kilodalton
KO	Knockout
l	Liter
LB	englisch: <i>lysogeny broth</i> , Komplexmedium zur Bakterienkultur
LDH	Laktatdehydrogenase
LOAD	englisch: <i>late onset Alzheimer's disease</i> , spät einsetzende Alzheimererkrankung
Lyso-PC	Lyso-Phosphatidylcholin
m	milli
M	molar
MCI	englisch: <i>mild cognitive impairment</i> , milde kognitive Beeinträchtigungen
MEM	englisch: <i>minimum essential medium</i> , minimal erforderliches Medium
Mg	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
mm	Millimeter
MMP	Matrix Metalloproteinase
MnCl ₂	Mangan(II)-chlorid
MOPS	3-(N-Morpholino) propansulfonsäure
MRM	englisch: <i>multi reaction monitoring</i> , Mehrfachreaktionsüberwachung
mRNS	englisch: <i>messenger RNA</i> , Boten-Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie
MUFA	englisch: <i>monounsaturated fatty acid</i> , einfach ungesättigte Fettsäure
n	nano
N ₂	Stickstoff
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamidadeninucleotid
NaOH	Natriumhydroxid

NCSTN	Nicastrin
NEP	Nepriylisin
NP-40	Nonidet P-40
N-Terminus	Aminoterminus (endständige Aminosäure mit freier Aminogruppe, NH ₂)
OD	optische Dichte
p	piko
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	englisch: <i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCaa	Diacyl-Phosphatidylcholin
PCae	Acyl-Alkyl-Phosphatidylcholin / Plasmalogene
PCR	englisch: <i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PI	Protease-Inhibitor
PITC	Phenylisothiocyanat
PS1/2	Presenilin 1/2
PUFA	englisch: <i>polyunsaturated fatty acid</i> , mehrfach ungesättigte Fettsäure
qRT-PCR	englisch: <i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i> , quantitative Echtzeit-PCR
RCT	englisch: <i>randomized controlled trials</i> , randomisierte kontrollierte Studie
RNS	Ribonukleinsäure
ROS	englisch: <i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
rpm	englisch: <i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RbCl	Rubidiumchlorid
s	Sekunde
sAPP α	englisch: <i>soluble α-secreted APP</i> , lösliches α -sezerniertes APP
sAPP β	englisch: <i>soluble β-secreted APP</i> , lösliches β -sezerniertes APP
SDS	englisch: <i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SEAP	sekretorische alkalische Phosphatase
SEM	englisch: <i>standard error of the mean</i> , Standardfehler des Mittelwertes
SFA	englisch: <i>saturated fatty acid</i> , gesättigte Fettsäure
TE	TRIS/EDTA
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TREM2	englisch: <i>triggering receptor expressed on myeloid cells 2</i> , auslösender Rezeptor, der auf myeloischen Zellen exprimiert wird 2
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
WT	Wildtyp
x g	x-fache Erdbeschleunigung

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Zusammenfassung.....	2
Abb. 2: Summary.....	4
Abb. 3: APP-Prozessierung.....	11
Abb. 4: Der Metabolismus von Vitamin D.....	18
Abb. 5: Fragestellung der Arbeit.....	25
Abb. 6: Validierung der in dieser Arbeit verwendeten Methode zur A β -Degradationsanalyse mittels Western Blot-Analyse und synthetischem A β	58
Abb. 7: Validierung der Lipidextraktion sowie der massenspektrometrischen Methodik.....	65
Abb. 8: Schematische Darstellung des Fragmentierungsmusters für Phosphatidylcholin.....	69
Abb. 9: Schematische Darstellung des Fragmentierungsmusters für Phosphatidylethanolamin.....	72
Abb. 10: Schematische Darstellung des Fragmentierungsmusters für Sphingomyeline.....	74
Abb. 11: Schematische Darstellung des Fragmentierungsmusters für Triacylglyceride.....	75
Abb. 12: Schematische Darstellung des Fragmentierungsmusters für Carnitine.....	76
Abb. 13: Einflüsse von Calcifediol und seinen Analoga auf die Zellviabilität.....	83
Abb. 14: Einflüsse von Calcifediol und seinen Analoga auf die A β -Spiegel.....	83
Abb. 15: Einflüsse von Calcifediol und seinen Analoga auf den A β -Katabolismus.....	87
Abb. 16: Einfluss von Calcifediol und seinen Analoga auf die Aktivität der α -Sekretase.....	88
Abb. 17: Einfluss von Calcifediol und seinen auf den A β -Anabolismus.....	90
Abb. 18: Einflüsse von Calcifediol und seinen Analoga auf die γ -Sekretase.....	93
Abb. 19: Schematische Darstellung des Studiendesigns zur Analyse des Einflusses einer Hypovitaminose D auf die Expression von Genen, die in Alzheimer-relevante Stoffwechselwege involviert sind, in murinen Hirnproben.....	95
Abb. 20: Expression derjenigen Gene, die in der kombinierten Analyse beider Hypovitaminose D- Mauskohorten ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,1$ aufwiesen, normiert gegen die vier <i>housekeeping</i> Gene <i>Actb</i> , <i>Atp5b</i> , <i>Mprp</i> und <i>Polr2f</i> (n = 7).....	99
Abb. 21: Einflüsse der Calcitriolbehandlung auf die Zellviabilität und Validierung der suffizienten Calcitriolaufnahme.....	101
Abb. 22: Effekte eines Vitamin D-Mangels auf Phosphatidylcholin und -Ethanolaminspezies.....	103
Abb. 23: Effekte eines Vitamin D-Mangels auf PC- und PE-Plasmalogenspezies.....	104
Abb. 24: Effekte eines Vitamin D-Mangels auf Lyso-PC- und Lyso-PE-Spiegel.....	106
Abb. 25: Einfluss eines Vitamin D-Mangels auf die Fettsäurekomposition.....	108
Abb. 26: Einfluss eines Vitamin D-Mangels auf TAG- und Carnitin-Spezies.....	110
Abb. 27: Schematische Darstellung des Studiendesigns zur Analyse des Einflusses des Vitamin A- Derivates Acitretin auf die Lipidhomöostase im Leber- und Hirngewebe von transgenen Alzheimer-Modellmäusen (5xFAD).....	113
Abb. 28: Acitretin-vermittelte Änderungen der TAG-Spiegel in Leber- und Hirngewebe von 5xFAD-Mäusen.....	115
Abb. 29: Veränderte Phosphatidylcholin- (PCaa-) Spiegel in murinem 5xFAD-Leber- und Hirn- Gewebe nach Behandlung mit Acitretin.....	117
Abb. 30: Veränderte Phosphatidylcholin-Plasmalogen- (PCae-) Spiegel in murinem 5xFAD-Leber- und Hirngewebe nach Behandlung mit Acitretin.....	118
Abb. 31: Veränderte Sphingomyelin- (SM-) Spiegel in murinem 5xFAD-Leber- und Hirngewebe nach Behandlung mit Acitretin.....	119
Abb. 32: Der Einfluss des Retinoids Acitretin auf den Carnitingehalt.....	120
Abb. 33: Validierung der verwendeten Inkubationsbedingungen sowie der Verwendung von PC16:0-18:0 als Kontrolllipidgruppe.....	123
Abb. 34: Effekt der Fettsäure-Kettenlänge auf die IDE-abhängige Degradation von A β	125
Abb. 35: Effekte der Fettsäure-Kettenlänge auf die Sekretion von IDE und dessen katalytische Aktivität.....	128
Abb. 36: Verifizierung der zur Analyse des potenziellen Rückkopplungsmechanismus zwischen der AICD und IDE verwendeten Zelllinien.....	130

Abb. 37: Analyse eines potenziellen Zusammenhangs zwischen γ -Sekretase-vermittelter APP-Prozessierung und der Degradation von A β	132
Abb. 38: A β -Degradation in Anwesenheit des IDE-Inhibitors Insulin und / oder des NEP-Inhibitors Thiorphan in MEF-WT- und MEF-APP/APLP2 ^{-/-} -Zellen.....	134
Abb. 39: Analyse der IDE-Enzymaktivität und des IDE-Proteingehaltes in PS1/2-, APP/APLP2- oder AICD-defizienten embryonalen Maus-Fibroblasten.....	136
Abb. 40: Analyse der IDE-Genexpression mittels Echtzeit-PCR in verschiedenen Zelllinien ohne katalytisch aktive Komponente des γ -Sekretasekomplexes, der APP-Familie oder AICD sowie in APP-überexprimierenden Zellen.....	138
Abb. 41: Analyse der IDE-Gen- und Proteinexpression in Anwesenheit von AICD.....	140
Abb. 42: Analyse der IDE-Promotoraktivität.....	141
Abb. 43: Analyse von murinen APP ^{-/-} - und APP Δ CT15 ^{+/-} -Hirngewebeprobe.....	142
Abb. 44: Expression von IDE und APP in humanen <i>post mortem</i> Hirnproben.....	144
Abb. 45: Methylxanthine beeinflussen die an der APP-Prozessierung beteiligten Sekretasen.....	147
Abb. 46: Methylxanthine beeinflussen die Expression Alzheimer-relevanter Gene.....	148
Abb. 47: Der Einfluss von Capsaicinoiden auf die an der amyloidogenen APP-Prozessierung beteiligten Sekretasen sowie auf das A β -degradierende Enzym IDE.....	151
Abb. 48: Transkriptionsanalyse verschiedener STIM1-Spleißvarianten in <i>post mortem</i> Hirnproben von Alzheimerpatienten.....	152
Abb. 49: Lipidveränderungen in Homogenaten und Mitochondrien von SH-SY5Y-APP ^{swe} -Zellen Im Vergleich zu Kontroll-transfizierten SH-SY5Y-Zellen.....	154
Abb. 50: Veränderte Phosphatidylethanolaminspiegel (PE) in Mitochondrien von APP ^{swe} - gegenüber APP ^{wt} -Zellen.....	155
Abb. 51: Veränderungen des Lipidmetabolismus in PEX19 ^{-/-} - und PEX19 ^{-/-} PEX19 ^{C296S} -Zellen verglichen mit WT-Zellen.....	157
Abb. 52: Lipidomics-Analyse der Spiegel an PCaa- und PCae-Spezies in PEX19 ^{-/-} - und PEX19 ^{-/-} PEX19 ^{C296S} -Zellen verglichen mit HeLa-Kyoto-WT-Zellen.....	158
Abb. 53: Lipidomics-Analyse der Spiegel an TAG-Spezies in PEX19 ^{-/-} - und PEX19 ^{-/-} PEX19 ^{C296S} -Zellen verglichen mit HeLa-Kyoto-WT-Zellen.....	159
Abb. 54: De novo TAG-Anabolismus nach Behandlung mit Oleat sowie TAG-Katabolismus nach Triacsin C-Behandlung.....	161
Abb. 55: Vergleich zweier unterschiedlicher Klone der PEX19 ^{-/-} PEX19 ^{C296S} -Zelllinie.....	162
Abb. 56: In der vorliegenden Arbeit analysierte Vitamin D-Analoga.....	168
Abb. 57: Schematisches Modell der pleiotropen Effekte von Vitamin D und seiner Analoga auf die Alzheimerpathologie.....	192
Abb. 58: Übersicht über die detektierten Effekte von Acitretin auf die analysierten Neutrallipide, Phospholipide und Energiemetabolismus-assoziierten Lipide in Leber- und Hirngewebe von 5xFAD-Mäusen.....	200
Abb. 59: Schematische Darstellung der in der vorliegenden Arbeit detektierten Effekte von mittelkettigen und der sehr langkettigen gesättigten Fettsäuren auf die IDE-vermittelte A β -Degradation.....	206
Abb. 60: Schematische Übersicht über die kombinierten Rückkopplungszyklen zwischen AICD und dem Anabolismus sowie IDE-vermitteltem Katabolismus von A β	212

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: In der vorliegenden Arbeit verwendete Chemikalien.....	26
Tab. 2: In der vorliegenden Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien.....	27
Tab. 3: In der vorliegenden Arbeit verwendete Geräte und Zubehör.....	28
Tab. 4: Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien.....	30

Tab. 5: In der vorliegenden Arbeit analysierte Mausmodelle.....	31
Tab. 6: Zur Anreicherung der Kokosnuss-Öl- und Kontroll-Diät verwendete Öle.....	33
Tab. 7: Überblick über die NBB-Hirnproben von Kohorte I (Braak-Stadien 4-6).....	34
Tab. 8: Überblick über die NBB-Hirnproben von Kohorte II (Braak-Stadien 1-3).....	37
Tab. 9: In der vorliegenden Arbeit verwendete Vitamin D-Analoga.....	38
Tab. 10: In der vorliegenden Arbeit verwendete Phospholipide.....	38
Tab. 11: In der vorliegenden Arbeit verwendete Antikörper.....	39
Tab. 12: In der vorliegenden Arbeit verwendete kommerzielle Kits.....	39
Tab. 13: In der vorliegenden Arbeit verwendete Plasmide.....	40
Tab. 14: Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten murinen Primer.....	44
Tab. 15: Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten humanen Primer.....	46
Tab. 16: Zusammensetzung der Zellkulturmedien.....	48
Tab. 17: Volumina der Reagenzien zur lipofektions-basierten Transfektion.....	49
Tab. 18: In der vorliegenden Arbeit verwendete Inkubationsschema.....	50
Tab. 19: In der vorliegenden Arbeit angewendete Blockier- und Inkubationsbedingungen im Rahmen des immunologischen Proteinnachweises.....	56
Tab. 20: Versuchsansätze im Rahmen der Bestimmung der Degradation von A β 40.....	58
Tab. 21: Im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Messung der Enzymaktivität verwendete fluorometrische Substrate und Messparameter.....	59
Tab. 22: Geräteeinstellung 4000QTRAP zur Detektion von Phospholipiden, Triacylglyceriden und Carnitinen.....	67
Tab. 23: Im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete Lipidstandards.....	69
Tab. 24: Im Rahmen der Phosphatidylcholin-spezifischen MRM-Analyse verwendete Parameter.....	69
Tab. 25: Im Rahmen der Phosphatidylethanolamin-spezifischen MRM-Analyse verwendete Parameter.....	72
Tab. 26: Im Rahmen der Sphingomyeline-spezifischen MRM-Analyse verwendete Parameter.....	74
Tab. 27: Im Rahmen der Triacylglycerid-spezifischen MS-Analyse verwendete Parameter.....	75
Tab. 28: Im Rahmen der Carnitin-spezifischen MRM-Analyse verwendete Parameter.....	77
Tab. 29: Kooperationen im Rahmen der Vitamin D-Analoga-Studie.....	81
Tab. 30: Ergebnisse der Tukey Post-Hoc-Analyse der A β -Degradationsdaten auf N2a-Zellen.....	85
Tab. 31: Ergebnisse der Tukey Post-Hoc-Analyse der α -Sekretase-Aktivität in SH-SY5Y-WT- Zellen.....	88
Tab. 32: Statistische Analyse der Effekte der Vitamin D-Analoga auf die β -Sekretase in murinem Hirngewebe.....	91
Tab. 33: Ergebnisse Tukey Post-Hoc-Analyse der γ -Sekretase-Aktivität in SH-SY5Y-WT-Zellen.....	92
Tab. 34: Kooperationen im Rahmen der Vitamin D-Genexpressionsstudie.....	94
Tab. 35: Expressionsänderungen der 117 ausgewählten Alzheimer-relevanten Gene unter milder bis moderater Hypovitaminose D (n = 4).....	96
Tab. 36: Kombinierte Analyse beider Mauskohorten (n = 4 + n = 3) der 25 vielversprechendsten Alzheimer-relevanten Gene, welche basierend auf den Ergebnissen aus der ersten Mauskohorte ausgewählt wurden.....	98
Tab. 37: Kooperationen im Rahmen der Calcitriol- <i>Lipidomics</i> -Analyse.....	101
Tab. 38: Kooperationen im Rahmen der Acitretin- <i>Lipidomics</i> -Analyse.....	112
Tab. 39: Kooperationen im Rahmen der Analyse gesättigter Fettsäuren.....	122
Tab. 40: Kooperationen im Rahmen der Analyse eines potenziellen Zusammenhangs zwischen AICD und IDE.....	129
Tab. 41: Überblick über die A β -Degradation in den analysierten Zellkulturmodellen.....	133

1 Zusammenfassung / Summary

1.1 Der Einfluss bioaktiver Substanzen auf die molekularen Mechanismen der Alzheimererkrankung

Bei Morbus Alzheimer handelt es sich um die am häufigsten diagnostizierte Form der Demenz, die auf neuropathologischer Ebene unter anderem durch extrazelluläre Plaques im Hirngewebe, die hauptsächlich aus akkumulierten Amyloid- β -Peptiden bestehen, gekennzeichnet ist. Amyloid- β ($A\beta$) ist das Produkt der sequenziellen amyloidogenen Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins (APP).

Eine starke Assoziation zwischen der Alzheimererkrankung und einer Hypovitaminose des Steroids Vitamin D liegt in zahlreichen epidemiologischen Studien begründet, die mild- bis moderat-reduzierte Vitamin D-Spiegel in Alzheimerpatienten im Vergleich zu gesunden Individuen detektierten. Vorausgegangene Arbeiten der Arbeitsgruppe Experimentelle Neurologie konnten belegen, dass eine Vitamin D-Hypovitaminose in Neuroblastomzellen über die Beeinflussung der β -Sekretase und des $A\beta$ -Abbaus, vor allem der Neprilysin-medierten Degradation, einen negativen Einfluss auf Prozesse hat, die bei der Alzheimererkrankung eine wichtige Rolle spielen.

Eine Vielzahl an Vitamin D-Analoga, die sich in ihrer Affinität zum Vitamin D-Rezeptor, ihrer Serumhalbwertszeit sowie ihrem Effekt auf den Kalziumspiegel unterscheiden, findet therapeutischen Einsatz. Hieraus ergab sich die Fragestellung, ob diese Vitamin D-Analoga einen vergleichbaren Effekt auf die molekularen Mechanismen der Alzheimerpathologie besitzen, wie er für Vitamin D beobachtet wurde. Diese Frage wurde in Analogie zu vorausgegangenen Arbeiten in Neuroblastomzellen untersucht. Es resultierte bezüglich des Gesamteffektes von Vitamin D auf $A\beta$ kein signifikanter Unterschied zwischen Vitamin D und den Analoga. Jedoch konnten für die einzelnen Vitamin D-Analoga unterschiedliche Effektstärken hinsichtlich des Anabolismus und Katabolismus von $A\beta$ detektiert werden.

Für Vitamin D und seine Analoga ist ein durch den Vitamin D-Rezeptor medierter Effekt auf die Genexpression bekannt. Es stellte sich daher die Frage, ob Alzheimer-relevante Gene ebenfalls durch diesen Rezeptor-vermittelten Mechanismus beeinflusst werden. Hierzu wurden insgesamt 117 Gene in murinen Hirnproben analysiert, von denen acht Gene signifikant von einer Hypovitaminose beeinflusst wurden. Von diesen acht Genen waren bereits zwei aus der Literatur bekannt und wurden bewusst als interne Positivkontrollen in die Studie aufgenommen.

Interessanterweise waren bei den untersuchten Genen auch Gene des Lipidmetabolismus verändert, woraus sich die Fragestellung ergab, ob eine Vitamin D-Hypovitaminose einen Effekt auf das Lipidom von Neuroblastomzelllinien ausüben kann. Die detektierten Einflüsse veränderten vorzugsweise die Sättigung und Kettenlänge der analysierten Lipide.

In vorausgegangenen Studien vermittelte Vitamin D seine Wirkung hauptsächlich über die β -Sekretase und den $A\beta$ -Katabolismus. Daher sollte in folgenden Experimenten untersucht werden, ob die detektierten Einflüsse einer Hypovitaminose auf die Lipidhomöostase einen Effekt auf die $A\beta$ -Degradation medieren können. Hierbei zeigte sich, dass insbesondere kurzkettige Fettsäuren die $A\beta$ -Degradation über eine Erhöhung der Expression des $A\beta$ -abbauenden Enzyms Insulin-degradierendes Enzym (IDE) fördern. Gleichzeitig wurde detektiert, dass kurzkettige Fettsäuren die Aktivität von IDE erhöhen.

Weiterhin ist in der Literatur beschrieben, dass die beobachteten Veränderungen in der Lipidhomöostase die Aktivität der an der Prozessierung beteiligten Sekretasen beeinflussen können, was durch die Experimentelle Neurologie experimentell bestätigt werden konnte. Auf Grund dessen, dass durch eine Veränderung der Sekretase-Aktivität nicht nur die Produktion von A β , sondern auch die der APP-intrazellulären Domäne (AICD) beeinflusst wird, sollte experimentell adressiert werden, ob die Produktion und Aktivität von IDE durch einen veränderten Gehalt an AICD beeinflusst wird. Hieraus würde sich ein Regelkreis ergeben, bei dem die Lipidkomposition sowohl den A β - als auch den AICD-Metabolismus beeinflusst und gleichzeitig der AICD-Metabolismus sowohl den Lipidmetabolismus als auch den A β -Abbau reguliert (Abbildung 1). Eine ähnliche Regulation wurde bereits für die AICD und Neprilysin beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde ein ähnlicher Mechanismus für die Regulation von IDE detektiert. Dieser äußerte sich dadurch, dass in Abwesenheit der AICD die Aktivität, der Proteingehalt sowie die Transkription von IDE reduziert waren. Somit konnte auf molekularer Ebene der Mechanismus der IDE-Regulation durch die Prozessierung von APP weiter aufgeklärt werden.

In einer abschließenden Fragestellung sollten neben Vitamin D auch andere fettlösliche Vitamine hinsichtlich ihres Einflusses auf Alzheimer-relevante Stoffwechselwege untersucht werden. In diesem Zusammenhang wurde in vorausgegangenen Arbeiten auf die Substanzklasse der E-Vitamine fokussiert. Zudem wurde in der Literatur bereits ein modulierender Effekt von Vitamin A auf die nicht-amyloidogene Prozessierung beschrieben. In Analogie zu Vitamin D sollte in der vorliegenden Arbeit das Vitamin A-Derivat Acitretin, welches unter anderem bei Psoriasis vulgaris therapeutisch eingesetzt wird, untersucht werden. Es stellte sich heraus, dass Acitretin *in vivo* in der Lage ist die Lipidkomposition im Gehirn und in der Leber zu beeinflussen. Die Veränderungen der Lipidhomöostase in der Leber reflektierten dabei den in der Literatur bekannten negativen Einfluss dieses Vitamin A-Derivates auf die Triglyzeride. Interessanterweise wurden deutliche Unterschiede zwischen den Veränderungen der Lipidhomöostase in Leber- und Hirngewebe detektiert. Hier müssen weitere Arbeiten anknüpfen, um weiterführend zu überprüfen, ob die durch Acitretin veränderte Lipidhomöostase im Gehirn bezüglich der Alzheimererkrankung einen negativen oder positiven Einfluss vermitteln könnte.

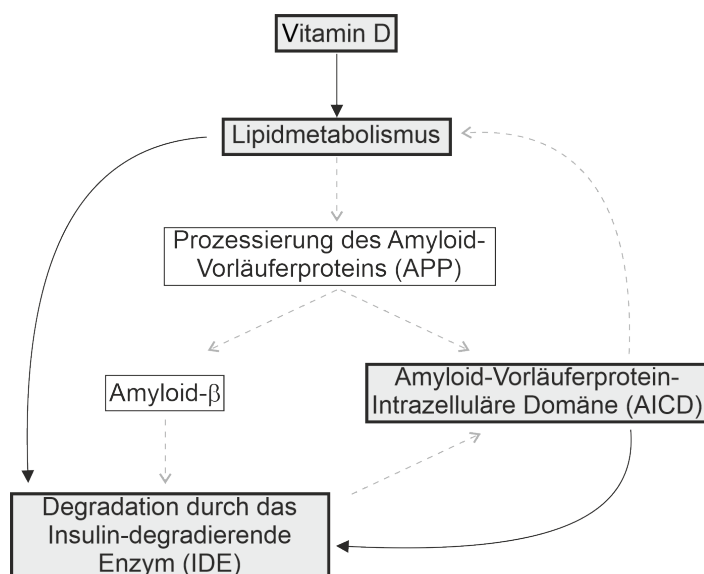


Abbildung 1: Zusammenfassung. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Vitamin D auf die molekularen Mechanismen der Alzheimererkrankung weiter aufgeklärt. Es wurden Effekte auf den Lipidmetabolismus detektiert, welche die IDE-vermittelte A β -Degradation beeinflussten. Gleichzeitig konnte festgestellt werden, dass die AICD in der Lage ist den Abbau von A β zu regulieren. Die gestrichelten Linien stellen Beziehungen dar, die in der Literatur beschrieben wurden. Die durchgezogenen Linien repräsentieren diejenigen Wechselwirkungen, die in der vorliegenden Arbeit aufgezeigt wurden.

1.2 Influence of bioactive compounds on molecular mechanisms of Alzheimer's disease

Morbus Alzheimer is the most frequent diagnosed form of dementia, characterized at neuropathological level by, among other things, extracellular plaques in brain tissue consisting mainly of accumulated amyloid-peptides. Amyloid- β ($A\beta$) is the product of sequential amyloidogenic processing of the amyloid precursor protein (APP).

A strong association between Alzheimer's disease (AD) and hypovitaminosis of the secosteroid vitamin D is based on numerous epidemiological studies that detected mild-to-moderate reduced vitamin D levels in AD patients compared to healthy individuals. Previous work by the Experimental Neurology group has demonstrated, that vitamin D hypovitaminosis in neuroblastoma cells has a negative impact on processes involved in AD via interference with β -secretase and $A\beta$ degradation, particularly neprilysin-mediated degradation.

A variety of vitamin D analogues, which differ in their affinity for the vitamin D receptor, their serum half-life and their effect on calcium levels, are used therapeutically. This raised the question whether these vitamin D analogues have a comparable effect on the molecular mechanisms of AD pathology as observed for vitamin D. This question was investigated in analogy to previous work in neuroblastoma cells. No significant difference between vitamin D and the analogs resulted with respect to the overall effect of vitamin D on $A\beta$. However, different effect sizes could be detected for the individual vitamin D analogues with respect to the anabolism and catabolism of $A\beta$.

For vitamin D and its analogues, an effect on gene expression mediated by the vitamin D receptor is known. Therefore, the question arose whether AD-related genes are also influenced by this receptor-mediated mechanism. For this purpose, a total of 117 genes were analyzed using murine brain samples, of which eight genes were significantly affected by hypovitaminosis. Of these eight genes, two were already known from the literature and were deliberately included in the study as internal positive controls.

Interestingly, genes involved in lipid metabolism were also altered in the genes examined, raising the question of whether vitamin D hypovitaminosis can exert an effect on the lipidome of neuroblastoma cell lines. The detected influences preferentially altered the saturation and chain length of the analyzed lipids.

In previous studies, vitamin D mediated its effect mainly through β -secretase and $A\beta$ catabolism. Therefore, the following experiments were designed to investigate whether the detected influences of hypovitaminosis on lipid homeostasis could mediate an effect on $A\beta$ degradation. Here, short-chain fatty acids were found to promote $A\beta$ degradation via an increase in the expression of the $A\beta$ degrading enzyme insulin-degrading enzyme (IDE). At the same time, short-chain fatty acids were detected to increase the activity of IDE.

Furthermore, it is described that the observed changes in lipid homeostasis can influence the activity of secretases involved in processing, which could be confirmed experimentally by the Experimental Neurology. Since not only the production of $A\beta$ but also the production of the APP-intracellular domain (AICD) is affected by a change in secretase activity, it should be addressed experimentally whether the production and activity of IDE is influenced by a changed content of AICD.

This would result in a regulatory loop in which lipid composition influences both A β and AICD metabolism and, at the same time, AICD metabolism regulates both lipid metabolism and A β degradation (figure 2). Similar regulation has been described previously for AICD and neprilysin.

In the present work, a similar mechanism was detected for the regulation of IDE. This was manifested by the fact that in the absence of AICD, the activity, protein level and the transcription of IDE were reduced. Thus, at the molecular level, the mechanism of IDE regulation by processing APP could be further elucidated.

In a final question, in addition to vitamin D, other fat-soluble vitamins were to be investigated regarding their influence on metabolic pathways relevant to AD. In this context, previous work has focused on the substance class of E vitamins. Moreover, a modulating effect of vitamin A on non-amyloidogenic processing has already been described in the literature. In analogy to vitamin D, the vitamin A derivative acitretin, which is used therapeutically for psoriasis vulgaris, among other things, was to be investigated in the present work. It turned out that acitretin can influence the lipid composition in the brain and liver *in vivo*. In this regard, the changes in lipid homeostasis in the liver reflected the negative influence of this vitamin A derivative on triglycerides known in the literature. Interestingly, significant differences were detected between the changes in lipid homeostasis in liver and brain tissue. Further work is needed to investigate whether the altered lipid homeostasis in the brain due to acitretin could mediate a negative or positive influence on AD.

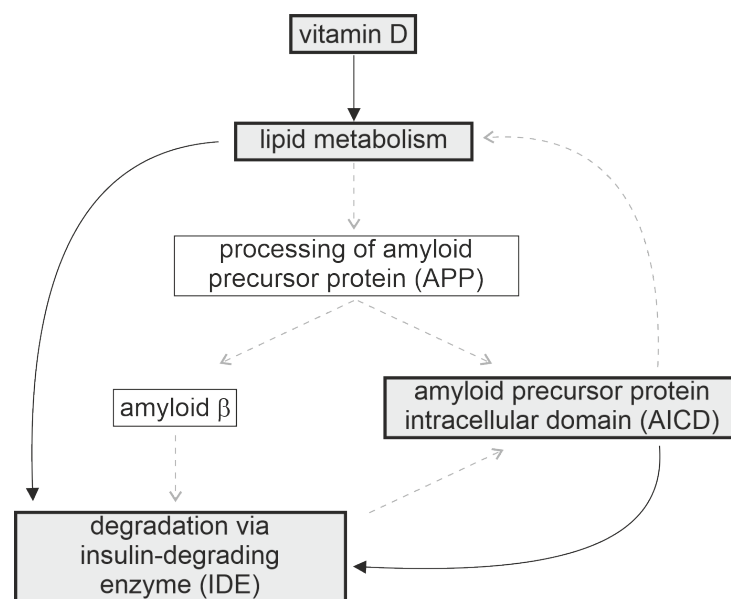


Abbildung 2: Summary. In the present work, the influence of vitamin D on the molecular mechanism of Alzheimer's disease was further elucidated. Effects on lipid metabolism were detected, which influenced IDE-mediated A β degradation. At the same time, AICD was found to be able to regulate A β degradation. The dashed lines represent relationships that have been described in the literature. The solid lines represent those interactions that were revealed in the present work.

2 Einleitung

2.1 Die Alzheimer-Krankheit

2.1.1 Epidemiologische und klinische Aspekte

Bei der Alzheimererkrankung handelt es sich um eine neurodegenerative, progressive und irreversible Form der Demenz, die 1906 erstmalig vom deutschen Nervenarzt Alois Alzheimer beschrieben und nach ihm benannt wurde (GOEDERT, SPILLANTINI, 2006; LANE et al., 2018). Als neurodegenerative Erkrankungen werden diejenigen Krankheiten zusammengefasst, die durch Funktionsstörungen von Neuronen und deren Absterben charakterisiert sind und zu denen neben Morbus Alzheimer beispielsweise auch Morbus Parkinson oder Multiple Sklerose zählen (CHAUDHURI, 2013; DUGGER, DICKSON, 2017). Weltweit waren im Jahr 2021 55 Millionen Menschen von einer Demenz betroffen und Prognosen zufolge werden im Jahr 2030 78 Millionen Demenzpatienten zu erwarten sein (GAUTHIER et al., 2021). In Deutschland leben derzeit mehr als 1,6 Millionen Patienten mit einer Demenz (BUNDESGESUNDHEITSMINISTERIUM, 2020) und die Anzahl an neu diagnostizierten neurodegenerativen Erkrankungen beträgt circa 300.000 pro Jahr. Hinzu kommt, dass die mittlere Lebenserwartung steigt und Hochrechnungen zufolge im Jahr 2050 in Deutschland geschlechtsabhängig zwischen 81 und 87 Jahren liegen wird (EISENMENGER et al., 2006). Einhergehend mit diesem Anstieg in der älteren Bevölkerung ist mit einer Zunahme der Zahl an Patienten, die an neurodegenerativen Erkrankungen leiden, zu rechnen. Dass das Auftreten der Alzheimererkrankung mit zunehmendem Alter häufiger wird, berichtete beispielsweise eine Studie aus den Vereinigten Staaten von Amerika. Diese beschrieb, dass 3 % der Bevölkerung zwischen 65 und 74 Jahren die Diagnose Morbus Alzheimer erhalten, während es sich bei den über 85-Jährigen schon um 32 % handelt (HEBERT et al., 2013). Da derzeit noch keine Therapieansätze mit Heilungsaussicht für neurodegenerative Erkrankungen zur Verfügung stehen, liegt ein Fokus der aktuellen Alzheimer-Forschung auf der Prävention.

2.1.1.1 Klinische Symptomatik und Stadien

Morbus Alzheimer gilt bei Menschen, die älter als 65 Jahre sind, als die häufigste Ursache einer Demenz (RABINOVICI, 2019), wobei auch Mischformen mit beispielsweise der vaskulären Demenz auftreten können. Die mittlere Überlebensdauer von Alzheimerpatienten beträgt je nach Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose zwischen vier und neun Jahren (BROOKMEYER et al., 2002; GANGULI et al., 2005; HELZNER et al., 2008; LARSON et al., 2004). Weitere Formen der Demenz sind beispielsweise die vaskuläre Demenz, die Lewy-Körper-Demenz oder die frontotemporale Demenz (ALZHEIMER'S-ASSOCIATION-REPORT, 2021). Während bei der vaskulären Demenz neben initialen Symptomen, wie beispielsweise einem beeinträchtigten Urteilsvermögen, häufig auch Probleme mit motorischen Funktionen auftreten, wird die Lewy-Körper Demenz unter anderem von Symptomen wie visuellen Halluzinationen oder Schlafstörungen begleitet. Bei der Frontotemporalen Demenz treten häufig unter anderem Persönlichkeits- und Verhaltensveränderungen sowie Sprachstörungen auf, während die Gedächtnisfunktion in frühen Stadien dieser Demenzform unbeeinträchtigt ist (ALZHEIMER'S-ASSOCIATION-REPORT, 2021).

Morbus Alzheimer kann anhand der Symptomatik in die drei Stadien mild/früh, moderat und schwer gegliedert werden (ZVEROVA, 2019). Diesen Stadien vorausgestellt wird die präklinische Alzheimererkrankung sowie die Phase der milden kognitiven Beeinträchtigungen auf Grund einer Alzheimererkrankung (engl. *mild cognitive impairments*, MCI) (ALZHEIMER'S-ASSOCIATION-REPORT, 2021).

In der präklinischen Phase lassen sich Veränderungen in Alzheimerbiomarkern, wie beispielsweise erhöhte Spiegel an Amyloid- β oder ein reduzierter Glukosemetabolismus im Gehirn durch Positronen-Emissions-Tomographie (PET) messen (MOSCONI, 2013; SPERLING et al., 2020). Jedoch entwickeln die Betroffenen noch keine Alzheimer-typischen Symptome, wie zum Beispiel Gedächtnisverlust, auf die an späterer Stelle detaillierter eingegangen wird. Dieses Diagnoseverfahren sollte nicht exklusiv angewandt werden und Bedarf einer Weiterentwicklung, da es Personen gibt, die zwar die Alzheimer-typischen Veränderungen im Gehirn aufweisen, jedoch im Verlauf ihres Lebens keine MCI- oder Alzheimersymptome entwickeln (BENNETT et al., 2006).

Während der MCI-Phase sind die Alzheimer-spezifischen Biomarker ebenfalls verändert und zusätzlich treten leichte kognitive Beeinträchtigungen auf, die dem Betroffenen selbst und nahestehenden Angehörigen auffallen können, jedoch noch nicht mit dem selbstständigen Leben und alltäglichen Aktivitäten interferieren (ALZHEIMER'S-ASSOCIATION-REPORT, 2021). Unter den MCI-Patienten entwickeln circa 15 % nach zwei Jahren (PETERSEN et al., 2018) und circa 32 % innerhalb von fünf Jahren (WARD et al., 2013) eine Demenz beziehungsweise Alzheimererkrankung. Jedoch gibt es auch Betroffene, die keinen fortschreitenden kognitiven Rückgang aufweisen oder zu einer normalen kognitiven Funktion zurückkehren (MORADI et al., 2021). Aus diesem Grund ist die Möglichkeit der Identifizierung derjenigen MCI-Patienten mit einem erhöhten Risiko einer Demenzentwicklung Gegenstand aktueller Forschung.

Morbus Alzheimer wird durch Symptome wie Gedächtnisverlust, welcher sich anfänglich hauptsächlich auf kürzlich generierte Erinnerungen oder Konversationen konzentriert, Beeinträchtigungen des abstrakten Denkens oder des Urteilsvermögens, aber auch Verhaltens- und Stimmungsveränderungen, wie Apathie und Depressionen, einhergehend mit starken Emotionen, charakterisiert (ALZHEIMER'S-ASSOCIATION-REPORT, 2021; ATRI, 2019; ZVEROVA, 2019). Begleitet werden diese Symptome von Veränderungen der Biomarker in den betroffenen Hirnregionen. Im Verlauf der Alzheimererkrankung variieren die Symptome, welche von den betroffenen noch Personen selbst wahrgenommen werden können, und reflektieren die neuronalen Schädigungen in speziellen Hirnarealen (ALZHEIMER'S-ASSOCIATION-REPORT, 2021). In der milden Phase beeinträchtigen die Symptome wenige alltägliche Situationen, wodurch die Betroffenen noch selbstständig leben können und nur minimale Unterstützung benötigen. Die moderate Phase, welche häufig am längsten anhält, ist dadurch gekennzeichnet, dass die Patienten eine Vielzahl alltäglicher Aufgaben, wie beispielsweise die Aufrechterhaltung der Körperhygiene, nicht mehr ausführen können sowie Schwierigkeiten in der Kommunikation und Persönlichkeits- und Verhaltensänderungen auftreten. Im schweren Stadium der Erkrankung sind die Patienten nicht mehr in der Lage, die Kontrolle über ihren Körper auszuüben, sodass sie größte Schwierigkeiten mit dem Schlucken, Gehen und Sprechen haben und eine ständige, pflegende Betreuung benötigen. In dieser Phase treten auf Grund der Bettlägerigkeit unter anderem Infektionen, wie beispielsweise Aspirationspneumonien, oder Blutgerinnsel auf, die häufig den Grund für das Versterben der Patienten darstellen (ALZHEIMER'S-ASSOCIATION-REPORT, 2021).

2.1.1.2 Differenzierung zwischen der sporadischen und familiären Form

Anhand des Erkrankungsalters kann zwischen zwei Formen der Alzheimererkrankung unterschieden werden: der familiären Form (< 65 Jahren; engl. *early onset Alzheimer's disease*, EOAD) und der sporadischen senilen Form (\geq 65 Jahren; engl. *late onset Alzheimer's disease*, LOAD).

Die sporadische Variante macht mehr als 95 % der Alzheimerfälle aus (REITZ, MAYEUX, 2014) und das fortschreitende Alter stellt einen hauptsächlichen Risikofaktor dar (BREIJYEH, KARAMAN, 2020). Die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung dieser Form der Demenz verdoppelt sich ab einem Alter von 65 Jahren alle fünf Lebensjahre (MCDOWELL, 2001; QIU et al., 2009). Ein im Zusammenhang mit dem Risiko für die sporadische Form von Morbus Alzheimer identifiziertes Gen ist *APOE* (Apolipoprotein E), dessen Variante $\epsilon 4$ in heterozygoter Ausprägung mit einem dreifach und in homozygoter Form mit einem 12-fach erhöhten Alzheimerisiko assoziiert wird (GIRI et al., 2016; MAHLEY, 2016; SILVA et al., 2019). Die Involvierung von APOE in den Fettsäuretransport liefert einen Hinweis dafür, dass der Lipidmetabolismus auf die Entstehung und Progression der Alzheimererkrankung Einfluss haben könnte. Bestärkt wird diese Vermutung dadurch, dass Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen, wie erhöhte Cholesterinspiegel, Fettleibigkeit, Bluthochdruck und Diabetes mellitus mit einem gesteigerten Risiko für die Entwicklung von Morbus Alzheimer assoziiert sind (SILVA et al., 2019). Darüber hinaus gelten unter anderem MCI, mittelschwere bis schwere Schädel-Hirn-Trauma und geringe schulische Bildung als Risikofaktoren für die Entwicklung der Alzheimererkrankung oder anderer Demenzformen.

Der sporadischen Variante der Alzheimer-Krankheit steht die familiäre Form, welche circa 1-5 % der Patienten betrifft (REITZ, MAYEUX, 2014), gegenüber. Diese unter anderem in Mutationen der für die Proteine Amyloides Vorläuferprotein (engl. *amyloid precursor protein*, APP), Presenilin 1 (PSEN1) und Presenilin 2 (PSEN2) kodierenden Gene *APP*, *PSEN1* und *PSEN2* begründete Form der Alzheimererkrankung tritt vor dem 65. Lebensjahr auf (MENDEZ, 2017) und es ist von einer hohen Penetranz (circa 85 %) der pathogenen Mutationen auszugehen (REITZ, MAYEUX, 2014).

In diesem Kontext ist zu erwähnen, dass die Charakterisierung des genetischen Hintergrunds der Alzheimer-Krankheit, die Gegenstand aktueller Forschung ist, wie beispielsweise die aktuelle Veröffentlichung von Bellenguez *et al.* verdeutlicht (BELLENGUEZ et al., 2022), eine Gelegenheit bietet, die mit dieser Krankheit in Verbindung stehenden pathophysiologischen Prozesse aufzuklären. Dies spielt für die Prävention der Erkrankung eine entscheidende Rolle, da pathophysiologische Veränderungen bereits einige Jahre vor einer klinischen Manifestation beginnen.

2.1.1.3 Die Neuropathologie

Hinsichtlich der Neuropathologie der Alzheimererkrankung sind auf makroskopischer Ebene zumindest moderate kortikale Atrophien zu verzeichnen, die am meisten in den multimodalen Assoziationskortex sowie den Strukturen des limbischen Lappens ausgeprägt sind und mit einem reduzierten Gewicht des Gehirns einhergehen. Sichtbar erweiterte Gräben (lat. *Sulci*) und ein Rückgang der Windungen (lat. *Gyri*) im frontalen und temporalen Kortex sind ebenfalls charakteristisch. Die makroskopischen Charakteristika sind jedoch nicht Alzheimer-spezifisch und daher als eher unterstützend für die Diagnosestellung anzusehen (DETURE, DICKSON, 2019).

Zu den hauptsächlichen neuropathologischen Merkmalen der Alzheimer-Krankheit auf mikroskopischer Ebene zählen neben den extrazellulären senilen Amyloid- β (A β) Plaques in Hirnregionen wie dem Hippocampus und Kortex, welche für das Gedächtnis und die Kognition verantwortlich sind, auch intrazelluläre neurofibrilläre Bündel. Weiter gelten eine Atrophie des Hirngewebes, ein Verlust von Synapsen sowie immunologische Veränderungen durch Mikrogliazellen als Merkmale der Alzheimererkrankung (DETURE, DICKSON, 2019). Der Synapsenverlust tritt hauptsächlich im parieto-temporalen und frontalen Kortex, dem Ort der Generierung von Gedächtnisinhalten, auf, weshalb der dortige Verlust neuronaler Verbindungen die Alzheimer-typischen Defizite bedingt (MIRRA et al., 1991). Auf die A β -Plaques und deren Entstehung wird im folgenden Kapitel (Kapitel 2.1.2) detailliert eingegangen.

Bei den neurofibrillären Bündeln handelt es sich um eine hyperphosphorylierte und fehlgefaltete Form des strukturellen mikrotubuli-assoziierten Proteins Tau innerhalb von Neuronen (GRUNDKE-IQBAL et al., 1986). Neben den Dendriten, die der Signalaufnahme dienen, stellen Axone einen weiteren neuronalen Fortsatz dar, welcher die Funktion besitzt, Neuronen mit ihren Zielzellen zu verbinden. Auf Grund dessen, dass Axone von beispielsweise Motoneuronen eine Länge von bis zu einem Meter haben können, müssen diese in der Lage sein, die unter anderem zur Zellkommunikation notwendigen Stoffe beziehungsweise Vesikel zu entfernten Synapsen transportieren zu können. Dieser Transport wird über komplexe intrazelluläre Prozesse gewährleistet, die als schneller axonaler Transport (engl. *fast axonal transport*, FAT) bezeichnet werden. Er ist für die Aufrechterhaltung der neuronalen Funktion und das neuronale Überleben essenziell, weshalb Beeinträchtigungen zur Neurodegeneration führen (COMBS et al., 2019). Die physiologische Funktion von Tau liegt in der Modulierung der Signalweiterleitung, die beispielsweise durch den Aufbau und die Stabilisierung der Mikrotubuli-Struktur oder Kinesin-Mikrotubuli-Interaktionen vermittelt wird. In ihrer pathologischen Form, die beispielsweise im Rahmen der Alzheimererkrankung oder anderer Tauopathien auftritt, verlieren die Tau-Proteine beispielsweise auf Grund ihrer Hyperphosphorylierung die Fähigkeit, Mikrotubuli zu binden und zu stabilisieren, was unter anderem in einer Destabilisierung des Zytoskeletts sowie in beeinträchtigten axonalen Transportprozessen resultiert (ALONSO et al., 1994). Neurofibrilläre Bündel können in verschiedenen Stadien auftreten, wobei Prä-Bündel bestehend aus ersten Fehlkonformationen von Tau im Zellkörper und Dendriten von Neuronen initial auftreten. Diese entwickeln sich zu aggregierten Filamenten im Perikaryon und den proximalen Zellfortsätzen weiter, wobei die Morphologie der Bündel von der Art der Neurone, in welchen sie entstehen, abhängig ist (PERL, 2010). Die reifen Bündel verdrängen schließlich den Zellkern sowie weitere essenzielle Zellbestandteile, was das Absterben des betroffenen Neurons bedingt (DETURE, DICKSON, 2019). Die neuronale Tau-Pathologie korreliert in ihrer Ausprägung und Lokalisierung mit dem Verlust von Nervenzellen, der Schwere der Alzheimererkrankung und dem klinischen Verlauf (ARRIAGADA et al., 1992; BIERER et al., 1995). Anhand der Ausbreitung neurofibrillärer Veränderungen im Telencephalon lassen sich nach Braak & Braak sechs Entwicklungsstadien der Alzheimer-Krankheit unterscheiden. In den ersten beiden Stadien dringt der pathologische Prozess in die transentorhinalen und entorhinalen Regionen ein. In den Stadien III und IV erfolgt ein Vordringen in die angrenzenden kortikalen und subkortikalen Komponenten des limbischen Systems. In den Stadien V und VI sind schließlich die Assoziationsgebiete des Neokortex betroffen (BRAAK et al., 1998).

Auf zellulärer Ebene gibt es neben den Beeinträchtigungen des A β - und Tau-Metabolismus eine Vielzahl weiterer Prozesse, die zur Entstehung dieser multifaktoriellen Form der Demenz beitragen. Zu diesen zählen neben der schon aufgeführten Lipidhomöostase (GARCIA-VINUALES et al., 2021; KAO et al., 2020) beispielsweise der Energie-Metabolismus sowie Neuroinflammation (SUNG et al., 2020), oxidativer Stress (IONESCU-TUCKER, COTMAN, 2021), Signaltransduktion (CHIDAMBARAM, CHINNATHAMBI, 2020), Neurogenese (BERGER et al., 2020) und transkriptionelle Regulierung (NUNOMURA, PERRY, 2020).

2.1.2 Molekulare Mechanismen der Amyloid- β Pathologie

Wie im vorausgegangenen Kapitel bereits beschrieben, kann die Bildung von A β -Plaques auf Veränderungen in der sequenziellen proteolytischen Prozessierung von APP zurückgeführt werden. APP ist ein Typ 1-Transmembranprotein, was bedeutet, dass der N-Terminus eine extrazelluläre und der C-Terminus eine intrazelluläre Ausrichtung hat. Es handelt sich um ein Mitglied einer konservierten Proteinfamilie, welche auch die APP Homologen APLP1 und APLP2 (engl. *APP-like proteins 1 / 2*) inkludiert. APP kann auf zwei Weisen prozessiert werden, wobei der in nicht-neuronalen Zellen quantitativ überlegenen nicht-amyloidogenen Prozessierung die amyloidogene Prozessierung gegenübersteht (Abbildung 3). Während der nicht-amyloidogenen Prozessierung wird APP initial durch die α -Sekretase zwischen Lysin-16 und Leucin-17 innerhalb der A β -Sequenz gespalten, woraus die Ektodomäne sAPP α (engl. *soluble APP α*) und das α -C-terminale Fragment (α -CTF) resultieren. Analog dazu erfolgt der initiale Schnitt in der amyloidogenen Prozessierung durch die β -Sekretase und es entstehen die Ektodomäne sAPP β und das β -C-terminale Fragment (β -CTF). Die beiden membranständigen C-terminalen Fragmente werden weiter durch die γ -Sekretase prozessiert und in beiden Fällen resultiert jeweils die APP-Intrazelluläre Domäne (engl. *APP intracellular domain*, AICD) sowie durch die nicht-amyloidogene Prozessierung das p3 Protein und durch die amyloidogene Prozessierung das sekretierte, neurotoxische A β Peptid (CHEN et al., 2017; HAASS, 2004).

Im folgenden Abschnitt werden die an der proteolytischen Prozessierung von APP beteiligten Sekretasen genauer vorgestellt. Bei den Proteasen, die die Enzymaktivität der α -Sekretase vermitteln, handelt es sich um membrangebundene Metalloproteasen (LAMMICH et al., 1999). Mitglieder der ADAM- (engl. *a disintegrin and metalloprotease*) Familie wurden als α -Sekretasen identifiziert, da beispielsweise eine veränderte Expression von ADAM9, ADAM10 und ADAM17 in einer geänderten Generierung von sAPP α resultierte (ASAI et al., 2003). Basierend auf der aktuellen Literatur gelten ADAM10 und ADAM17 in vielen Zelltypen als wichtige, konstitutive α -Sekretasen und stehen daher häufig im Fokus der Erforschung Alzheimer-spezifischer Therapiemöglichkeiten (siehe Kapitel 2.1.4) (KUHN et al., 2010). Während der amyloidogenen Prozessierung von APP ist BACE1 (engl. *β -site APP cleaving enzyme 1*) als hauptsächliche β -Sekretase für den geschwindigkeitsbegrenzenden Schritt in der Generierung von A β Peptiden verantwortlich (HAMPEL et al., 2021b; SINHA et al., 1999; VASSAR et al., 1999). Bei BACE1 handelt es sich um eine membrangebundene Aspartatprotease, deren pH-Optimum im sauren Milieu liegt. Aus diesem Grund ist die primäre Lokalisierung von BACE1 im Golgi-Apparat und den Endosomen (VASSAR et al., 1999).

Neben dem Schnitt an Position 1 (Asparaginsäure-1) der A β Sequenz, wurde für BACE1 auch eine Spaltung an der β' -Stelle, welche sich zwischen Tyrosin-10 und Glutaminsäure-11 innerhalb der A β Sequenz befindet, beschrieben (CREEMERS et al., 2001; VASSAR et al., 1999).

In Bezug auf die γ -Sekretase wurde vor weniger als 25 Jahren Presenilin 1 als Hauptbestandteil des γ -Sekretasekomplexes, welcher 19 Transmembrandomänen enthält, identifiziert (DE STROOPER et al., 1998; WOLFE et al., 1999). Bei Presenilin handelt es sich um eine Aspartatprotease, für deren proteolytische Enzymaktivität die Assoziation mit den drei weiteren Proteinen Nicastrin, anteriorer Pharynxdefekt 1 (engl. *anterior pharynx defective 1*, Aph1) sowie Presenilin-Verstärker-2 notwendig ist (DE STROOPER, 2003; KIMBERLY et al., 2003). Innerhalb des menschlichen Genoms liegen jeweils zwei Gene für Presenilin (*PSEN1* und *PSEN2*) sowie jeweils eines für das Aph1-Homolog A (*APH1A*) und das Aph1-Homolog B (*APH1B*) vor, wobei innerhalb des tetrameren γ -Sekretasekomplexes je beide Formen assoziiert sein können (DE STROOPER, 2003; HEBERT et al., 2004; SHIROTANI et al., 2004). Die γ -Sekretase ist für die Endoproteolyse der aus der α - oder β -Sekretase-Spaltung hervorgegangenen α -CTF oder β -CTF von APP verantwortlich und ihre Enzymaktivität resultiert während der amyloidogenen Prozessierung in der Generierung von unterschiedlichen langen A β -Peptiden. Als die dabei hauptsächlich durch den Schnitt an der γ -Stelle generierten Peptidspezies gelten A β_{38} , A β_{40} , welches auf Valin-40 endet, und A β_{42} mit Alanin-42 als endständige Aminosäure (JARRETT et al., 1993). Gleichzeitig findet an der ϵ -Stelle ein Schnitt statt, der in der intrazellulären Freisetzung der AICD, welche entweder an Valin-51 oder Methionin-52 startet, resultiert. Ein für diese Spaltung vorgeschlagenes Modell beschreibt, dass der initiale Schnitt der γ -Sekretase an der ϵ -Stelle stattfindet und der Sekretasekomplex ausgehend von dieser Stelle das Protein progressiv in Schritten von drei C-terminalen Säureresten, was einer α -helikalen Drehung entspricht, verkürzt, bis die γ -Stelle erreicht ist (TAKAMI et al., 2009).

Die neben A β durch die sequenzielle Prozessierung von APP entstehende AICD ist in die transkriptionelle Regulierung einer Vielzahl unterschiedlicher Gene involviert. Zu diesen gehören beispielsweise *APP*, *BACE1*, *NEP*, der mitochondriale induzierbare Transkriptions-Ko-Aktivator *PGC-1a* sowie Schlüsselenzyme verschiedener Lipidsignalwege (GRIMM et al., 2015a; PARDOSSI-PIQUARD et al., 2005; ROBINSON et al., 2014; VON ROTZ et al., 2004). AICD-Peptide, welche nur eine sehr geringe zytosolische Halbwertszeit aufweisen, können über das YENPTY-Motiv mit Adapterproteinen, wie Fe65, interagieren, wodurch ihre Stabilität erhöht und eine Translokation in den Zellkern ermöglicht wird (KIMBERLY et al., 2001). Im Nukleus assoziieren beide Komponenten mit der Histonacetyltransferase Tip60, was in der Bildung des AFT-Komplexes resultiert (CAO, SUDHOF, 2001; VON ROTZ et al., 2004). Es wurde postuliert, dass hauptsächlich der amyloidogene Prozessierungsweg für die Kernlokalisierung der AICD verantwortlich ist (GOODGER et al., 2009).

Im physiologischen Zustand finden beide Arten der APP-Prozessierung statt. Und auch der Fakt, dass beide Mechanismen evolutionär hoch konserviert sind, lässt vermuten, dass beiden Prozessierungsformen eine wichtige Rolle zukommt. Im Gehirn von Alzheimerpatienten ist die Ausgeglichenheit im Verhältnis der beiden APP-Prozessierungswege beeinträchtigt.

Das physiologische Gleichgewicht ist hin zur amyloidogenen Prozessierung verschoben, was die Generierung von A β -Peptiden bedingt, welche in ihrer oligomerisierten Form neurotoxisch sind. Diese A β -Oligomere bedingen unter anderem synaptische Beeinträchtigungen sowie Neurodegeneration und stellen ein histopathologisches Charakteristikum der Alzheimererkrankung dar (LAMBERT et al., 1998; UMEDA et al., 2011). Nach der anfänglichen Entdeckung und Sequenzierung von A β -Peptiden wurde im Rahmen der „Amyloid-Kaskaden-Hypothese“ vermutet, dass amyloide Fibrillen und Plaques die Auslöser der Alzheimererkrankung seien. Zwischenzeitlich wurde diese Hypothese dahingehend verändert, dass kleine, lösliche Aggregate, die A β -Oligomere, die Progression der Alzheimer-Krankheit initiieren. Zudem wurden die neurotoxischen Eigenschaften auf spezielle Varianten, wie A β _{X-42}, zurückgeführt. Heutzutage wird die „Amyloid-Kaskaden-Hypothese“ der familiären Form der Alzheimererkrankung zugrunde gelegt, während immer deutlicher wird, dass es sich bei der sporadischen Krankheitsform, um eine multifaktorielle Erkrankung handelt, die durch eine Vielzahl genetischer Faktoren aber auch durch Umwelteinflüsse beeinflusst wird (DE STROOPER, 2010).

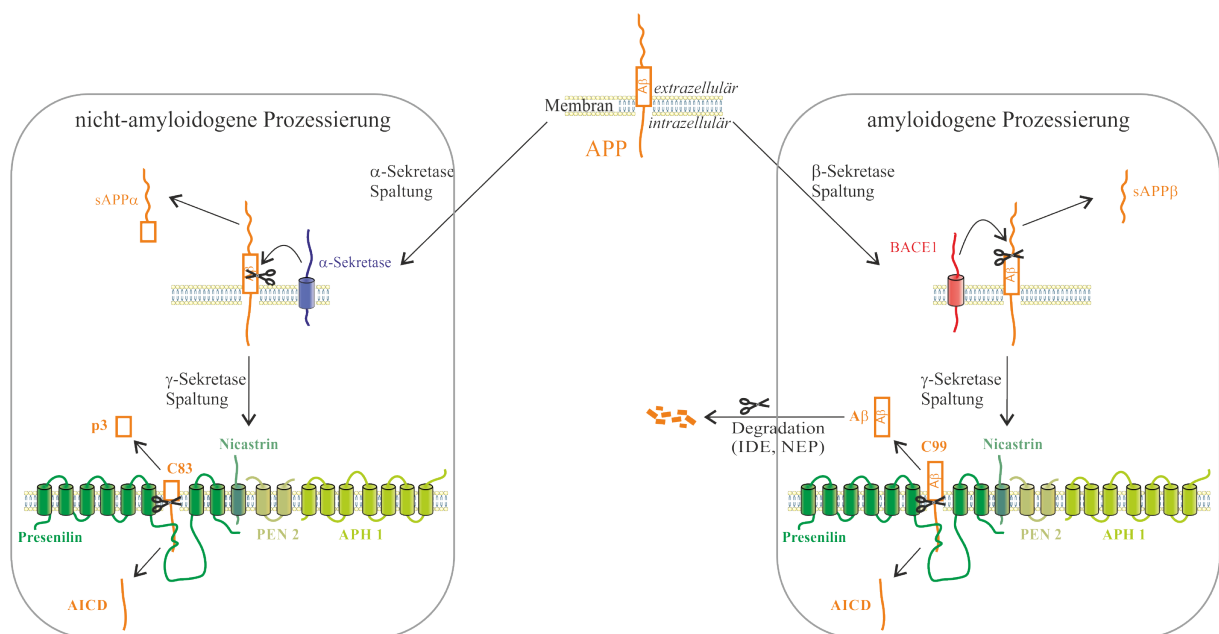


Abbildung 3: APP-Prozessierung. Das Typ 1-Transmembranprotein APP (engl. *amyloid precursor protein*) kann auf zwei unterschiedliche Arten sequenziellprozessiert werden. Bei der nicht-amyloidogenen Prozessierung (linke Abbildungshälfte) spaltet die α -Sekretase APP innerhalb der A β Sequenz, wodurch das lösliche APP α -Fragment (engl. *soluble APP α* , sAPP α) sezerniert und das membranständige Fragment C83 generiert wird. Die folgende γ -Sekretase Spaltung resultiert in der extrazellulären Freisetzung des Peptids p3 und der intrazellulären Freisetzung der AICD (engl. *APP intracellular domain*). Dem gegenüber steht der amyloidogene Prozessierungsweg von APP (rechte Abbildungshälfte), bei welchem die β -Sekretase initial spaltet und das lösliche APP β -Fragment (engl. *soluble APP β* , sAPP β) sezerniert und das membranständige Fragment C99, welches die A β -Sequenz enthält, generiert wird. Auch hier erfolgt der zweite Schritt durch die γ -Sekretase und es resultiert die Bildung der AICD und des A β -Peptides, welches extrazellulär freigesetzt wird. Unter physiologischen Bedingungen steht der Bildung von A β -Peptiden deren Degradation, welche hauptsächlich enzymatisch durch das Insulin-degradierende Enzym (IDE) oder Nephilysin (NEP) erfolgt, in einem ausgewogenen Verhältnis gegenüber. Unter pathologischen Bedingungen können die A β -Generierung erhöht und die Degradation vermindert sein, was dazu führt, dass die überschüssigen A β -Peptide neurotoxische Oligomere ausbilden und es zur Bildung der Alzheimer-typischen A β -Plaques im Gehirn kommt. Teile der Abbildung wurden unter Verwendung von Bildern von *Servier Medical Art* gezeichnet. *Servier Medical Art* von *Servier* ist unter einer *Creative Commons Attribution 3.0 Unported License* (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>) lizenziert. Abbildung verändert nach (GRIMM et al., 2013b).

Unter physiologischen Bedingungen wird die Bildung von A β durch einige Prozesse, die unter anderem die proteolytische Degradation, die zellvermittelte Beseitigung sowie den aktiven Transport aus dem Gehirn umfassen, ausgeglichen. Lösliche, extrazelluläre A β -Peptide können beispielsweise durch den Efflux ins Blut über die Blut-Hirn-Schranke beseitigt werden (TARASOFF-CONWAY et al., 2015). Die proteolytische Degradation von A β -Peptiden, welche kontinuierlich durch spezialisierte Enzyme, wie beispielsweise die beiden hauptsächlich für die extra- und intrazelluläre A β -Degradation verantwortlichen Enzyme Neprilysin (NEP) und das Insulin-degradierende Enzym (IDE), katalysiert wird, stellen einen wichtigen Faktor für die zerebralen A β -Spiegel dar (NALIVAEVA, TURNER, 2019; SAIDO, LEISSRING, 2012). Bereits kleine Abweichungen in dem Verhältnis zwischen A β -Produktion und Degradation können zu einer A β -Akkumulierung führen (BATEMAN et al., 2006). Die Zink-Metalloendopeptidase IDE mit einer Spleißform-abhängigen Größe von 110 kDa ist im Gegensatz zu Neprilysin, welches eine breite Substratspezifität hat, spezifisch für β -Strukturen-ausbildende Substrate und daher im Hinblick auf die Alzheimerpathologie von entscheidender Bedeutung (KUROCHKIN et al., 2018; SOUSA et al., 2021). Weitere Substrate von IDE sind unter anderem die kurzen Polypeptide Insulin, Glukagon oder Amylin, was die wichtige Rolle dieser Endopeptidase im Kohlenhydratmetabolismus verdeutlicht (TUNDO et al., 2017). IDE ist vorrangig im Zytosol, aber auch in anderen subzellulären Kompartimenten, wie Endosomen, Peroxisomen und Mitochondrien, der Plasmamembran oder im konditionierten Medium neuronaler Zellen vorhanden, und gilt als hauptsächliche Peptidase für die Degradation zytoplasmatischen, monomeren A β , während die Oligomerisierung den A β -Abbau durch IDE reduziert (CHESNEAU et al., 2000; QIU et al., 1998; QIU et al., 1997; STARGARDT et al., 2013). Neben A β wurde auch die AICD sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als Substrat von IDE beschrieben (FARRIS et al., 2003). In Tierstudien wurde die wichtige Rolle von IDE in der A β -Degradation dadurch verdeutlicht, dass in IDE-defizienten Mäusen eine erhöhte Akkumulation von A β -Peptiden begleitet von Hyperinsulinämie und Glukoseintoleranz beobachtet wurde, während die Plaquebildung im Gehirn von Mäusen mit überexprimiertem IDE reduziert war (FARRIS et al., 2003; LEISSRING et al., 2003; MILLER et al., 2003). Auch in Alzheimerpatienten wurde ein Zusammenhang zwischen IDE und der Alzheimerpathologie detektiert. Bezüglich der hippocampalen IDE-Proteinspiegel wurde eine um circa 50 % reduzierte Expression in Abhängigkeit des APOE-Status berichtet, welche von ebenfalls verringerten Mengen an IDE-mRNS- (*messenger ribonucleic acid*) in Hippocampusproben von APOE4-Trägern im Vergleich zu Nichtträgern und gesunden Individuen begleitet wurden (COOK et al., 2003). Einhergehend damit wurde auch eine signifikant reduzierte IDE-Enzymaktivität im Hippocampus von MCI-Patienten beschrieben, welche beim Übergang von MCI zu einer leichten bis mittelschweren Alzheimererkrankung weiter abnahm und negativ mit dem A β -Gehalt im Gehirn korrelierte (ZHAO et al., 2007). Gestärkt wird dieser Zusammenhang auf genetischer Ebene, da verschiedene IDE-Genvarianten und Polymorphismen mit A β -Konzentrationen und dem Alzheimerisiko assoziiert wurden (REITZ et al., 2012; WANG et al., 2015).

2.1.3 Lipide in der Alzheimererkrankung

Die Lipid-Dyshomöostase ist eine Thematik, die derzeit immer mehr in den Fokus der Alzheimerforschung rückt, da Veränderungen verschiedenster Lipidklassen während früher Stadien der neurodegenerativen Erkrankung auftreten. Dabei gehören lipidbedingte Veränderungen zu den ersten neuropathologischen Befunden, die Alois Alzheimer 1907 identifizierte: „[...] daneben zeigen viele Gliazellen große Fettsäcke.“ (ALZHEIMER et al., 1995). Das Gehirn, welches neben dem Fettgewebe das zweitfettreichste Organ darstellt, besteht zu mehr als 50 % seines Trockengewichts aus Lipiden. Hauptlipidspezies im Gehirn sind Phospholipide, weiter sind unter anderem Sphingolipide, Glykolipide und Sterole vertreten (SASTRY, 1985). Lipide stellen einerseits essenzielle Komponenten zellulärer Membranen, wie beispielsweise Synapsen und Myelinscheiden, dar und können bei der Signalübertragung für eine Vielzahl biologischer Prozesse eine Rolle spielen, andererseits sind sie als bioenergetische Kraftstoffe in den Energiemetabolismus involviert.

Bezüglich Fettsäuren, welche Bausteine für fast alle Lipidklassen sind und hinsichtlich ihres Sättigungsgrades in gesättigte (doppelbindungsfrei; engl. *saturated fatty acids*, SFA), einfach- (eine Doppelbindung; engl. *monounsaturated fatty acids*, MUFA) oder mehrfach- (mehr als eine Doppelbindung; engl. *polyunsaturated fatty acids*, PUFA) ungesättigte Fettsäuren klassifiziert werden können, wurden veränderte Spiegel im Gehirn und Plasma von Alzheimerpatienten detektiert. Allgemein war der Gehalt an ungesättigten Fettsäuren in Personen mit Alzheimerdiagnose verglichen zu gesunden Personen niedriger, was sich vor allem in reduzierten ω -3 PUFA- (z.B. Docosahexaensäure, DHA) und MUFA- (z.B. Ölsäure) Spiegeln äußerte (FONTEH et al., 2020; SNOWDEN et al., 2017). Einhergehend damit wurden grad- und langkettige, gesättigte Fettsäuren als erhöht in der Cerebrospinalflüssigkeit von Alzheimerpatienten berichtet (FONTEH et al., 2014).

Unter Glycerophospholipiden und Sphingolipiden werden Lipidmoleküle mit amphiphilem Charakter verstanden. Dieser resultiert aus ihrer Struktur, da sich Vertreter dieser Lipidklassen aus zwei hydrophoben Fettacylketten und einer hydrophilen „Kopfgruppe“, die an ein alkoholbasiertes Grundgerüst gebunden sind, zusammensetzen. Im Fall der Glycerophospholipide, bei welchen zwei Fettsäureketten und eine polare Phosphatgruppe an ein Glycerol-Rückgrat konjugiert sind, berichteten Studien an postmortalen Hirnproben von Alzheimerpatienten reduzierte Spiegel an Vertretern dieser Lipidklasse, zu denen Phosphatidylcholine (PC), Phosphatidylethanolamine (PE) oder Phosphatidylinositole (PI) zählen (GUAN et al., 1999; NITSCH et al., 1992; PETTEGREW et al., 2001; STOKES, HAWTHORNE, 1987). Ein Vertreter der Sphingolipide, der gleichzeitig als Phospholipid klassifiziert werden kann, ist das Sphingomyelin, welches aus einer Phosphatidylcholin-Gruppe, die an ein Ceramid gebunden ist, besteht. Im Gehirn von Alzheimerpatienten sind die Sphingomyelinspiegel vermindert (HE et al., 2010), wobei diese Veränderungen abhängig vom Krankheitsstadium sowie der analysierten Hirnregion sind (GONZALEZ-DOMINGUEZ et al., 2014; KOSICEK et al., 2012).

Glycerolipide ähneln in ihrer Struktur auf Grund des Glycerol-Rückgrates den Glycerophospholipiden, allerdings sind daran lediglich eine variable Anzahl an Acylgruppen und keine Phosphatgruppe gebunden. Beeinträchtigungen im Glycerolipidmetabolismus, die sich beispielsweise durch akkumulierte Lipidtropfen, den Organellen, die der Speicherung von Neutrallipiden dienen (NGUYEN et al., 2017), äußern (GOMEZ-RAMOS, ASUNCION MORAN, 2007), wurden als frühes pathologisches Merkmal der Alzheimererkrankung beschrieben (WOOD et al., 2015).

Einhergehend mit den Beobachtungen von Alois Alzheimer, unterstreichen neuere wissenschaftliche Erkenntnisse einen beeinträchtigten Metabolismus von Neutrallipiden im Rahmen des Morbus Alzheimer (FARMER et al., 2020).

Basierend darauf, dass es einen Zusammenhang zwischen bestimmten Risikofaktoren für die Alzheimererkrankung und dem Lipidmetabolismus gibt, wird angenommen, dass der Lipidhomöostase eine frühe und potenziell initiierende Rolle bei der Entstehung dieser Demenzform zukommt (ATRI, 2019; CHEW et al., 2020). Genetische Risikofaktoren für die sporadische Alzheimerform inkludieren beispielsweise die Gene *APOE*, *TREM2* (engl. *triggering receptor expressed on myeloid cells 2*) oder *ABCA1* (engl. *ATP binding cassette subfamily A member 1*), die direkt in den Transport oder den Metabolismus von Lipiden involviert sind (HOULDEN et al., 1998; JONSSON et al., 2013; NORDESTGAARD et al., 2015). Darüber hinaus wurden überschneidende Risiken basierend auf Umwelt- / Lebensstil-Einflüssen ausgemacht. Hier können unter anderem metabolische Erkrankungen wie Adipositas sowie Typ-2-Diabetes oder eine Ernährung, die viele langkettige gesättigte Fettsäuren enthält, als periphere Lipidmodifikatoren genannt werden, die mit einem erhöhten Risiko für die Alzheimererkrankung oder kognitiven Beeinträchtigungen assoziiert sind (BIESSELS et al., 2014; KNIGHT et al., 2014; MA et al., 2020). Diese Beispiele veranschaulichen, dass sowohl zentrale-, als auch periphere Fehlregulierungen der Lipidhomöostase eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und in frühen Stadien der Alzheimer-Krankheit spielen.

Auf mechanistischer Ebene wurden vielfältige Interaktionen zwischen dem Lipidmetabolismus und Prozessen der Alzheimerpathologie beschrieben. Hinsichtlich der APP-Prozessierung spielt die Lipidkomposition biologischer Membranen eine essenzielle Rolle, da zum einen APP selbst ein Transmembranprotein ist (DYRKS et al., 1988) und zudem die Proteasen, die an der proteolytischen Prozessierung beteiligt sind, membrangebundene Proteine sind (GRIMM et al., 2017a). Eine besondere Rolle kommt in diesem Kontext der γ -Sekretase zu, die APP innerhalb der hydrophoben Membrenumgebung spaltet (HAASS, 2004; HAASS et al., 2012). Für die amyloidogene Prozessierung spielen Mikrodomänen in der Membran, die als *Lipid Rafts* bezeichnet werden, eine entscheidende Rolle (SCHENGRUND, 2010). *Lipid Rafts* sind mit Cholesterin, Sphingolipiden, Gangliosiden und gesättigten Phospholipiden angereichert und für zelluläre Prozesse, wie beispielsweise die Sortierung von Lipiden und Proteinen, die Signaltransduktion oder die Zelladhäsion, wichtig (KAO et al., 2020). Die Lipidkomposition in diesen Mikrodomänen hängt mit der Entstehung von A β zusammen, da beispielsweise die Aktivität der γ -Sekretase, welche in *Lipid Rafts* lokalisiert ist, durch reduzierte Cholesterinkonzentrationen inhibiert werden kann (GRIMM et al., 2008). Neben dem A β -Metabolismus werden auch weitere Prozesse, die zur Entwicklung der sporadischen Alzheimer Form beitragen, von unterschiedlichen Lipiden vielfältig beeinflusst. Zu diesen können beispielsweise die Neuroinflammation, oxidativer Stress, Myelindegeneration oder die Integrität der Blut-Hirn-Schranke gezählt werden. Hinsichtlich Neuroinflammation stehen die immunmodulatorischen Eigenschaften von Fettsäuren im Fokus, so wirkt zum Beispiel die ω -6 Fettsäure Arachidonsäure, deren Gehalt im Gehirn von Alzheimerpatienten erhöht ist, überwiegend pro-inflammatorisch (SANCHEZ-MEJIA, MUCKE, 2010). Der Zusammenhang zwischen oxidativem Stress, der unter anderem durch die Akkumulierung von reaktiven Sauerstoffspezies hervorgerufen wird, und Lipiden wird beispielsweise anhand von PUFAs oder Plasmalogenen deutlich, die anfällig für Lipidperoxidation sind (SULTANA et al., 2013).

Begründet auf diesen Zusammenhängen zwischen Lipidmetabolismus und Alzheimerpathologie, deren molekulare Mechanismen immer detaillierter aufgeklärt werden, wurden multiple therapeutische Strategien für die Alzheimererkrankung, die auf die Lipidhomöostase abzielen, untersucht oder sind Gegenstand gegenwärtiger Forschung. Über die aktuellen, vielfältigen therapeutischen Ansätze zur Prävention und Behandlung des Morbus Alzheimer wird im nächsten Kapitel eine Übersicht gegeben.

2.1.4 Therapeutische Behandlungsansätze

Aktuell ist keine kausale/kurative Therapie zur Behandlung der Alzheimer-Krankheit verfügbar, was die Notwendigkeit einer effizienten Prävention und Heilung hervorhebt. Innovative Behandlungsmöglichkeiten sind von enormer Wichtigkeit und werden dringend im Rahmen einer Alzheimertherapie benötigt, da unterschiedliche klinische Studien bisher nicht erfolgreich waren (HUANG et al., 2020) und die Entwicklung psychiatrischer Medikamente nur langsam vorankommt (CACABELOS, 2018). Momentan werden Alzheimerpatienten lediglich symptomatisch mit entweder Acetylcholinesterase-Hemmern oder NMDA- (*N*-Methyl-*D*-Aspartat) Antagonisten (Memantinen) therapiert (HAUBER et al., 2000; LANCTOT et al., 2003; RIEPE et al., 2006; ROGERS, FRIEDHOFF, 1996). Der Einsatz von Acetylcholinesterase-Hemmern, wie beispielsweise Donepezil, Galantamin oder Rivastigmin, beruht darauf, dass im Gehirn von Alzheimerpatienten die cholinerge Innervation im *Nucleus basalis Meynert* vermindert ist, wodurch ein Mangel cholinergischer Transmitter vorliegt. Durch Blockade der Hydrolyse des wichtigen Neurotransmitters Acetylcholin wird dessen Konzentration erhöht, was zu einer verbesserten neuronalen Kommunikation führt und somit temporär die Demenzsymptome stabilisiert. Die NMDA-Rezeptorblockade dient der Senkung der glutamatergen Wirkung, die durch erhöhte Glutamat Spiegel bei Demenzpatienten bedingt wird (ATRI, 2019).

Neue therapeutische Ansätze für die Alzheimererkrankung, die sich noch in der präklinischen Phase befinden, zielen beispielsweise auf die Oligomerisierung von A β -Peptiden ab, wobei sich unter anderem kleine molekulare Inhibitoren, Immuntherapien, A β -degradierende Enzyme oder katalytische Antikörper zunutze gemacht werden (CHAKRABORTY, 2017; CHEN et al., 2017). Hinsichtlich der Antikörper-basierten Therapieansätze, welche auf eine passive Immunisierung abzielen, resultierten die ersten Versuche mit monoklonalen Antikörpern gegen die N-terminale Domäne von A β (A β ₁₋₁₅) in gegenteiligen Effekten, welche sich in zytotoxischen A β -Oligomeren äußerten (LIU et al., 2015). Basierend darauf wurde angenommen, dass diejenigen Immunogene, die zum Erreichen einer protektiven Immunität wichtig sind, die löslichen A β -Oligomere und nicht das monomere A β oder die A β -Plaques sind (SELKOE, HARDY, 2016; WISNIEWSKI, DRUMMOND, 2016). Allerdings resultierten klinische Studien mit Antikörpern, wie beispielsweise Aducanumab, der in den USA unter dem Namen *Aduhelm* zugelassen ist und lösliche zytotoxische A β -Protofibrillen und Oligomere erkennt (DHILLON, 2021), in bezüglich der Verbesserung kognitiver Fähigkeiten nicht zufriedenstellenden Ergebnissen (CATANIA et al., 2019). Ende des Jahres 2021 wurde der Antrag auf Zulassung von Aducanumab von der europäischen Arzneimittelbehörde EMA auf Grund der fehlenden Wirksamkeit und unerwünschten Nebenwirkungen abgelehnt (EMA/112932/2022 Rev. 1). Mögliche Gründe für die mangelnde Wirksamkeit der gegen A β gerichteten Antikörper könnten beispielsweise die gewählten Antigene, wie beispielsweise A β ₁₋₁₅, oder aber auch die Kombination mit pro-inflammatorischen Adjuvantien sein, die unerwünschte pro-inflammatorische Immunantworten bedingen (MARCIANI, 2015).

Basierend darauf steht derzeit der kombinierte Einsatz konformationsspezifischer Antikörper mit Adjuvantien, die eine einzelne, spezifische anti-inflammatorische Immunantwort hervorrufen, im Vordergrund gegenwärtiger Forschung (MARCIANI, 2019). Ein Antikörper, der in einer 2021 veröffentlichten Phase-2-Studie in Patienten mit früher Alzheimersymptomatik positive Einflüsse hinsichtlich kognitiver und funktioneller Beeinträchtigungen sowie der Menge an Amyloid-Plaques aufwies, ist Donanemab. Dieser monoklonale Antikörper zielt auf den N-Terminus einer Pyroglutamat-Form von A β (A β ₃₋₄₂) ab, welche ausschließlich in Plaques lokalisiert ist (DEMATOS et al., 2012; LOWE et al., 2021). Nach 76 Wochen verbesserten sich die, anhand von Veränderungen in der iADRS-Skala (engl. *Integrated Alzheimer's Disease Rating Scale*, iADRS) beurteilten, kognitiven Fähigkeiten sowie die Ausübung von Aktivitäten des täglichen Lebens in den Donanemab-behandelten Patienten signifikant im Vergleich zu Placebo-behandelten Studienteilnehmern. Uneinheitliche Ergebnisse hinsichtlich der sekundären Endpunkte, wie beispielsweise der kognitiven 13-Punkte-Alzheimer-Subskala ADAS-cpg13 (engl. *Alzheimer's Disease Assessment Scale*, ADAS) machen größer angelegte und längere klinische Phase-3-Studien notwendig, um die Wirksamkeit und Sicherheit von Donanemab beurteilen zu können (MINTUN et al., 2021).

Neben der Verhinderung der Oligomerisierung steht auch die Beeinflussung der A β -Generierung im Fokus aktueller Forschung. In diesem Kontext wurde aktuell ein innovativer Ansatz zur Therapie früher Stadien der Alzheimererkrankung von Musardo *et al.* veröffentlicht, welche auf die Inhibierung der ADAM10-Endozytose abzielt, die im Hippocampus von Alzheimerpatienten erhöht ist. Die Autoren entwickelten ein zellpermeables Peptid, welches in der Lage ist, mit der ADAM10-Endozytose zu interferieren und so deren postsynaptische Lokalisierung und Enzymaktivität zu erhöhen. Im Alzheimer-Mausmodell resultierte die Verabreichung dieses Peptides in frühen Erkrankungsstadien zu einer Behebung der kognitiven Defizite durch eine Förderung der synaptischen Plastizität. Diese präklinischen Erkenntnisse sollten Ausgangspunkt für weitere Studien zur Beurteilung der Effizienz und Sicherheit einer langzeitigen Gabe dieses Peptids sein, um dessen therapeutisches Potenzial hinsichtlich der Alzheimer-Krankheit bewerten zu können (MUSARDO et al., 2022). Neben ADAM10 stellt auch BACE ein potenzielles Ziel für therapeutische Ansätze dar, jedoch wurden bisher alle randomisierten kontrollierten Studien (engl. *randomized controlled trials*, RCT) mit BACE-Inhibitoren auf Grund einer fehlenden Wirksamkeit oder Sicherheitsbedenken eingestellt (HAMPEL et al., 2021b).

Zusammenfassend wird deutlich, dass in den zurückliegenden Jahrzehnten diejenigen Therapien, die sich ausschließlich gegen die A β -Kaskade richteten, in verschiedenen Stadien klinischer Studien keine ausreichenden Wirkungen erzielten (KNOPMAN, 2019; LIU et al., 2019b; LONG, HOLTZMAN, 2019). Dies hebt die Notwendigkeit gezielterer und personalisierter Interventionen sowie weiterer therapeutischer Angriffspunkte hervor. Ein innovativer Ansatz für die Behandlung der Alzheimererkrankung wird durch das therapeutische Potenzial von Lipiden oder fettlöslichen Vitaminen (Vitamine E, D oder A) sowie deren Analoga demonstriert (GRIMM et al., 2014; GRIMM et al., 2016b; GRIMM et al., 2015b; GRIMM et al., 2013c; GRIMM et al., 2017b).

Wie im vorausgegangenen Kapitel bereits kurz erwähnt, steht auch der Lipidmetabolismus im Fokus einiger therapeutischer Ansätze, welche hauptsächlich der Alzheimerprävention dienen sollen. Eine Strategie zielt beispielsweise auf die Aktivierung lipid-sensitiver nukleärer Rezeptoren, unter anderem Retinoid-X-Rezeptoren (RXR), Leber-X-Rezeptoren (LXR), oder Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPAR), ab, bei welchen es sich um Masterregulatoren der sowohl peripheren als auch zentralen Lipidhomöostase handelt (MA, NELSON, 2019). Aus der Familie der PPARs steht der PPAR γ , welcher die Lipogenese und Insulinsensibilisierung reguliert (DESVERGNE, WAHLI, 1999), im Fokus der Alzheimerforschung. Obwohl Tierstudien positive Auswirkungen von PPAR γ -Agonisten hinsichtlich der A β -Pathologie und der kognitiven Funktion detektierten, scheiterten klinische Studien an Alzheimerpatienten bisher am Nachweis der Wirksamkeit, was unter anderem durch die nur geringe Gängigkeit über die Blut-Hirn-Schranke zu erklären sein könnte (BURNS et al., 2021; O'REILLY, LYNCH, 2012; YU et al., 2015).

2.2 Vitamin D

2.2.1 Der Metabolismus sowie die physiologischen Funktionen von Vitamin D

Vitamin D, auch als Calciferol benannt, ist ein Secosteroid, welches körpereigen synthetisiert oder nahrungsvermittelt aufgenommen werden kann. Vitamin D₂, dessen Vorstufe Ergosterol darstellt und von Pflanzen und Pilzen produziert wird, kann in Form von Ergocalciferol über den Dünndarm nach dem Verzehr von beispielsweise Champignons resorbiert werden. Vitamin D₃ wird im Dünndarm durchschnittlich zu 80 % resorbiert (THOMPSON et al., 1966), jedoch ist die über die Nahrung aufgenommene Menge nur gering, da nur wenige natürlich vorkommende Lebensmittel, wie fetter Fisch oder Fischleberöl, Vitamin D₃ enthalten und einige Faktoren die intestinale Absorbierung beeinflussen (SILVA, FURLANETTO, 2018). Der überwiegende Anteil an Vitamin D wird körpereigen in der Haut unter Ultraviolett-B (UV-B) Strahlung in einem Wellenlängenbereich von 290-315 nm ausgehend von 7-Dehydrocholesterin gebildet (Cholecalciferol) (WEBB et al., 1989). Diese inaktive Vorstufe wird mit Hilfe des Vitamin D-bindenden Proteins (DBP) über die Blutzirkulation in die Leber transportiert, wo das Cytochrom P450 2R1 (CYP2R1; 25-Hydroxylase) die Hydroxylierung von Cholecalciferol zu Calcidiol (25-Hydroxycholecalciferol) katalysiert. In den Nieren findet der letzte Schritt der Aktivierung von Vitamin D statt, indem das Cytochrom P450 27B1 (CYP27B1; 1 α -Hydroxylase) die Hydroxylierung an Position 1 katalysiert und es zur Entstehung von Calcitriol (1,25-Dihydroxycholecalciferol) kommt (siehe Abbildung 4). Während das Parathormon einen aktivierenden Einfluss auf die 1 α -Hydroxylase hat, wirken der Fibroblasten-Wachstumsfaktor FGF-23 sowie Kalzium und Phosphat hemmend auf ihre Enzymaktivität (BIKLE, 2000). Vitamin D wird in seiner Speicherform, dem Calcidiol, überwiegend im Fettgewebe gespeichert (DIDRIKSEN et al., 2015).

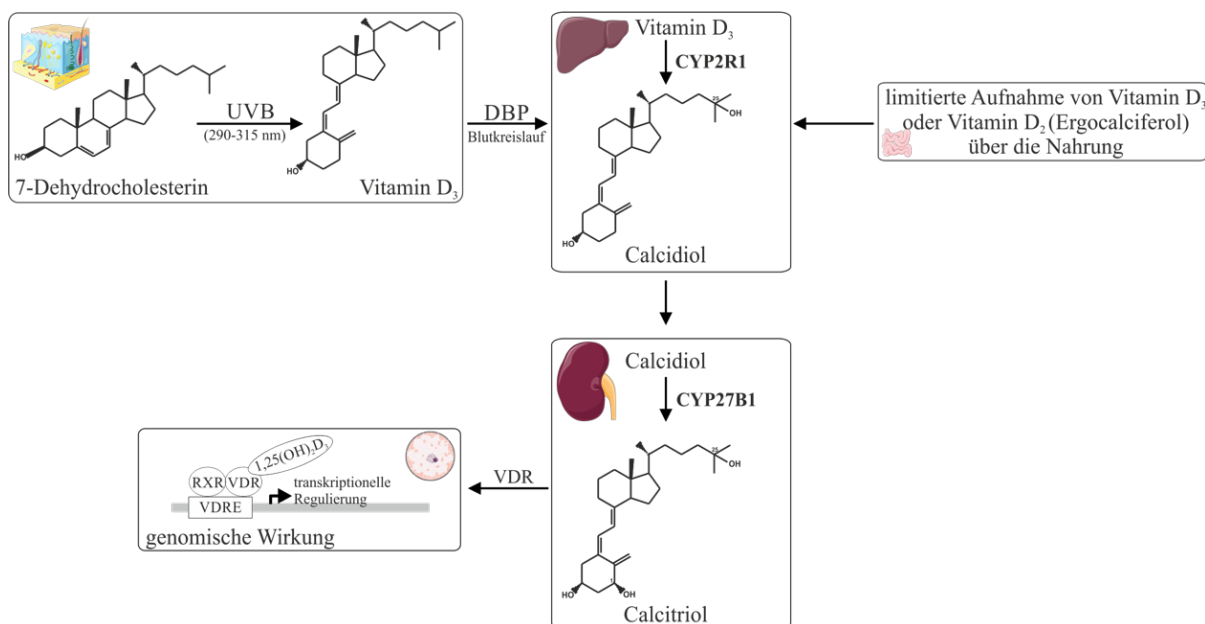


Abbildung 4: Der Metabolismus von Vitamin D. Das Secosteroid Vitamin D₃ kann entweder körpereigen in der Haut unter Anwesenheit von UV-B Strahlung in einem Wellenlängenbereich von 290-315 nm ausgehend von 7-Dehydrocholesterin synthetisiert oder in limitierten Maßen durch die Nahrung über den Dünndarm, ebenso wie Vitamin D₂ (Ergocalciferol), aufgenommen werden. In beiden Fällen erfolgt mit Hilfe des Vitamin D-bindenden Proteins (DBP) der Transport über die Blutbahn zur Leber, in welcher die 25-Hydroxylierung zu Calcidiol (25-Hydroxyvitamin D₃) durch das Cytochrom P450 2R1 (CYP2R1) stattfindet. In den Nieren kommt es durch die Aktivität des Cytochroms P450 27B1 (CYP27B1) zur 1-Hydroxylierung und somit zur Aktivierung durch Bildung von Calcitriol (1,25-Dihydroxyvitamin D₃). Calcitriol ist dann unter anderem in der Lage, mit dem Vitamin D-Rezeptor (VDR) zu interagieren, was in einer Konformationsänderung resultiert, die die Komplexbildung mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) ermöglicht. Das VDR/RXR-Heterodimer bindet spezifische Desoxyribonukleinsäure (DNS)-Sequenzen (engl. *vitamin D response elements*, VDRE) und reguliert so die Transkription einer Vielzahl an Zielgenen, was der Expressionswirkung von Vitamin D entspricht. Teile der Abbildung wurden unter Verwendung von Bildern von *Servier Medical Art* gezeichnet. *Servier Medical Art* von *Servier* ist unter einer *Creative Commons Attribution 3.0 Unported License* (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>) lizenziert. Abbildung verändert nach (GRIMM et al., 2017b).

Vitamin D kommen wichtige Funktionen in der Kalzium- und Phosphathomöostase zu, wodurch dieses Secosteroid indirekt an der Mineralisierung sowie dem Auf- und Umbau von Knochen beteiligt ist. Da Vitamin D die Resorption von Kalzium und Phosphat im Darm und in der Niere fördert, sollten Personen mit Nierenerkrankungen oder kalziumhaltigen Nierensteinen, Personen mit entzündlichen Bindegewebserkrankungen, wie beispielsweise Sarkoidose, die häufig von erhöhten Kalziumspiegeln begleitet werden, oder auch Personen, die Diuretika nehmen, die die Kalziumausscheidung über die Niere senken, darauf achten nicht zu viel Vitamin D additiv zu supplementieren. Im Darm steigert Vitamin D die Synthese von Calbindin, einem Kalziumtransportprotein, und erhöht so die Kalziumaufnahme. In dieser Wirkung von Vitamin D liegt begründet, dass ein Mangel dieses Vitamins bei Kindern zum Auftreten einer Rachitis und bei Erwachsenen einer Osteomalazie führen kann (HOLICK, 1996). Liegen im Blut hypokalzämische Bedingungen vor, so werden Knochen demineralisiert, indem Osteoklasten aktiviert und so Kalzium und Phosphat aus den Knochen mobilisiert werden. Die unzureichende Knochenmineralisierung bedingt im Kindesalter Wachstumsstörungen und Skelettdeformierungen und bei Erwachsenen geht dieses Krankheitsbild mit schmerzhaften Knochenerweichungen bis hin zu Deformationen und pathologischen Frakturen einher.

Im Unterschied zur Osteoporose, bei der die Knochen porös und brüchig sind, kann die Osteomalazie durch die Supplementierung von Vitamin D rückgängig gemacht werden.

Neben diesen Einflüssen auf den Kalzium- und Phosphatmetabolismus ist Vitamin D in der Lage die Transkription zahlreicher Gene zu beeinflussen. Dies wird über die Bindung an den Vitamin D-Rezeptor (VDR) vermittelt und betrifft eine Vielzahl zellulärer Prozesse, wie beispielsweise Inflammation, oxidativen Stress, Mitochondrienfunktion oder epigenetische Veränderungen (BERRIDGE, 2016; CONSIGLIO et al., 2015; LEFEBVRE D'HELLEN COURT et al., 2003; PEREIRA et al., 2012). Nach Bindung von Calcitriol an den VDR wird dessen Konformation verändert und es kommt zur Ausbildung eines Komplexes mit dem Retinoid X-Rezeptor (RXR), welcher mit speziellen Regionen (*vitamin D response element*, VDRE) definierter Gene interagieren und so deren Expression regulieren kann (PIKE, MEYER, 2010) (Abbildung 4).

2.2.2 Der Versorgungszustand mit Vitamin D in der Bevölkerung

Zur Bestimmung der individuellen Vitamin D-Versorgung wird die Serumkonzentration von Calcifediol, welche um mehr als den Faktor 1000 höher ist als die des aktiven Metaboliten Calcitriol (50-250 nM Calcidiol gegenüber 48-156 pM Calcitriol) (HOLICK, 2007; LOU et al., 2010) und eine Halbwertszeit von circa 15 Tagen, im Vergleich zu wenigen Stunden bei der aktiven Form von Vitamin D, hat (JONES, 2008), herangezogen. Dabei sollte beachtet werden, dass diese in Abhängigkeit von beispielsweise der Sonnenlichtexposition, der Ernährung oder der Supplementierung variiert.

In den Industrienationen sind circa 85 % der älteren Bevölkerung im Alter von 60-86 Jahren von einer Vitamin D-Insuffizienz, welche durch Serumspiegel < 30 ng/ml definiert ist, betroffen (ANNWEILER et al., 2011; KWEDER, EIDI, 2018). Entsprechend den Leitlinien der Endokrinerologischen Gesellschaft werden in den meisten klinischen Studien Vitamin D-Konzentrationen unter 10 ng/ml (25 nmol/l) als schwerer Mangel, Konzentrationen unter 20 ng/ml (50 nmol/l) als Mangel, Konzentrationen zwischen 21-29 ng/ml (52,5-72,5 nmol/l) als Insuffizienz und Konzentrationen zwischen 30-100 ng/ml (75-250 nmol/l) als Suffizienz definiert (HOLICK et al., 2011). Mögliche Gründe für diese Mangelversorgung können neben einem Lebensstil, welcher überwiegend im Haus stattfindet und nur wenig Zeit im Freien und somit geringe UV-Strahlung beinhaltet, auch eine verringerte Kapazität der Haut, Vitamin D zu synthetisieren oder altersbedingte, reduzierte Konzentrationen an 7-Dehydrocholesterin in der Epidermis sein (GLOTH et al., 1995; MACLAUGHLIN, HOLICK, 1985). Jedoch ist die Prävalenz einer Unterversorgung mit Vitamin D nicht nur in älteren Bevölkerungsgruppen, sondern alle Altersklassen betreffend, hoch. So berichtete eine aktuelle Studie an australischen Jugendlichen (12-17 Jahre) und jungen Erwachsenen (18-24 Jahre), dass 17 % beziehungsweise 32 % der insgesamt 1092 Studienteilnehmer einen Vitamin D-Mangel hatten, welcher in diesem Fall 25(OH)-Vitamin D-Serumkonzentrationen von unter 20 ng/ml entsprach. Zudem wurden Übergewicht und geringe körperliche Aktivität als Prädiktoren für einen Vitamin D-Mangel detektiert (HORTON-FRENCH et al., 2021). Auch in der europäischen Bevölkerung wurden in 13 % der über 55.000 Studienteilnehmer Serum-Calcidiolkonzentrationen von unter 30 nmol/l gemittelt über das ganze Jahr detektiert, wobei diese Prävalenz in den Wintermonaten zwischen Oktober und März auf mehr als 17 % anstieg und in den Sommermonaten zwischen April und November auf circa 8 % absank (CASHMAN et al., 2016).

Mögliche Gründe hierfür können unter anderem eine Mangelernährung oder Störungen der Resorption, die häufig im Zusammenhang mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen auftreten, sowie Hydroxylierungsstörungen als Folge einer Leber- oder Niereninsuffizienz sein. Weiter zählt Adipositas, auf Grund der Akkumulierung von Vitamin D im Fettgewebe, oder auch operative Verfahren der bariatrischen Chirurgie zu möglichen Ursachen eines Vitamin D-Mangels (CHAKHTOURA et al., 2016; HOLICK, 2020). Neben diesen Gründen können auch Umweltfaktoren Ursachen für einen Vitamin D-Mangel darstellen. So kann eine unzureichende Vitamin D₃-Versorgung durch die Hautfarbe erklärt werden, da Studien in Individuen mit dunkler Haut im Vergleich zu Individuen mit heller Haut geringere Serum-Vitamin D-Spiegel detektierten (BUCELL et al., 2010). Eine mögliche Begründung könnte die Pigmentierung der Haut sein, da höhere Konzentrationen an Melanin die Vitamin D-Synthese verlangsamen, was darauf zurückzuführen ist, dass Melanin die UV-Strahlung absorbiert (BONILLA et al., 2014; HOLICK, 2007). Auch die saisonbedingte geringere UV-Strahlung im Winter sowie Lebensräume in nördlicheren Breitengraden oder die Verwendung von Sonnencreme sind Umweltfaktoren, welche die körpereigene Vitamin D-Synthese beeinträchtigen (HOLICK, 2004).

Der zuvor beschriebene mangelnde Vitamin D-Versorgungszustand in einem Großteil der Bevölkerung sowie die Vielfalt an zellulären Prozessen, die durch dieses Secosteroid beeinflusst werden können, verdeutlichen die Grundlage für den pharmakologischen Einsatz von Vitamin D bei einigen Erkrankungen wie beispielsweise hyperproliferierenden Hauterkrankungen (Psoriasis), Fehlfunktionen des Immunsystems, Knochenstoffwechselerkrankungen oder endokrinen Störungen. Darüber hinaus ist erwiesen, dass eine Supplementierung in den seltensten Fällen zu einer Vitamin D-Intoxikation führt, welche nur dann auftritt, wenn suprphysiologische Mengen (50.000 bis 100.000 IE/Tag) über Monate bis Jahre supplementiert werden (HOLICK, 2015b). In den klinischen Fachbereichen der Nephrologie, Endokrinologie oder Dermatologie wird häufig auf synthetische Vitamin D-Analoga zurückgegriffen, da eine Behandlung mit natürlichem aktiven Calcitriol unerwünschte Nebenwirkungen auf Grund seiner starken kalzämischen Aktivität hervorrufen kann. Fünf Analoga sind für die therapeutische Verabreichung genehmigt, zu welchen die Vitamin D₃-Analoga Maxacalcitol, Calcipotriol und Alfacalcidol sowie die Vitamin D₂-Analoga Paricalcitol und Doxercalciferol zählen. Auf diese Analoga sowie den in der vorliegenden Arbeit analysierten Einfluss auf die molekularen Mechanismen der Alzheimerpathologie wird in Kapitel 5.1.2 detaillierter eingegangen.

2.2.3 Vitamin D und Morbus Alzheimer

Erste frühe Hinweise auf eine potenzielle Funktion von Vitamin D im Gehirn liegen darin begründet, dass sowohl der VDR als auch die in den Vitamin D-Metabolismus involvierten Enzyme im Gehirn exprimiert werden (CUI et al., 2013; EYLES et al., 2005; SUTHERLAND et al., 1992). Hinzu kommt, dass sowohl Vitamin D als auch seine Metabolite die Blut-Hirn-Schranke passieren können, was einen Einfluss auf die Gehirnfunktion vermuten lässt (LANG et al., 2019; PARDRIDGE et al., 1985).

Einen möglichen Ansatzpunkt für einen potenziellen Zusammenhang mit der Alzheimererkrankung liefert die Tatsache, dass eine insuffiziente Vitamin D-Versorgung mit dem Alterungsprozess assoziiert ist. Von insuffizienten Konzentrationen an Serum-Vitamin D sind circa 85 % der älteren Bevölkerung (60-86 Jahre) betroffen (ANNWEILER et al., 2011).

Auf Grund dieses gemeinsamen Risikofaktors ist die Analyse einer potenziellen Verbindung zwischen einer Vitamin D-Hypovitaminose und der Alzheimererkrankung Gegenstand aktueller Forschung. Es wurden bereits einige negative Effekte eines Vitamin D-Mangels hinsichtlich neurodegenerativer Erkrankungen aber auch unterschiedliche neuroprotektive Eigenschaften eines ausreichenden Vitamin D-Status auf pathophysiologische Prozesse der Alzheimer-Krankheit beschrieben (GRIMM et al., 2014; HOLICK, 2015a; LAUER et al., 2019).

Eine Vitamin D-Hypovitaminose wurde durch eine Vielzahl epidemiologischer Studien mit einem erhöhten Risiko für neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Alzheimer korreliert (LAUER et al., 2019). Folgend wird kurz eine Auswahl von Studien der vergangenen zehn Jahre in diesem wissenschaftlichen Kontext vorgestellt. Eine systematische Literaturzusammenfassung und Metaanalyse, welche im Jahr 2012 veröffentlicht wurde, inkludierte 37 Studien und assoziierte geringe Vitamin D-Konzentrationen mit schlechteren kognitiven Funktionen sowie einem erhöhten Alzheimerisiko (BALION et al., 2012). Eine klinische Studie an über 1600 gesunden älteren Teilnehmern bestimmte die Serum-25(OH)-Vitamin D-Spiegel zu Beginn der Studie und überprüfte in einer Anschlussstudie nach 5,6 Jahren das Auftreten der Alzheimererkrankung. Die resultierte, multivariaten-bereinigte „Hazard-Rate“ der Alzheimer-Krankheit betrug 2,22 (95 %-Konfidenzintervall: 1,02-4,83) für Teilnehmer mit schwerem Vitamin D-Mangel (< 25 nmol/l) und 1,69 (95 %-Konfidenzintervall: 1,06-2,69) für Teilnehmer mit moderatem Mangel (≥ 25 -50 nmol/l), was darauf hinwies, dass ein Vitamin D-Mangel mit einem deutlich erhöhten Risiko für die Alzheimererkrankung assoziiert ist (LITTLEJOHNS et al., 2014). Unter „Hazard“ wird dabei die Wahrscheinlichkeit verstanden, mit der ein bestimmtes Ereignis in einem definierten Zeitraum eintritt und die Hazardrate bezeichnet das Verhältnis der Hazards zweier Gruppen, die im Rahmen klinischer Studien miteinander verglichen werden, wobei eine Rate von eins verdeutlicht, dass es keinen Unterschied zwischen den Gruppen gibt, und eine Rate größer eins, dass ein erhöhtes Risiko für die beobachtete Gruppe besteht (CASE et al., 2002; SPRUANCE et al., 2004). Eine im selben Jahr veröffentlichte prospektive Kohortenstudie an über 10.000 Personen der dänischen Allgemeinbevölkerung mit einer Folgeanalyse nach 30 Jahren beschrieb eine Hazardrate der Alzheimer-Krankheit von 1,25 (95 %-Konfidenzintervall: 0,95-1,64) für 25(OH)-Vitamin D-Spiegel unter 25 nmol/l im Vergleich zu Konzentrationen ≥ 50 nmol/l und somit eine Assoziation zwischen verringerten Plasmaspiegeln von Vitamin D und einem erhöhten Alzheimerisiko (AFZAL et al., 2014). Im Folgejahr wurde eine Metaanalyse veröffentlicht, welche berichtete, dass Individuen mit einem mangelnden Vitamin D-Spiegel (< 50 nmol/l) ein um 21 % erhöhtes Alzheimerisiko im Vergleich zu denjenigen mit Konzentrationen > 50 nmol/l aufweisen (SHEN, JI, 2015). Bei Metaanalysen handelt es sich um eine statistische Methode der quantitativen Kombinierung von Ergebnissen unterschiedlicher Studien, der eine systematische Literaturrecherche vorangeht (LEE, 2018). Eine aktuelle Metaanalyse, die zur umfassenden Beurteilung der Zusammenhänge zwischen einem Vitamin D-Mangel und der Alzheimererkrankung verschiedene Datenbanken systematisch nach relevanten Artikeln, welche bis zum Januar 2019 veröffentlicht wurden, durchsuchte, beschrieb signifikante Assoziationen zwischen einem Vitamin D-Mangel und Morbus Alzheimer. Die zwölf inkludierten prospektiven Kohortenstudien und vier Querschnittsstudien resultierten in einer gepoolten Hazardrate der Alzheimererkrankung von 1,34 mit einem 95 %-Konfidenzintervall von 1,13-1,60 für einen Vitamin D-Mangel (< 20 ng/ml) (CHAI et al., 2019).

Einhergehend mit diesen Ergebnissen resultierte eine prospektive Studie der älteren französischen Bevölkerung mit einer Folgestudie nach 12 Jahren in einer Assoziation eines 25(OH)-Vitamin D-Mangels mit einem erhöhten Alzheimerisiko. Die Hazardrate der Alzheimer-Krankheit betrug in der Population der 124 Alzheimer-betroffenen Personen 2,85 (95 %-Konfidenzintervall: 1,37-5,97) (FEART et al., 2017). Eine aktuelle Kohortenstudie an mehr als 13.000 Typ-2 -Diabetes-Patienten mit einem Alter über 60 Jahren assoziierte höhere Serum 25(OH)-Vitamin D-Konzentrationen (> 50 nmol/l) signifikant mit einem reduzierten Alzheimerisiko (GENG et al., 2022). Basierend auf diesen und weiteren Beobachtungen wird Vitamin D als diagnostischer Marker im Rahmen des Morbus Alzheimer und als veränderbarer Risikofaktor für diese Form der Demenz diskutiert (BIVONA et al., 2021; LANDEL et al., 2016). In diesem Zusammenhang berichtete eine klinische Studie mit siebenjähriger Folgestudie an über 400 Frauen, die älter als 75 Jahre waren, Vitamin D als potenziellen Prädiktor einer Demenzerkrankung. Diejenigen Studienteilnehmerinnen, die an der Alzheimererkrankung erkrankten ($n = 70$), nahmen signifikant weniger Vitamin D über die Nahrung auf (im Mittel $50,3 \pm 19,3$ μg pro Woche) als die Teilnehmerinnen, die keine Form der Demenz entwickelten ($n = 361$; im Mittel $59,0 \pm 29,9$ μg pro Woche) (ANNWEILER et al., 2012). Auch die Serumkonzentrationen an Vitamin D wurden in einer systematischen Literaturzusammenfassung und Metaanalyse, welche Fall-Kontroll-Studien inkludierte, als signifikant reduziert in Alzheimerpatienten, verglichen mit kognitiv gesunden Individuen, beschrieben (ANNWEILER et al., 2013). In Übereinstimmung damit wurden in 108 Alzheimerpatienten verringerte Konzentrationen an Serum-25(OH)-Vitamin D im Vergleich zu gesunden Studienteilnehmern ($n = 61$) detektiert, wobei keine Unterschiede zwischen den Alzheimerstadien oder dem Geschlecht ausgemacht wurden (OUMA et al., 2018). Neben den Serumkonzentrationen wurden auch die Vitamin D-Spiegel in der Cerebrospinalflüssigkeit von Alzheimerpatienten als signifikant vermindert im Vergleich zu gesunden Individuen detektiert (JOHANSSON et al., 2013). Darüber hinaus wurden Änderungen in der *VDR*-Expression oder Polymorphismen berichtet, auf welche in Kapitel 5.1.1 detaillierter eingegangen wird. Hinsichtlich der zuvor beschriebenen Rolle der Pigmentierung der Haut kann unter Berücksichtigung der aktuellen Datenlage eine höhere Demenzprävalenz in dunkelhäutigen Individuen angenommen werden. Diese Vermutung wurde durch eine Studie, welche 2,5 Millionen Teilnehmer beinhaltete, untermauert, da die Inzidenz einer Demenzdiagnose in Männern afrikanischer Herkunft im Vergleich zu denen kaukasischer Abstammung um 28 % erhöht war (PHAM et al., 2018). Neben der Hautfarbe scheinen auch geographische Variationen das Demenzrisiko zu beeinflussen. Unterschiedliche Studien berichteten höhere Demenzraten im Norden relativ zum Süden in verschiedenen Ländern wie China (WU et al., 2013), Italien (RUSS et al., 2016), Schweden und Schottland (RUSS et al., 2015) und es wurde diskutiert, dass dies durch eine reduzierte Sonnenlichtexposition bedingt wird, die in verringerten Vitamin D-Spiegeln resultiert. In diesem Zusammenhang sollten jedoch auch immer die mittlere Lebenserwartung sowie die Lebensgewohnheiten in den untersuchten Gebieten mitberücksichtigt werden.

Die Datenlage ist auf Grund dessen, dass vereinzelte epidemiologische Studien in teilweise widersprüchlichen Beobachtungen resultierten, als kontrovers einzustufen. Dabei ist jedoch zu beachten, dass die angewandten Messmethoden sowie Beobachtungszeiträume und vor allem die gewählten Patientenkollektive hinsichtlich Stichprobengröße, Alter, verwendeten Kontrollgruppen sowie initialem Vitamin D-Status variierten, was eine Vergleichbarkeit der Studien erschwert.

Hinzu kommt, dass bei der Interpretation epidemiologischer Studien beachtet werden sollte, dass die pleiotropen Effekte von Vitamin D vermutet werden, individual-, alters-, geschlechts- sowie kontextabhängig zu sein. Diese Eigenschaften unterstreichen einen möglichen Einsatz von Vitamin D und seinen Analoga in der personalisierten Medizin. Weiter sollte Beachtung finden, dass eine Vielzahl klinischer Studien initial nicht primär auf Aussagen über Veränderungen der Kognition der Patienten abzielte, sondern beispielsweise skelettale Erkrankungen im Fokus standen. Es handelt sich also häufig um Sekundäraussagen, die vorsichtig interpretiert werden sollten. Neuere Studienmethoden, wie beispielsweise RCT oder die Mendelsche Randomisierung (MR), auf die im Kontext Vitamin D und Alzheimererkrankung in der Diskussion näher eingegangen wird (Kapitel 5.1.1), dienen der Untersuchung von kausalen Zusammenhängen. Obwohl auch in diesen Studienformen Unterschiede in der Menge und Verabreichungsform der Vitamin D-Supplemente deutlich werden, so werden durch sie detaillierte und einheitliche Hinweise auf eine kausale Assoziation zwischen Vitamin D und Morbus Alzheimer geliefert.

Aufbauend auf den aufgeführten Erkenntnissen klinischer Studien steht die Aufklärung der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der Assoziation zwischen Vitamin D-Versorgung und den pathologischen Merkmalen der Alzheimererkrankung im Fokus aktueller Forschung. Wie bereits beschrieben, besitzen einige Lipide einen Einfluss auf die A β -Homöostase (Kapitel 2.1.3). In diesem Kontext konnten auch fettlöslichen Vitamine, wie beispielsweise Vitamin A, Provitamin A, β -Karotin, Vitamin K oder Vitamin E, mit der Alzheimerpathologie in Verbindung gebracht werden (GRIMM et al., 2016b; JIMENEZ-JIMENEZ et al., 1999; LOPES DA SILVA et al., 2014; PRESSE et al., 2008). Auch für Derivate oder Analoga dieser Vitamine wurden positive Einflüsse auf die Merkmale der Alzheimererkrankung beschrieben. Auf das Vitamin A-Derivat Acitretin, welches hauptsächlich zur Therapie entzündungsbedingter Hauterkrankungen eingesetzt wird, und dessen potenzielle Wirkungen auf die pathologischen Prozesse der Alzheimer-Krankheit in der vorliegenden Arbeit analysiert wurden, wird in Kapitel 4.2 detailliert eingegangen.

Hinsichtlich der subzellulären Lokalisierung von Vitamin D berichtete eine frühe Studie von einer Assoziation dieses Secosteroids mit Membranfraktionen im Gewebe der Darmschleimhaut und der Nieren von Ratten mit einem Vitamin D-Mangel nach oraler Supplementierung von 500 IE radioaktiv markiertem Vitamin D₃. Die aus der Differenzialzentrifugation resultierenden mikrosomalen Fraktionen aus Niere und Darmschleimhaut enthielt dabei signifikant mehr Radioaktivität im Vergleich zu den korrespondierenden mitochondrialen und nukleären Fraktionen. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass das Vitamin D, welches nach Verabreichung einer physiologischen Dosis in Nieren und Darm anwesend ist, mit subzellulären Membranen assoziiert ist, und liefern Hinweise auf eine funktionelle Wichtigkeit hinsichtlich des Kalziumtransportes (NORMAN, DELUCA, 1964). Eine folgende Studie lieferte mit Hilfe von Inkorporationsanalysen von ³²P-Orthophosphat in der Darmschleimhaut von Ratten weiterführende Hinweise auf eine potenzielle Rolle von Vitamin D im Metabolismus von Phospholipiden. Die orale Verabreichung von Vitamin D stimulierte dabei die ³²P-Inkorporation in hauptsächlich Phosphatidylcholin und -Ethanolamin (THOMPSON, DELUCA, 1964). Übereinstimmend wurde ein Einfluss von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ auf die Phospholipidkomposition in der renalen Bürstensaummembran von Ratten (TSUTSUMI et al., 1985) sowie auf die Lipidzusammensetzung in basolateralen Membranvesikel im Darm von Hähnchen (ALISIO et al., 1997) beobachtet.

Darüber hinaus wurde kürzlich *in vitro* eine Relevanz des VDR im Lipidmetabolismus der Leber (MARTINEZ-SENA et al., 2020) sowie eine VDR-vermittelte Veränderung in der Lipidhomöostase des Darms anhand muriner Studien beschrieben (CHATTERJEE et al., 2020a; JAHN et al., 2019). Auch auf Ebene klinischer Studien wurde ein Einfluss von Vitamin D auf den Lipidmetabolismus beobachtet, da ein Mangel dieses Secosteroids mit einem erhöhten Risiko für Dyslipidämie assoziiert ist (WANG et al., 2016).

2.3 Fragestellung der Arbeit

Vorausgegangene Studien haben eine Assoziation zwischen einer Vitamin D-Hypovitaminose und der Alzheimererkrankung beschrieben (CHAI et al., 2019). Auf molekularer Ebene ist bekannt, dass Vitamin D den A β -Anabolismus und -Katabolismus beeinflusst (GRIMM et al., 2014). Basierend darauf war eine Zielsetzung der vorliegenden Arbeit, mittels zellbiologischer und proteinbiochemischer Methoden zu untersuchen, ob Vitamin D-Analoga, die unter anderem bei geriatrischen Patienten therapeutischen Einsatz finden (BROWN, 2001), den A β -Spiegel in ähnlicher Weise beeinflussen wie Vitamin D und ob vergleichbare Effekte auf die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen vorliegen.

Auf Grund dessen, dass es sich bei Vitamin D, mediiert über den VDR, um einen bekannten Transkriptionsregulator handelt (PIKE, MEYER, 2010), sollte als weitere Fragestellung mittels quantitativer Echtzeit-Polymerasekettenreaktion untersucht werden, ob insbesondere die Expression Alzheimer-relevanter Gene von Vitamin D beeinflusst wird. Hierbei standen unter anderem Gene, die im Lipidmetabolismus eine wichtige Rolle spielen, im Fokus.

Bei potenziellen Beeinflussungen der Transkription dieser Gene sollte in einer anschließenden Fragestellung geklärt werden, ob sich die Veränderungen der Expression auch in Veränderungen der Lipidhomöostase äußern. Hierfür sollte eine *Lipidomics*-Analyse mittels Massenspektrometrie in Neuroblastomzelllinien in An- und Abwesenheit von Vitamin D durchgeführt werden (Abbildung 5).

Die molekularen Mechanismen der Alzheimererkrankung, insbesondere die APP-Prozessierung und A β -Degradation finden in und an der Zellmembran statt (DYRKS et al., 1988). Aus der Literatur ist bekannt, dass Veränderungen der Lipidkomposition der Membran diese Prozesse beeinflussen können (GRIMM et al., 2017a). Es sollte daher geklärt werden, ob potenzielle durch Vitamin D verursachte Veränderungen der Lipidhomöostase hier ebenfalls zu einer Modulation der APP-Prozessierung oder des A β -Katabolismus beitragen können. Aus der Literatur ist beispielsweise bekannt, dass die Kettenlänge und der Sättigungsgrad einen Einfluss auf das A β -degradierende Enzym Neprilysin haben (GRIMM et al., 2015a). Basierend darauf sollte untersucht werden, ob analoge Mechanismen bei der Regulation eines weiteren wichtigen A β -degradierenden Enzyms, IDE, zugrunde liegen könnten. Ebenfalls ist bekannt, dass die Regulation durch die AICD bei Neprilysin eine wichtige Rolle spielt. Da IDE und Neprilysin synergistisch wirken, könnte eine durch AICD mediierte analoge Regulation die bekannte Beeinflussung der Gesamt-A β -Degradation durch AICD weiter erklären. Dies sollte in der vorliegenden Arbeit experimentell adressiert sowie der zugrundeliegende molekulare Mechanismus aufgeklärt werden.

Weiterführend sollte untersucht werden, ob sich hieraus ein Regelkreis ergeben könnte, bei welchem Vitamin D die Lipidhomöostase beeinflusst, die veränderte Lipidhomöostase die APP-Prozessierung und damit die AICD-Produktion verändern kann, und AICD im Gegenzug wiederum sowohl die A β -Degradation als auch die Lipidhomöostase beeinflusst.

Neben den Vitamin D-Analoga sollte auch ein Vitamin A-Derivat untersucht werden. Es ist bekannt, dass Acitretin, ein pharmakologisch verwendetes Vitamin A-Analogon, die nicht-amyloidogene APP-Prozessierung positiv beeinflussen kann (ENDRES et al., 2014). Klinische Studien haben jedoch gezeigt, dass Acitretin insbesondere den Blut-Triglyzerid-Spiegel negativ beeinflusst (ZITO, MAZZONI, 2022). Es sollte daher in einer abschließenden Fragestellung eruiert werden, wie genau Acitretin die Lipidhomöostase, insbesondere der Leber aber auch die des Gehirns, in Acitretin-behandelten Mäusen beeinflusst. Zudem sollte untersucht werden, ob die potenziell veränderten Lipide ebenfalls einen Einfluss auf die APP-Prozessierung haben könnten.

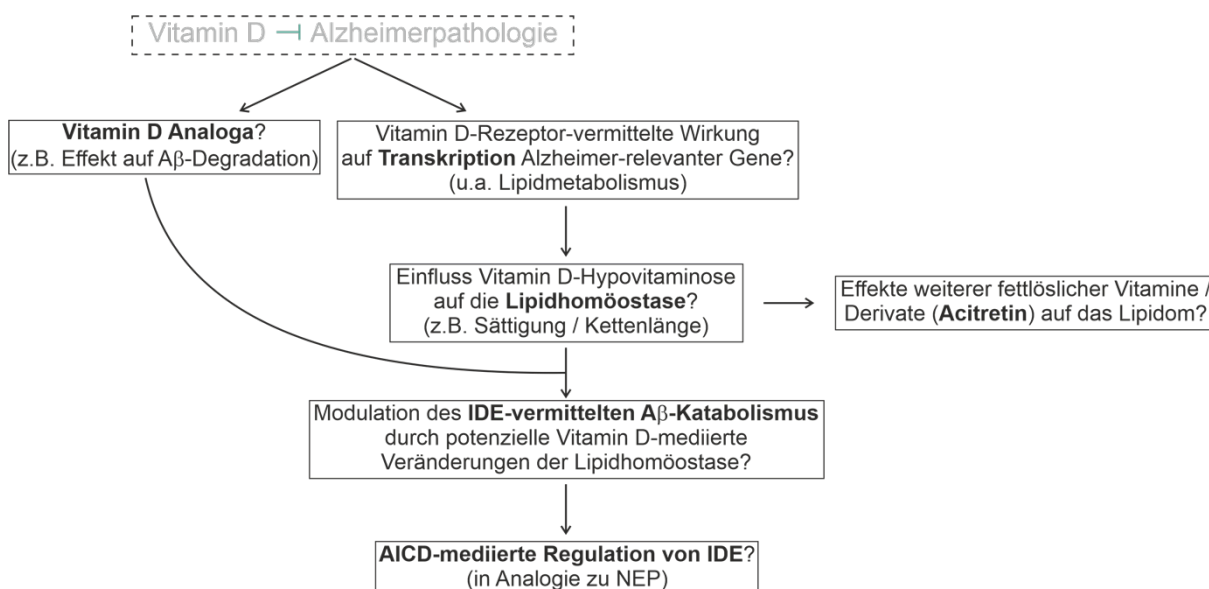


Abbildung 5: Fragestellung der Arbeit. In der vorliegenden Arbeit sollte der Effekt des Secosteroids Vitamin D auf die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der Alzheimerpathologie weiterführend aufgeklärt werden. Dazu wurde in einem ersten Abschnitt überprüft, ob therapeutisch eingesetzte Vitamin D-Analoga ähnliche Einflüsse hinsichtlich der Alzheimerpathologie ausüben, wie sie für Vitamin D bekannt sind. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob Alzheimer-relevante Gene unter der transkriptionsregulatorischen Kontrolle von Vitamin D stehen. Hierbei lag der Fokus unter anderem auf Lipidmetabolismus-assozierten Genen. Bei Detektion potenzieller Veränderungen sollte darauf aufbauend überprüft werden, ob sich diese Einflüsse auf die Transkription im Lipidom widerspiegeln. Hierbei standen vor allem Veränderungen der Sättigung und Kettenlänge im Fokus, da vermutet wird, dass diese Parameter den A β -Anabolismus und -Katabolismus beeinflussen können, was anschließend untersucht werden sollte. Im Falle einer Modulation der IDE-abhängigen A β -Degradation durch die Veränderungen in der Lipidhomöostase sollte experimentell adressiert werden, ob es in Analogie zu NEP eine AICD-medierte Regulation von IDE gibt. Abschließend sollte ein Derivat eines weiteren fettlöslichen Vitamins untersucht werden, welches therapeutisch eingesetzt wird, weshalb sich für Acitretin entschieden wurde. Hierbei standen potenzielle Einflüsse dieses Vitamin A-Derivates auf das Lipidom in Leber- und Hirngewebe im Fokus.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien sowie deren Hersteller beziehungsweise die Kooperationspartner, von denen die Chemikalien und Verbrauchsmaterialien zur Verfügung gestellt wurden, sind in den Tabellen 1 und 2 aufgelistet.

Tabelle 1: In der vorliegenden Arbeit verwendete Chemikalien. Die Bedeutungen der Abkürzungen sind dem Abkürzungsverzeichnis zu entnehmen.

Chemikalie	Hersteller
Acitretin	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
Agar-Agar	Carl Roth
Agarose	Carl Roth
AICD ₁₋₂₀ Peptid	Genscript
AICD ₁₋₂₀ Peptid, FITC-markiert	Bachem
Ammoniumacetat	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
Ampicillin	Carl Roth
A β ₁₋₄₀ Peptid	Arbeitsgruppe Prof. Dr. Penke Botond (Szeged, Ungarn)
A β ₁₋₄₂ Peptid	Arbeitsgruppe Prof. Dr. Penke Botond (Szeged, Ungarn)
Bicinchoninsäure	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
Bromphenolblau	Carl Roth
BSA	Carl Roth
BSA, fettsäurefrei	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
Calcifediol und Analoga (Tab. 9)	MedChem Express
Chloroform, HPLC-grade	Merck Millipore
Complete PI-Cocktail mit EDTA	Roche
Complete PI-Cocktail ohne EDTA	Roche
DMEM	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
DMSO	Carl Roth
ECL-Hyperfilm	Amersham
ECL-Lösungen (Western Lightning Plus ECL)	Perkin Elmer
EDTA	Carl Roth
Entwicklerlösung GBX	Kodak
Ethanol, HPLC-grade	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
Fast SYBR Green Master Mix	Applied Biosystems
FCS	PAN Biotech
Fixiererlösung	Kodak
Glycerin	Carl Roth
Glycin	Carl Roth
Hefe-Extrakt	Carl Roth
Hepes	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
Hygromycin B	PAN Biotech
IDE, rekombinant, human	R&D Systems
Insulin	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
Isopropanol, HPLC-grade	VWR
Kaliumacetat	Carl Roth
Kokosnuss-Öl	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
CaCl ₂	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
L-Glutamin	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
Lipofectamine 2000	Life Technologies
MnCl ₂	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
MEM-Aminosäure-Lösung	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)

Methanol, HPLC-grade	VWR
Magermilchpulver (Fette \leq 1,5 %)	Merck Millipore
MOPS	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
NaCl	AppliChem
NaOH	Carl Roth
Natriumpyruvat	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
NEP- / IDE-Substrat	R&D Systems
NP-40	Substitute Fluka
Opti-MEM	Life Technologies
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
Phospholipide (Tab. 10)	Avanti Polar Lipids
PITC	Merck Millipore
Propidiumiodid	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
Proteingrößenmarker Page Ruler	Promega
Protein-G-Sepharose	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
Pyridin	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
RbCl	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
Saccharose	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
Saint PhD	Synvolux Therapeutics
SDS	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
Tricin	Biomol
Tris	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
Triton X-100	Merck Millipore
Trizma Base	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
TRIzol Reagenz	Life Technologies
Trypsin-EDTA-Lösung	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
Tween-20	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
Wasser, HPLC-grade	VWR
Wasser, RNase-frei	Qiagen
Zeocin	Life Technologies
α -Sekretase-Substrat	Merck Millipore
β -Mercaptoethanol	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
β -Sekretase-Inhibitor II	Merck Millipore
β -Sekretase-Substrat	Merck Millipore
γ -Sekretase-Inhibitor IV	Merck Millipore
γ -Sekretase-Inhibitor X	Merck Millipore
γ -Sekretase-Substrat	Merck Millipore

Tabelle 2: In der vorliegenden Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Hersteller
10 cm Zellkultur-Schalen	Sarstedt
12-Vertiefungsplatte, Zellkultur	Falcon
24-Vertiefungsplatte, Zellkultur	Falcon
6-Vertiefungsplatte, Zellkultur	Falcon
96-Tiefvertiefungsplatte	Nunc
96-Vertiefungsplatte für RT-PCR, 6x16, weiß	Thermo Fisher Scientific
96-Vertiefungsplatte, Zellkultur	Falcon
96-Vertiefungsplatte, MaxiSorp, schwarz	VWR
96-Vertiefungsplatte, schwarz	Costar
96-Vertiefungsplatte, transparent	Greiner
96-Vertiefungsplatte, weiß	Nunc
96-Vertiefung-Sammelplatte	Nunc
96-Vertiefung-Sterilfilterplatte	Merck Millipore
ECL-Hyperfilm	Amersham
Einfrier-Röhrchen, 1.8 ml	Nunc
Zentrifugenröhrchen, 15 ml und 50 ml	Sarstedt

Filterpapier	Whatman
Fotokopierfolie DIN A4	Xerox
Glasflaschen, 2 ml	NeoLab
Glas-Kügelchen für Minilys-Homogenisator, 0,5 mm	PEQLAB Biotechnology
Glaspipetten	NeoLab
Glasröhrchen	Wheaton
Gummischaber	Hartenstein
Kanülen 23G x 1“, 0,6mm x 25mm	Becton, Dickinson and Company
Kanülen 24G x 1“, 0,55 mm x 25mm	Becton, Dickinson and Company
Keramik-Kügelchen für Minilys-Homogenisator, 1,4 mm	PEQLAB Biotechnology
Nitrozellulosemembran 0,2 µm Porengröße	Whatman
Nitrozellulosemembran 0,45 µm Porengröße	Whatman
Pasteurpipetten	VWR
Petrischalen	Sarstedt
Reaktionsgefäß (PCR) 200 µl	Biozym Scientific
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäß 2 ml	Eppendorf
Silikonmatte	Nunc
Spritzen 1 ml	Becton, Dickinson and Company
Tris-Tricin-Gele, 10-20 %	Anamed Gelelektrophorese
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckman Coulter
Verschlussfolie für 96-Vertiefungsplatten	PEQLAB Biotechnology
Verschlussfolie für RT-PCR-Platten	Thermo Fisher Scientific
Zellschaber	Corning

3.1.2 Geräte

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Geräte und Zubehör sowie deren Hersteller sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: In der vorliegenden Arbeit verwendete Geräte und Zubehör.

Gerät / Zubehör	Hersteller
Analysewaage ABS 80-4	Kern & Sohn
Autosampler (1200 Serie HPLC)	Agilent Technologies
Autoklav, V-Serie	Systec
Blotkammer Trans-Blot Cell	Bio-Rad Laboratories
Brutschrank, 37 °C	Heraeus
Einfrierbox Cryo 1 °C Freezing Container	Nalgene
Einkanal-Multipette M4	Eppendorf
Elektrophoresekammer Xcell SureLock Mini-Cell	Thermo Fisher Scientific
ELISA-Reader Multiskan EX	Thermo Fisher Scientific
ESI-MS 4000 QTRAP Quadrupol-Massenspektrometer	AB Sciex
Fluorometer Safire 2	Tecan
Fluorometer / Luminometer Infinite M1000 Pro	Tecan
Gefrierschrank, -20 °C Premium	Liebherr
Gefrierschrank, -80 °C Hera Freeze	Thermo Electron
Gelkammer Novex Mini-Cell	Life Technologies
Hamilton Kapillare	Hamilton
Heizblock Thermoshaker	Universal Labortechnik
Inkubationsschüttler New Brunswick Innova 44	Eppendorf
Inkubator HeraCell 150	Heraeus
Lichtmikroskop Nikon Eclipse TS100	Nikon
Magnet-Heizrührer MR2002	Heidolph Instruments
Mikrowelle	Continent
Minilys Homogenisator	PEQLAB Biotechnology

N ₂ Abdampfvorrichtung EVA-EC	VLM
NanoDrop 8000 UV-Vis-Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific
PCR-Cycler PRIMUS 25 ADVANCED	PEQLAB Biotechnology
pH-Meter 766	Calimatic Knick
PikoReal PCR System	Thermo Fisher Scientific
Pipetboy Comfort	INTEGRA Biosciences AG
Pipettenset Research	Eppendorf
Power Supply Consort EV231	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
Präzisionswaage EW	Kern
Röntgenkassette Quanta III	Dupont
Rotor JA-10	Beckman Coulter
Rotor JA-25.50	Beckman Coulter
Rotor SW40	Beckman Coulter
Rotor TLA-55	Beckman Coulter
Scanner CanoScan LiDE 50	Canon
Sicherheitswerkbank HeraSafe	Heraeus
Software Analyst 1.5	AB Sciex
Software Image Gauge V3.45	Fuji Science Lab
Software R Studio	R Studio
Software Piko Real 2.1	Thermo Fisher Scientific
Software SPSS Statistics 22	IBM Corporation
Stickstofftank, -196 °C GT 140	Air Liquide
TransBlot Gel-Halter mit Schwämmen	BioRad
Transferkammer TransBlot Cell	BioRad
Turbo Spray-Ionenquelle	AB Sciex
Übertopftaumler Reax2	Heidolph Instruments
Ultraschallsonde Sonopuls HD2070	Bandelin
Ultrazentrifuge Optima LE-80K	Beckman Coulter
Vortex Genie2	Bender & Hobein
Wärmeschrank UT12	Heraeus
Wasserbad	GFL
Wheaton-Schüttler Multi Reax	Heidolph Instruments
Wippschüttler SkyLine Shaker S-4	ELMI
Wipptisch Rocky	Labortechnik Fröbel
Zentrifuge 5415D	Eppendorf
Zentrifuge Avanti J-20 XP	Beckman Coulter
Zentrifuge Biofuge Pico	Heraeus
Zentrifuge Biofuge Primo	Heraeus
Zentrifuge Fresco21	Heraeus
Zentrifuge Labfuge GL Heraeus	Heraeus
8-Kanal-Pipette, elektronisch	Eppendorf

3.1.3 Zelllinien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 4 aufgelistet. Dieser sind eine kurze Beschreibung der jeweiligen Zelllinie, ihre Herkunft und die je nach Zelllinie vorhandene Resistenz gegenüber einem Antibiotikum zu entnehmen. Die Ergebnisse der Validierung der Zelllinien sind im Ergebnisteil (Kapitel 4) an entsprechender Stelle der jeweiligen Verwendung dargestellt.

Tabelle 4: Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien.

Bezeichnung	Beschreibung / Herkunft / Antibiotika-Resistenz
MEF WT	embryonale Maus-Fibroblasten (Wildtyp) / zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Ulrike Müller (Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie (IPMB) der Universität Heidelberg) im Rahmen einer Kooperation
MEF PS1/2 ^{-/-}	PS1/2-defiziente embryonale Maus-Fibroblasten / zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Bart de Strooper (Leuven, Belgien) im Rahmen einer Kooperation (HERREMAN et al., 2000)
MEF PS1 ^{res}	PS1/2-defiziente embryonale Maus-Fibroblasten, die mit humanem, wildtypischen PS1 stabil retransfiziert wurden / Plasmidkonstrukt-Klonierung durch Prof. Dr. Marcus O.W. Grimm und Generierung der Zellen durch Dr. Eva Hesser / Resistenz gegen Zeocin
MEF PS1/2 ^{-/-} + IDE-KD	PS1/2-defiziente embryonale Maus-Fibroblasten mit transientem Knockdown von IDE / im Rahmen dieser Arbeit mit <i>SureSilencing IDE-shRNS</i> Plasmid (Tabelle 13) generiert
MEF APP/APLP2 ^{-/-}	APP/APLP2-defiziente embryonale Maus-Fibroblasten / zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Ulrike Müller (Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie (IPMB) der Universität Heidelberg) im Rahmen einer Kooperation (HEBER et al., 2000)
MEF APP/APLP2 ^{-/-} + APP ⁶⁹⁵	APP/APLP2-defiziente embryonale Maus-Fibroblasten transient transfiziert mit APP ⁶⁹⁵ / im Rahmen dieser Arbeit generiert; das entsprechende Plasmid wurde zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Stefan Kins (TU Kaiserslautern) (Tabelle 13)
MEF APP/APLP2 ^{-/-} + APP ⁷⁵¹	APP/APLP2-defiziente embryonale Maus-Fibroblasten transient transfiziert mit APP ⁷⁵¹ / im Rahmen dieser Arbeit generiert; das entsprechende Plasmid wurde zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Stefan Kins (TU Kaiserslautern) (Tabelle 13)
MEF APP/APLP2 ^{-/-} + APP ⁷⁷⁰	APP/APLP2-defiziente embryonale Maus-Fibroblasten transient transfiziert mit APP ⁷⁷⁰ / im Rahmen dieser Arbeit generiert; das entsprechende Plasmid wurde zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Stefan Kins (TU Kaiserslautern) (Tabelle 13)
MEF APPΔCT15	embryonale Maus-Fibroblasten mit Deletion der letzten 15 Aminosäuren des C-Terminus von APP / zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Ulrike Müller (Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie (IPMB) der Universität Heidelberg) im Rahmen einer Kooperation (RING et al., 2007)
MEF APPΔCT15 + C50	embryonale Maus-Fibroblasten mit Deletion der letzten 15 Aminosäuren des C-Terminus von APP mit stabiler Überexpression der letzten 50 C-terminalen Aminosäuren von APP ⁶⁹⁵ / generiert von Dr. Christoph P. Stahlmann / Resistenz gegen Zeocin
N2a WT	murine Neuroblastom-Zelllinie (Wildtyp) (OLMSTED et al., 1970)
N2a WT mock zu Ide-KD	Kontrollzelllinie zu N2a Ide-KD / generiert von Dr. Janine Mett (METT, 2017) / Resistenz gegen Hygromycin B
N2a Ide-KD	N2a Zelllinie mit stabiler Expression von Ide-shRNS / generiert von Dr. Janine Mett (METT, 2017) / Resistenz gegen Hygromycin B
SH-SY5Y WT	humane Neuroblastom-Zelllinie (Wildtyp) (ROSS et al., 1983)
SH-SY5Y APP ⁶⁹⁵	SH-SY5Y Zelllinie mit stabiler Überexpression von humanem APP ⁶⁹⁵ / generiert von Dr. Heike S. Grimm / Resistenz gegen Hygromycin B
SH-SY5Y C50	SH-SY5Y Zelllinie mit stabiler Überexpression der letzten 50 C-terminalen Aminosäuren von humanem APP ⁶⁹⁵ / generiert von Dr. Christoph P. Stahlmann / Resistenz gegen Zeocin

SH-SY5Y mock	SH-SY5Y Zelllinie mit stabiler Überexpression des CRISPR-Cas9 Leerplasmids (pSpCas9(BB)-1A-Puro; (RAN et al., 2013)); Kontrollzelllinie zu SH-SY5Y APP ^{-/-} und SH-SY5Y PS1 ^{-/-} / generiert von Dr. Christoph P. Stahlmann / Resistenz gegen Puromycin
SH-SY5Y APP ^{-/-}	SH-SY5Y Zelllinie mit per CRISPR-Cas9 Methode deletiertem <i>APP</i> Gen / generiert von Dr. Christoph P. Stahlmann / Resistenz gegen Puromycin
SH-SY5Y PS1 ^{-/-}	SH-SY5Y Zelllinie mit per CRISPR-Cas9 Methode deletiertem <i>PS1</i> Gen / generiert von Dr. Christoph P. Stahlmann / Resistenz gegen Puromycin

3.1.4 Gewebeproben

3.1.4.1 Verwendete Mausstämme

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit analysierten Mausmodelle wurden durch verschiedene Kooperationspartner, die in Tabelle 5 aufgelistet sind, zur Verfügung gestellt.

Tabelle 5: In der vorliegenden Arbeit analysierte Mausmodelle.

Bezeichnung	Beschreibung / Herkunft
5xFAD-Mäuse (Jackson Laboratory)	Mäuse mit kombinierter Expression fünf verschiedener humaner FAD-APP- und -PS1-Mutationen (APP K670N/M671L (MULLAN et al., 1992), APP I716V (ECKMAN et al., 1997), APP V717I (GOATE et al., 1991), PS1 M146L und PS1 L286V (SHERRINGTON et al., 1995) / zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe PD Dr. Kristina Endres (AG Molekulare Mechanismen des gesunden Alterns und der Neurodegeneration, Universitätsmedizin Mainz) (OAKLEY et al., 2006)
Vitamin D-Mangel-Mäuse	Vitamin D-Mangel-Mäuse (C57BL/6) / zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Dr. Robert Bals (Innere Medizin V – Pneumologie, Universitätsklinikum Homburg) (GRIMM et al., 2014)
WT-Mäuse von U. Müller	C57BL/6 Wildtyp Mäuse, zu den APP/APLP ^{-/-} und APPACT15 Mäusen / zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Ulrike Müller (Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie (IPMB) der Universität Heidelberg)
APP/APLP2 ^{-/-} Mäuse	Mäuse mit Gen-Knockout von APP und APLP2 / zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Ulrike Müller (Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie (IPMB) der Universität Heidelberg) (HEBER et al., 2000)
APPACT15 Mäuse	Mäuse mit Deletion der 15 C-terminalen Aminosäuren von APP / zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Ulrike Müller (Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie (IPMB) der Universität Heidelberg) (RING et al., 2007)
APP ^{swe} /PS1ΔE9 Mäuse	Mäuse mit kombinierter Expression von humanem APP ⁶⁹⁵ mit der swedish-Doppelmutation (K679N/M671L) (MULLAN et al., 1992) und humanem PS1 mit Deletion des Exons 9 (PS1ΔE9) (PEREZ-TUR et al., 1995) / zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Heikki Tanila (Faculty of Health Sciences, A.I. Virtanen Institute for Molecular Sciences, Kuopio, Finland) (LIU et al., 2004)

Die Haltung der Mäuse erfolgte durch die Kooperationspartner gemäß der Tierschutzverordnung einheitlich unter kontrollierten Umgebungsbedingungen mit einer Temperatur von 20-22 °C, 50-60 % Luftfeuchtigkeit und einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus, wobei ihnen Futter und Wasser während der kompletten Studie *ad libitum* zur Verfügung standen. Die im Rahmen der Forschungsprojekte durchgeführten Tierversuche und Tötungen wurden von den entsprechenden Landesämtern genehmigt.

3.1.4.2 Fütterungsexperiment Vitamin D-Hypovitaminose

(nach (NIEDERSTRASSER et al., 2016))

In dieser Arbeit wurde Hirngewebe von Mäusen aus einem Fütterungsexperiment verwendet, welches in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Robert Bals (Universitätsklinikum des Saarlandes, Klinik für Innere Medizin V - Pneumologie, Allergologie, Beatmungs- und Umweltmedizin) durchgeführt wurde.

Sechs Wochen alte weibliche C57BL/6 Mäuse (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) wurden für sechs bis neun Monate mit einer Kontroll- (C1000; enthielt 500 IU/kg Vitamin D₃) oder Vitamin D-Mangeldiät (C1017; ohne zugesetztes Vitamin D₃) von Altromin (Lage, Deutschland) gefüttert. Beide Diäten waren isokalorisch und hinsichtlich ihres Protein-, Kohlenhydrat-, Faser- und Mineral-Gehalts identisch. Verglichen zu den Kontroll-gefütterten Mäusen, wiesen die Vitamin D-Mangel-gefütterten Tiere einen um 23 % reduzierten 25-Hydroxyvitamin D₃-Serumspiegel auf, was dem Vitamin D-Mangelstatus der älteren Bevölkerung entspricht (ANNWEILER et al., 2011; BUELL et al., 2010). In vorausgegangenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass unter diesen experimentellen Bedingungen molekulare Mechanismen der Alzheimerpathologie im Gehirn betroffen sind, was beispielsweise anhand einer verringerten A β -Degradation über Neprilysin deutlich wurde (GRIMM et al., 2014). Die Gehirne wurden nach Euthanasie der Mäuse durch eine Überdosis an Ketamin (35 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (525 mg/kg Körpergewicht) präpariert, in 0,9 %-Kochsalzlösung gewaschen, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu weiteren Analysen in flüssigem Stickstoff gelagert. Die im Rahmen dieses Forschungsprojektes durchgeführten Tierversuche wurden vom Landesamt für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz des Saarlandes (Referenznummer 17/2011) genehmigt und anhand der nationalen Richtlinien für Tierversuche durchgeführt.

3.1.4.3 Acitretinbehandlung

In dieser Arbeit wurde Leber- und Hirngewebe von Mäusen aus einem Injektionsexperiment mit Acitretin verwendet, welches in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von PD Dr. Kristina Endres (Universitätsmedizin Mainz, AG Molekulare Mechanismen des gesunden Alterns und der Neurodegeneration) durchgeführt wurde.

Weibliche transgene 5xFAD-Mäuse im Alter von 30 Wochen wurden in Gruppen von zwei bis fünf Tieren unter oben beschriebenen Bedingungen gehalten. Acitretin wurde frisch in einer Konzentration von 1 mg/ml in Mais-Öl gelöst und das entsprechende Injektionsvolumen nach Wiegen der Mäuse am ersten Behandlungstag auf eine tägliche Dosierung von 10 mg Acitretin pro Kilogramm Körpergewicht in einem Volumen von 400 μ l mit Mais-Öl eingestellt. Die Injektion erfolgte intraperitoneal für sieben Tage mit einer zweitägigen Pause (DOS SANTOS GUILHERME et al., 2019), wobei die Kontrolltiere 400 μ l Mais-Öl erhielten. Die Dosierung wurde entsprechend Reagan-Shaw *et al.* (2008) berechnet, indem von der maximalen Dosis für menschliche Patienten (50 mg/Tag) und einem Körpergewicht von 60 kg ausgegangen wurde (REAGAN-SHAW et al., 2008). Am Ende der Acitretinbehandlung wurden die Mäuse mit dem Inhalationsanästhetikum Isofluran betäubt und getötet. Anschließend wurde die linke Hirn-Hemisphäre und der rechte Leberlappen präpariert, mit destilliertem Wasser gewaschen und bei -20 °C kurzfristig oder bei -80 °C langfristig gelagert. Die im Rahmen dieses Forschungsprojektes durchgeführten Tierversuche wurden vom Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz (G14-1-087) genehmigt und anhand der Richtlinien des Rates der Europäischen Gemeinschaften über die Pflege und Verwendung von Tieren in Versuchsverfahren ausgeführt.

3.1.4.4 Fütterungsexperiment MCT-Fette

In dieser Arbeit wurde Serum von Mäusen aus einem Fütterungsexperiment verwendet, welches in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Heikki Tanila (A.I. Virtanen Institut Kuopio, Finnland) nach entsprechenden Tierschutzrichtlinien durchgeführt wurde.

Für das Experiment wurden männliche acht Wochen alte APP^{swe}/PS1 Δ E9-Mäuse mit C57Bl/6J-Hintergrund für zehn Wochen entweder mit einer MCT-Diät (engl. *medium-chain triglycerides*, mittelkettigen Fettsäuren) gefüttert, welche mit Kokosnuss-Öl angereichert war, oder mit einer isokalorischen Kontrolldiät, welche mit Sonnenblumenöl mit hohem Ölsäuregehalt (KD Pharma) angereichert war. Die genaue Komposition der beiden Öle kann Tabelle 6 entnommen werden. Durch eine intraperitoneale Injektion von 60 mg Pentobarbital-Chloralhydrat pro Kilogramm Körpergewicht wurden die Tiere am Ende des Experiments anästhesiert und eine Blutprobe von circa 300 μ l aus dem Herzen entnommen. Diese wurde zur Serum-Gewinnung für eine Minute bei 3000 x g zentrifugiert.

Tabelle 6: Zur Anreicherung der Kokosnuss-Öl- und Kontroll-Diät verwendete Öle.

Bezeichnung	Fettsäure-Komposition
Kokosnuss-Öl	hoher Anteil an MCFAs:
	45,1 – 53,2 % Laurinsäure (12:0)
	16,8 – 21,0 % Myristinsäure (14:0)
	7,5 – 10,2 % Palmitinsäure (16:0)
	5,0 – 10,0 % Ölsäure (18:1)
	4,6 – 10,0 % Caprylsäure (8:0)
Sonnenblumen-Öl	5,0 – 8,0 % Caprinsäure (10:0)
	hoher Anteil an Ölsäure (18:1):
	75,0 – 90,7 % Ölsäure (18:1)
	2,1 – 17,0 % Linolsäure (18:2)
	2,9 – 6,2 % Stearinsäure (18:0)
	2,6 – 5,0 % Palmitinsäure (16:0)

3.1.4.5 Humane *post mortem* Gehirnproben

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Riemenschneider (Universitätsklinikum des Saarlandes, Deutschland) wurde humanes *post mortem* Hirngewebe von der Niederländischen Hirnbank (NHB; Niederländischen Instituts für Neurowissenschaften, Amsterdam, Niederlande) erworben. Der entsprechende Ethikantrag wurde von Prof. Dr. Riemenschneider gestellt.

Die Hirnproben, welche aus dem präfrontalen Kortex präpariert wurden, konnten hinsichtlich Braak-Stadiums (BRAAK, BRAAK, 1991; BRAAK et al., 1993), Amyloid-Belastung, ApoE-Status, Geschlecht, Alter und *post mortem* Verzögerung kategorisiert werden. In dieser Arbeit wurden zwei Kohorten, welche anhand ihres Braak-Stadiums voneinander unterschieden wurden, analysiert. Die erste Kohorte umfasste Hirnproben der Braak-Stadien vier bis sechs und inkludierte 121 weibliche sowie 35 männliche Individuen, wobei die durchschnittliche *post mortem* Verzögerung der Hirnproben 6,06 Stunden betrug. Die zweite Kohorte inkludierte die Braak-Stadien eins bis drei und umfasste 36 weibliche und 31 männliche Individuen, wobei die durchschnittliche *post mortem* Verzögerung der Hirnproben 6,10 Stunden betrug. Eine detaillierte Auflistung ist den Tabellen 7 und 8 zu entnehmen.

Tabelle 7: Überblick über die NBB-Hirnproben von Kohorte I (Braak-Stadien 4-6). Die Charakterisierung umfasst neben der NBB-spezifischen Nummer auch das Geschlecht (weiblich, W bzw. männlich, M), das Alter in Jahren (a), das Braak-Stadium (B&B), die *post mortem* (PM) Verzögerung in Stunden (h), den APOE ϵ Genotyp, den Amyloid-Status sowie die Hirnregion.

NBB-Nummer	W/M	Alter (a)	B&B	PM-Verzögerung (h)	APOE ϵ	Amyloid	Hirnregion
1990_069	W	91	4	04:10	43		Gyrus frontalis medius
1991_078	W	98	5	04:00	43		Gyrus frontalis medius
1991_080	W	86	4	03:30	43		Gyrus frontalis medius
1992_052	W	90	5	05:00	43	A	Gyrus frontalis medius
1992_068	W	78	6	05:30	44	A	Gyrus frontalis inferior
1993_138	W	74	6	04:30	43		Gyrus frontalis medius
1994_002	W	80	6	06:40	33		Gyrus frontalis inferior
1994_006	W	90	5	02:35	44		Gyrus frontalis inferior
1994_007	W	78	6	05:00	43		Gyrus frontalis inferior
1994_014	W	77	5	03:35	33		Gyrus frontalis inferior
1994_016	W	86	5	05:15	33		Gyrus frontalis inferior
1994_022	W	87	5	05:30	42		Gyrus frontalis inferior
1994_023	W	87	6	04:00	43		Gyrus frontalis inferior
1994_045	W	82	6	04:00	44		Gyrus frontalis inferior
1994_046	W	90	4	06:15	43		Gyrus frontalis inferior
1994_101	W	87	6	05:00	43		Gyrus frontalis medius
1996_063	W	82	5	09:00	43	C	Gyrus frontalis inferior
1997_087	W	78	5	03:10	43	C	Gyrus frontalis medius
1997_133	W	95	5	04:45	33		Gyrus frontalis superior
1997_136	W	62	6	04:25	44		Gyrus frontalis superior
1997_167	W	82	5	04:00	44		Gyrus frontalis medius
1998_007	W	75	6	03:50	44		Gyrus frontalis medius
1998_015	W	87	6	06:15	43		Gyrus frontalis medius
1998_026	W	67	5	03:30	44	C	Gyrus frontalis superior
1998_032	W	92	4	03:50	42	C	Gyrus frontalis superior
1998_052	W	90	4	04:00	43	0	Gyrus frontalis medius
1998_065	W	90	5	03:40	43	0	Gyrus frontalis medius
2000_062	W	91	4	03:45	43	A	Gyrus frontalis medius
2000_119	W	85	5	06:10	43	B	Gyrus frontalis medius
2000_138	W	84	5	05:15	33	B	Gyrus frontalis medius
2001_010	W	84	4	04:15	32	B	Gyrus frontalis superior
2001_013	W	68	5	04:51	33	B	Gyrus frontalis medius
2001_019	W	92	5	04:55	43	A	Gyrus frontalis superior
2001_066	W	96	5	05:50	33	C	Gyrus frontalis medius
2001_070	W	86	6	05:40	44	C	Gyrus frontalis medius
2001_071	W	91	5	07:50	43	C	Gyrus frontalis medius
2001_076	W	78	6	03:45	44	C	Gyrus frontalis medius
2001_081	W	93	5	05:05	33	0	Gyrus frontalis medius
2001_087	W	89	5	03:15	43	0	Gyrus frontalis medius
2001_095	W	81	6	05:30	44	B	Gyrus frontalis medius
2001_098	W	94	6	05:40	43	B	Gyrus frontalis medius
2001_105	W	79	4	05:20	43	B	Gyrus frontalis medius
2001_116	W	94	4	04:20	32	C	Gyrus frontalis medius
2001_120	W	87	5	04:00	43	C	Gyrus frontalis medius
2001_124	W	86	6	05:20	44	C	Gyrus frontalis medius
2001_125	W	77	6	08:30	44	C	Gyrus frontalis medius
2001_129	W	91	6	03:40	33	C	Gyrus frontalis medius
2002_001	W	84	5	06:30	43	C	Gyrus frontalis medius
2002_004	W	91	4	04:15	43	B	Gyrus frontalis medius
2002_027	W	85	5	05:00	44	C	Gyrus frontalis medius
2002_047	W	83	5	07:17	43	C	Gyrus frontalis medius

2002 050	W	95	4	04:10	33	B	Gyrus frontalis medius
2002 056	W	85	5	03:45	43	C	Gyrus frontalis medius
2002 061	W	76	5	10:45	44	C	Gyrus frontalis medius
2002 072	W	62	6	04:45	43	C	Gyrus frontalis medius
2002 080	W	86	5	04:10	44	C	Gyrus frontalis medius
2002 085	W	79	5	04:15	33	C	Gyrus frontalis medius
2002 088	W	78	5	04:00	43	C	Gyrus frontalis medius
2002 093	W	87	5	09:15	33	C	Gyrus frontalis medius
2002 096	W	82	6	06:00	42	C	Gyrus frontalis medius
2002 102	W	88	5	03:15	33	C	Gyrus frontalis medius
2003 008	W	95	4	03:40	43	C	Gyrus frontalis medius
2003 034	W	91	5	06:30	43	C	Gyrus frontalis medius
2003 071	W	84	5	07:15	43	C	Gyrus frontalis medius
2003 110	W	82	5	04:35	43	C	Gyrus frontalis medius
2004 006	W	89	5	07:00	43	C	Gyrus frontalis medius
2004 010	W	85	5	07:00	33	C	Gyrus frontalis medius
2004 011	W	84	5	05:55	33	C	Gyrus frontalis medius
2004 025	W	90	4	05:30	43	C	Gyrus frontalis medius
2004 029	W	78	5	04:50	44	C	Gyrus frontalis medius
2004 030	W	89	5	04:40	43	C	Gyrus frontalis medius
2004 034	W	89	5	04:40	43	C	Gyrus frontalis medius
2004 038	W	62	5	05:55	33	C	Gyrus frontalis medius
2004 039	W	69	6	04:45	33	C	Gyrus frontalis medius
2004 043	W	88	5	05:10	43	C	Gyrus frontalis medius
2004 053	W	94	4	05:05	43	C	Gyrus frontalis medius
2004 058	W	86	4	05:05	43	C	Gyrus frontalis medius
2004 064	W	88	5	06:25	33	C	Gyrus frontalis medius
2004 077	W	74	5	08:25	43	C	Gyrus frontalis medius
2004 083	W	90	5	04:30	42	B	Gyrus frontalis medius
2004 086	W	84	5	04:30	44	C	Gyrus frontalis medius
2005 003	W	84	5	06:20	33	C	Gyrus frontalis medius
2005 005	W	94	5	04:30	33	C	Gyrus frontalis medius
2005 011	W	93	4	02:30	32	C	Gyrus frontalis medius
2005 012	W	91	6	05:45	43	C	Gyrus frontalis medius
2005 013	W	89	6	04:30	43	C	Gyrus frontalis medius
2005 016	W	81	5	06:15	43	C	Gyrus frontalis medius
2005 021	W	89	5	10:20	33	C	Gyrus frontalis medius
2005 022	W	78	5	04:35	43	C	Gyrus frontalis medius
2005 023	W	81	6	06:00	33	C	Gyrus frontalis medius
2005 026	W	84	5	04:50	43	C	Gyrus frontalis medius
2005 036	W	94	4	06:04	43	C	Gyrus frontalis medius
2005 064	W	77	5	03:45	43	C	Gyrus frontalis medius
2005 070	W	77	5	07:00	33	C	Gyrus frontalis medius
2005 074	W	72	5	09:00	43	C	Gyrus frontalis medius
2006 006	W	87	6	05:00	43	C	Gyrus frontalis medius
2006 010	W	93	4	06:45	33	C	Gyrus frontalis inferior
2006 020	W	77	5	03:05	43	C	Gyrus frontalis medius
2006 044	W	86	4	05:55	43	B	Gyrus frontalis medius
2007 089	W	74	5	05:30	43	C	Gyrus frontalis inferior
2008 004	W	82	6	04:20	43	C	Gyrus frontalis inferior
2008 018	W	84	6	04:05	n/a	C	Gyrus frontalis inferior
2008 045	W	85	4	06:00	n/a	C	Gyrus frontalis medius
2008 063	W	78	5	08:25	n/a	C	Gyrus frontalis medius
2009 006	W	81	5	06:10	n/a	C	Gyrus frontalis medius
2009 009	W	88	5	06:45	n/a	C	Gyrus frontalis medius
2009 019	W	84	4	06:00	n/a	C	Gyrus frontalis medius
2009 041	W	85	6	05:10	n/a	C	Gyrus frontalis medius
2009 049	W	81	4	06:15	n/a	C	Gyrus frontalis medius

2009_050	W	88	5	08:15	n/a	C	Gyrus frontalis medius
2009_065	W	75	5	05:00	n/a	C	Gyrus frontalis medius
2009_069	W	72	6	05:55	n/a	C	Gyrus frontalis medius
2009_082	W	66	5	06:30	n/a	C	Gyrus frontalis medius
2009_086	W	84	6	04:50	n/a	C	Gyrus frontalis medius
2009_088	W	90	6	05:40	n/a	C	Gyrus frontalis medius
2009_100	W	94	4	08:05	n/a	C	Gyrus frontalis medius
2009_101	W	96	4	04:30	n/a	C	Gyrus frontalis medius
2009_105	W	82	5	05:25	n/a	C	Gyrus frontalis medius
2010_001	W	92	5	03:25	n/a	C	Gyrus frontalis medius
2010_054	W	82	6	05:30	n/a	C	Gyrus frontalis medius
2010_069	W	66	5	08:15	n/a	C	Gyrus frontalis medius
1990_117	M	86	5	04:10	33		Gyrus frontalis medius
1991_088	M	90	5	04:55	43		Gyrus frontalis medius
1992_084	M	76	5	03:30	43	A	Gyrus frontalis medius
1992_088	M	83	4	03:40	33	A	Gyrus frontalis medius
1994_082	M	64	6	05:55	44		Gyrus frontalis inferior
1994_086	M	75	5	05:30	43		Gyrus frontalis inferior
1995_077	M	72	5	04:45	33		Gyrus frontalis inferior
1998_011	M	62	5	03:30	43		Gyrus frontalis medius
1998_132	M	75	5	05:15	43		Gyrus frontalis medius
2001_063	M	85	5	04:45	43	C	Gyrus frontalis superior
2002_002	M	92	4	03:30	33	C	Gyrus frontalis medius
2003_070	M	87	5	06:10	33	C	Gyrus frontalis medius
2004_032	M	64	5	04:45	42	C	Gyrus frontalis medius
2005_010	M	93	5	04:30	43	C	Gyrus frontalis medius
2005_028	M	93	4	05:50	33	C	Gyrus frontalis medius
2005_033	M	70	5	05:35	43	C	Gyrus frontalis medius
2005_071	M	64	6	07:30	33	C	Gyrus frontalis medius
2005_075	M	82	5	05:05	32	C	Gyrus frontalis medius
2006_013	M	81	4	04:50	44	C	Gyrus frontalis medius
2006_018	M	73	6	06:15	43	C	Gyrus frontalis medius
2006_048	M	70	6	04:50	44	C	Gyrus frontalis medius
2006_051	M	61	5	04:00	33	C	Gyrus frontalis medius
2008_005	M	90	4	04:20	43	B	Gyrus frontalis inferior
2008_047	M	77	6	06:35	n/a	C	Gyrus frontalis medius
2008_075	M	88	4	05:00	n/a	C	Gyrus frontalis medius
2009_040	M	83	6	06:10	n/a	C	Gyrus frontalis medius
2009_053	M	70	4	04:00	n/a	C	Gyrus frontalis medius
2009_059	M	74	6	05:35	n/a	C	Gyrus frontalis medius
2009_072	M	91	4	04:10	n/a	B	Gyrus frontalis medius
2009_107	M	88	5	04:40	n/a	C	Gyrus frontalis medius
2010_004	M	77	5	05:39	n/a	C	Gyrus frontalis medius
2010_011	M	80	4	04:00	n/a	C	Gyrus frontalis medius
2010_016	M	86	5	06:15	n/a	C	Gyrus frontalis medius
2010_051	M	74	6	07:40	n/a	C	Gyrus frontalis medius
2010_068	M	85	4	08:35	n/a	C	Gyrus frontalis medius

Tabelle 8: Überblick über die NBB-Hirnproben von Kohorte II (Braak-Stadien 1-3). Die Charakterisierung umfasst neben der NBB-spezifischen Nummer auch das Geschlecht (weiblich, W bzw. männlich, M), das Alter in Jahren (a), das Braak-Stadium (B&B), die *post mortem* (PM) Verzögerung in Stunden (h), den APOE ϵ Genotyp, den Amyloid-Status sowie die Hirnregion.

NBB-Nummer	W/M	Alter (a)	B&B	PM-Verzögerung (h)	APOE ϵ	Amyloid	Hirnregion
1993 035	W	89	2	04:20	33		Gyrus rectus
1995 097	W	89	1	06:25	43	B	Gyrus frontalis inferior
1995 101	W	73	1	05:30	33		Gyrus frontalis inferior
1996 032	W	60	2	08:25	43		Gyrus frontalis inferior
1996 044	W	90	2	05:50	33	A	Gyrus frontalis superior
1996 051	W	71	2	04:50	43	C	Gyrus frontalis inferior
1996 078	W	87	2	08:00	33		Gyrus frontalis inferior
1996 084	W	78	2	07:30	43		Gyrus frontalis inferior
1998 016	W	82	1	10:45	43	C	Gyrus frontalis superior
1998 089	W	90	1	07:15	22		Gyrus frontalis superior
2000 106	W	88	2	05:40	33	B	Gyrus frontalis inferior
2000 137	W	92	1	07:15	32	B	Gyrus frontalis medius
2000 142	W	82	1	05:30	32	A	Gyrus frontalis inferior
2001 006	W	91	1	05:45	22	B	Gyrus frontalis inferior
2001 029	W	90	1	05:25	32	A	Gyrus frontalis inferior
2001 079	W	90	3	04:45	33	0	Gyrus frontalis inferior
2001 096	W	77	1	05:40	33	B	Gyrus frontalis inferior
2001 139	W	73	2	13:35	43	C	Gyrus frontalis inferior
2002 018	W	92	1	07:00	43	B	Gyrus frontalis inferior
2002 024	W	75	1	05:30	42	B	Gyrus frontalis inferior
2003 006	W	91	3	05:20	32	C	Gyrus frontalis inferior
2004 026	W	91	1	07:45	33	C	Gyrus frontalis inferior
2004 049	W	77	1	08:20	32	C	Gyrus frontalis inferior
2005 083	W	85	1	05:00	33	C	Gyrus frontalis inferior
2006 008	W	85	2	04:40	43	C	Gyrus frontalis inferior
2006 080	W	89	2	06:25	32	C	Gyrus frontalis medius
2007 032	W	87	3	07:20	n/a	C	Gyrus frontalis superior
2008 105	W	89	3	03:52	n/a	C	Gyrus frontalis medius
2009 021	W	99	2	04:15	n/a	C	Gyrus frontalis medius
2009 022	W	77	1	02:55	n/a	C	Gyrus frontalis medius
2009 095	W	71	1	07:10	n/a	C	Gyrus frontalis inferior
2010 007	W	85	2	05:19	n/a	C	Gyrus frontalis medius
2010 015	W	73	1	07:45	n/a	C	Gyrus frontalis medius
2010 039	W	60	1	06:50	n/a	B	Gyrus frontalis inferior
2010 062	W	94	1	05:50	n/a	C	Gyrus frontalis medius
2010 070	W	60	1	07:30	n/a	C	Gyrus frontalis medius
1990 042	M	76	1	06:00	33		Gyrus orbitalis
1991 125	M	61	1	05:40	43		Gyrus rectus
1992 026	M	83	1	06:25	33		Gyrus rectus
1992 029	M	79	2	05:10	33	A	Gyrus orbitalis lateralis
1993 015	M	75	1	04:15	33	B	Gyrus orbitalis
1994 053	M	83	1	08:50	33		Gyrus orbitalis
1994 076	M	78	2	08:25	33		Gyrus orbitalis
1995 093	M	78	1	07:00	33		Gyrus frontalis inferior
1996 085	M	84	1	09:00	33		Gyrus frontalis inferior
1996 125	M	93	3	10:25	43		Gyrus frontalis superior
1997 039	M	87	3	04:00	33	C	Gyrus frontalis inferior
1998 039	M	85	2	04:35	33	B	Gyrus frontalis superior
1998 049	M	87	2	07:25	33	0	Gyrus frontalis superior
2000 030	M	82	2	13:35	33	A	Gyrus frontalis medius
2001 017	M	79	1	07:40	43	A	Gyrus frontalis inferior

2001 021	M	82	1	07:40	33	0	Gyrus frontalis inferior
2001 046	M	88	1	07:25	33	C	Gyrus frontalis inferior
2001 086	M	88	1	07:00	32	0	Gyrus frontalis inferior
2001 094	M	86	2	05:30	43	B	Gyrus frontalis inferior
2004 020	M	96	1	05:23	33	C	Gyrus frontalis inferior
2005 055	M	84	1	07:05	33	C	Gyrus frontalis inferior
2005 060	M	91	1	08:00	33	C	Gyrus frontalis inferior
2005 073	M	87	3	06:05	33	C	Gyrus frontalis inferior
2007 007	M	84	1	05:35	33	C	Gyrus frontalis superior
2007 046	M	89	1	09:20	33	C	Gyrus frontalis superior
2008 032	M	71	2	08:55	n/a	C	Gyrus frontalis medius
2008 103	M	80	1	08:10	n/a	C	Gyrus frontalis medius
2009 001	M	88	2	04:43	n/a	C	Gyrus frontalis medius
2009 003	M	62	1	07:20	n/a	C	Gyrus frontalis medius
2009 039	M	82	3	12:55	n/a	C	Gyrus frontalis medius
2009 075	M	88	3	07:00	n/a	B	Gyrus frontalis inferior

3.1.5 Vitamin D-Analoga

Die in Tabelle 9 aufgeführten Vitamin D-Analoga wurden in HPLC-grade-Ethanol zu Stocklösungen von 1 mM gelöst und zur Inkubation auf Zellen, Hirngewebe oder Membranen herangezogen.

Tabelle 9: In der vorliegenden Arbeit verwendete Vitamin D-Analoga.

Vitamin D Analog	Bezeichnung
Calcifediol	25-hydroxyliertes Vitamin D ₃ -Analog
Alfacalcidol	1-hydroxyliertes Vitamin D ₃ -Analog
Calcipotriol	1,24-hydroxyliertes Vitamin D ₃ -Analog
Doxercalciferol	1-hydroxyliertes Vitamin D ₂ -Analog
Maxacalcitol	1,25-hydroxyliertes Vitamin D ₃ -Analog
Paricalcitol	1,25-hydroxyliertes Vitamin D ₂ -Analog

3.1.6 Lipide

Die in Tabelle 10 aufgelisteten Lipidspezies wurden im Rahmen dieser Arbeit in einer finalen Konzentration von 10 μ M zur Inkubation auf Zellen verwendet. Auf Grund der limitierten Löslichkeit derjenigen 1,2-Diacyl-Phosphatidylcholine- (PCaa-) Spezies, die sehr langkettige Fettsäuren (VLCFAs) enthalten, wurden alle Phospholipide einheitlich in vorgewärmtem Ethanol (37 °C) in einer Konzentration von 2 mM gelöst und langfristig in Glasfläschchen in flüssigem Stickstoff gelagert.

Tabelle 10: In der vorliegenden Arbeit verwendete Phospholipide.

Lipidspezies	Bezeichnung
PC10:0/10:0	1,2-Di-decanoyl-sn-glycero-3-Phosphocholin
PC12:0/12:0	1,2-Di-lauroyl-sn-glycero-3-Phosphocholin
PC14:0/14:0	1,2-Di-myristoyl-sn-glycero-3-Phosphocholin
PC16:0/16:0	1,2-Di-palmitoyl-sn-glycero-3-Phosphocholin
PC18:0/18:0	1,2-Di-stearoyl-sn-glycero-3-Phosphocholin
PC20:0/20:0	1,2-Di-arachidoyl-sn-glycero-3-Phosphocholin
PC22:0/22:0	1,2-Di-behenoyl-sn-glycero-3-Phosphocholin
PC24:0/24:0	1,2-Di-lignoceroyl-sn-glycero-3-Phosphocholin

3.1.7 Antikörper

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit für proteinbiochemische Analysen verwendeten Antikörper können Tabelle 11 entnommen werden. Die spezifischen, für den immunologischen Proteinnachweis gewählten, Blockier- und Inkubationsbedingungen sind in Tabelle 19 aufgeführt.

Tabelle 11: In der vorliegenden Arbeit verwendete Antikörper.

Bezeichnung	Epitop	Klonalität	Verwendung	Hersteller / Quelle
67106-1-Ig	IDE	monoklonal	IDE-Western Blot	Proteintech
A5441	β -Aktin	monoklonal	Detektion von β -Aktin als Ladekontrolle	Merck (ehemals Sigma-Aldrich)
ab1801	β -Aktin	polyklonal	Detektion von β -Aktin als Ladekontrolle	abcam
ab2077	BACE1	polyklonal	BACE1-Western Blot	abcam
Mbs492139	sAPP β (C-Terminus)	polyklonal	sAPP β -Western Blot	MyBioSource
P0260	Maus-IgG	polyklonal	HRP-gekoppelter Sekundärantikörper für Western Blot	DAKO
sc-7860	N-Terminus von Presenilin 1 (Aminosäuren eins bis 70)	polyklonal	Presenilin1-Western Blot	Santa Cruz Biotechnology
ST1120	N-Terminus von IDE	polyklonal	IDE-Western Blot und -Enzymaktivitätsmessung	Merck Millipore
W02	APP (Aminosäuren fünf bis zehn der humanen A β -Sequenz)	monoklonal	A β -Immunpräzipitation, APP- und A β -Western Blot	Hergestellt in AG Hartmann-Multhaup-Beyreuther (Heidelberg, Deutschland) (IDA et al., 1996)
W4011	Kaninchen-IgG	polyklonal	HRP-gekoppelter Sekundärantikörper für Western Blot	Promega

3.1.8 Kommerzielle Kits

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten kommerziellen Kits können Tabelle 12 entnommen werden.

Tabelle 12: In der vorliegenden Arbeit verwendete kommerzielle Kits.

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
<i>Cytotoxicity Detection Kit</i>	Laktatdehydrogenase (LDH) -Analyse	Roche
<i>EndoFree Plasmid Maxi-Kit</i>	Isolierung von Plasmid-DNS aus transformierten Bakterien	Qiagen
<i>Extracellular Oxygen Consumption Assay</i>	Messung des Sauerstoffverbrauchs von Zellen	Abcam
<i>High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit</i>	Synthese komplementärer DNS im Rahmen von Genexpressionsanalysen	Thermo Fisher Scientific
<i>Human Aβ40 ELISA Kit</i>	Detektion von löslichem A β 40 in Zellkulturüberständen	Thermo Fisher Scientific
<i>Human IL-1 beta ELISA Kit</i>	Detektion des Zytokins IL-1 β in Zellkulturüberständen	Abcam
<i>PCR Mycoplasma Test Kit I/C</i>	regelmäßiger Ausschluss einer Mykoplasmen-Kontamination der verwendeten Zelllinien	PromoKine
<i>Saint-PhD</i>	Reagenz zur Transfektion von Proteinen und Peptiden (Inkubation von AICD)	Synvolux Therapeutics
<i>Secrete-Pair Dual Luminescence Assay Kit</i>	IDE-Promotor-Aktivitätsmessung	GeneCopoeia

3.1.9 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 13 aufgelistet.

Tabelle 13: In der vorliegenden Arbeit verwendete Plasmide.

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
pcDNA TM 3.1/Zeo ⁽⁺⁾ APP ⁶⁹⁵	Überexpression von APP ⁶⁹⁵	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Stefan Kins (TU Kaiserslautern)
pcDNA TM 3.1/Zeo ⁽⁺⁾ APP ⁷⁵¹	Überexpression von APP ⁷⁵¹	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Stefan Kins (TU Kaiserslautern)
pcDNA TM 3.1/Zeo ⁽⁺⁾ APP ⁷⁷⁰	Überexpression von APP ⁷⁷⁰	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Stefan Kins (TU Kaiserslautern)
pEZX-PG04-IDE-GLuc	IDE-Promotor-Aktivitätsmessung in N2a-WT-Zellen	GeneCopoeia
pVectOZ-SEAP	Messung der SEAP-Sekretion durch N2a-WT-Zellen	OZ-Biosystems
SureSilencing IDE-shRNS Plasmid	Generierung stabiler MEF-IDE-KD-Zellen	SABiosciences

3.2 Methoden

3.2.1 Mikro- und molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Chemokompetente Bakterien

(nach (HANAHAN, 1983))

Das Ziel dieser Methode ist das Einbringen einer Chemokompetenz in *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 α -Zellen, wodurch diese Bakterien die Fähigkeit bekommen, fremde DNS aus dem Medium aufzunehmen beziehungsweise transformiert zu werden.

Eine *E. coli* DH5 α -Kultur wurde herangezogen, um einen Verdünnungsausstrich auf einer LB-Agarplatte anzufertigen, von welchem nach Inkubation über Nacht bei 37 °C ein Einzelklon gepickt werden konnte, welcher in 2 ml LB-Medium für sechs bis acht Stunden bei 37 °C und 100 U/min inkubiert wurde, bis eine deutliche Trübung erkennbar war. Diese Vorkultur wurde anschließend in 200 ml vorgewärmtes LB-Medium überführt und bis zu einer OD₆₀₀ = 0,5, welche photometrisch bestimmt wurde, bei 37 °C und 100 U/min inkubiert. Das durch zehninütige Zentrifugation bei 7000 x g und 4 °C in autoklavierten Zentrifugenröhrchen (Nalgene) entstandene Bakterienpellet wurde in 12,8 ml kaltem TFB1-Puffer resuspendiert und 90 min auf Eis inkubiert. Nach wiederholter Zentrifugation erfolgte das Resuspendieren des Bakterienpellets in 1,28 ml kaltem TFB2-Puffer und die Bakteriensuspension wurde in 100 μ l-Aliquots auf sterile 1,5 ml-Reaktionsgefäße verteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

LB (engl. *lysogeny broth*) – Medium für DH5 α -Zellen:

0,5 % (w/v) NaCl
 1 % (w/v) Bacto-Trypton
 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt in ddH₂O
 einstellen des pH-Wertes auf 7,0 mit HCl, autoklavieren, zugeben von 100 μ g/ml Ampicillin oder 50 μ g/ml Kanamycin B

LB (engl. lysogeny broth) – Agarplatten für Bakterien:

LB-Medium (siehe oben)
 1,5 % (w/v) Agar
 in Petrischalen gießen und aushärten lassen

TFB1-Puffer:

100 mM RbCl
 50 mM MnCl₂
 30 mM CH₃CO₂K
 10 mM CaCl₂
 15 % Glycerin in ddH₂O
 einstellen des pH-Wertes auf 5,8 mit Essigsäure, sterilfiltrieren und bei 4 °C lagern

TFB2-Puffer:

10 mM MOPS
 10 mM RbCl
 75 mM CaCl₂
 15 % Glycerin in ddH₂O
 einstellen des pH-Wertes auf 8,0 mit NaOH, autoklavieren und bei 4 °C lagern

3.2.1.2 Retransformation chemokompetenter Bakterien mit Plasmid-DNS

(nach (SAMBROOK et al., 1989))

Diese Methode dient der bakteriellen Amplifizierung von Plasmid-Desoxyribonukleinsäure (DNS), welche später unter anderem zur Transfektion humaner Zellen verwendet werden kann.

Dem langsamen Auftauen der zuvor generierten und bei -80 °C gelagerten chemokompetenten *E. coli* DH5 α -Zellen folgte nach Zugabe von circa 100 ng der zu amplifizierenden Plasmid-DNS eine 20-minütige Inkubation auf Eis. Als Negativkontrolle diente eine Probe, welche bis auf den Schritt der DNS-Zugabe identisch behandelt wurde. Das Einbringen der Plasmid-DNS in die Bakterien erfolgte mittels Hitzeschock für 90 Sekunden bei 42 °C im Wasserbad. Der Transformationsansatz wurde in 1 ml LB-Medium, versetzt mit 10 mM Kaliumchlorid (KCl) und 4 mM Magnesiumsulfat (MgSO₄), resuspendiert und die Bakterienkultur für eine Stunde bei 37 °C und 220 rpm kultiviert. Anschließend wurden die Bakterienzellen in ein steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und durch zweiminütige Zentrifugation bei 4000 x g und 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 200 μ l Natriumchlorid (NaCl) aufgenommen und sowohl verdünnt als auch unverdünnt auf eine je nach Antibiotikum-Resistenz des verwendeten Plasmids entweder Ampicillin- oder Kanamycin-haltige Agarplatte ausgestrichen. Die Endkonzentration des verwendeten Selektionsantibiotikums betrug für Ampicillin 100 μ g/ml und für Kanamycin 50 μ g/ml. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden einzelne Klone der entstandenen Bakterienkolonien zum Animpfen einer Vorkultur, bestehend aus 2 ml Antibiotika-versetztem LB-Medium, verwendet. Nachdem diese Vorkultur für sechs Stunden bei 37 °C und 220 U/min inkubiert wurde, diente sie zum Animpfen einer Übernacht-Kultur in 250 ml antibiotika-versetztem LB-Medium. Diese wurde über Nacht bei 37 °C und 220 U/min inkubiert, wobei es auf Grund der geringen Verdopplungszeit von DH5 α -Zellen zu einer Amplifizierung der Plasmid-DNS kam, welche am folgenden Tag isoliert werden konnte (Kapitel 3.2.1.3).

Zur Stammkonservierung transformierter *E. coli* DH5 α -Kulturen wurde 1 ml der trüben Kultur in Kryoröhrchen mit 20 % Glycerin (v/v) aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.2.1.3 Isolation von Plasmid-DNS aus transformierten Bakterien

(nach Herstellerprotokoll *Endo Free[®] Qiagen Plasmid Maxi Kit*, Version Dezember 2016)

Das *Endo Free[®] Qiagen Plasmid Maxi Kit* wurde nach Herstellerangaben verwendet und ermöglichte eine schnelle, auf Anionenaustausch basierende Endotoxin-freie Isolation von Plasmid-DNS, deren Reinheit für folgende Transfektionsanwendungen geeignet war. Das effiziente Entfernen der Zellmembran-Komponenten Gram-negativer Bakterien (Endotoxine), die während der Lyse der Bakterien freigesetzt werden, ist in diesem Kit durch spezielle Filtereinheiten inkludiert und für die spätere Transfektion von Zellkulturen von Wichtigkeit.

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der isolierten DNS erfolgte mittels *NanoDrop 8000* UV-Vis-Spektrophotometer. Die gemessene Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm (Extinktionsmaximum von Nukleinsäuren) lässt die Berechnung der Konzentration der isolierten DNS zu, da eine Extinktion $E = 1$ bei doppelsträngiger DNS einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ entspricht. Da Proteine ihr Extinktionsmaximum bei 280 nm und organische Verbindungen sowie chaotrope Substanzen ihres bei 230 nm haben, geben die gemessenen 260/230- und 260/280-Quotienten Auskunft über das Maß an Verunreinigungen durch Proteine oder organische Verbindungen. Ein 260/280-Quotient von 2,2 entspricht reiner DNS und in dieser Arbeit wurde nur isolierte DNS mit einem 260/280-Quotienten größer 2,0 verwendet. Die DNS wurde mit endotoxin-freiem TRIS-EDTA-(TE-)Puffer, welcher Bestandteil des verwendeten *Endo Free[®] Qiagen Plasmid Maxi Kits* ist, auf 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt und bei -20 °C gelagert.

3.2.1.4 Isolation von Gesamt-Ribonukleinsäure (RNS) aus Zellen und Gewebe

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

Die Isolation der Gesamt-RNS erfolgte mittels *TRIzol*-Reagenzes, einer monophasischen Lösung aus Phenol und dem chaotropen Denaturierungsreagenz Guanidin-Isocyanat, in welcher die Zellen abgeschabt wurden. Nach Zugabe von Chloroform und Homogenisierung der Proben resultierte die anschließende Zentrifugation in der Bildung zweier Phasen sowie einer Interphase. In der unteren, organischen, Phenol-Chloroform-Phase befinden sich denaturierte Proteine, während sich die polare RNS in der oberen, wässrigen, Phase löst. Auf Grund des sauren pH-Wertes des Phenols (pH 4,8) reichert sich die sonst ebenfalls in der wässrigen Phase befindliche DNS in der organischen und Protein-Interphase an.

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der isolierten RNS erfolgte mittels *NanoDrop 8000* UV-Vis-Spektrophotometer (DESJARDINS, CONKLIN, 2010). Die gemessene Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm (Extinktionsmaximum von Nukleinsäuren) lässt die Berechnung der Konzentration der isolierten RNS zu, da eine Extinktion $E=1$ bei RNS einer Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$ entspricht. Auch hier geben die Quotienten aus den Wellenlängen 260/230 und 260/280 Auskunft über die Reinheit der isolierten RNS (Kapitel 3.2.1.3), wobei dieses Verhältnis bei reiner RNS bei ungefähr 1,8 beziehungsweise 2,0 liegt.

3.2.1.5 Synthese komplementärer DNS (cDNS)

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

Um mittels Genexpressionsanalyse Aussagen über die quantitative Transkription eines spezifischen Gens treffen zu können, muss die zuvor isolierte RNS in komplementäre DNS umgeschrieben werden. Dies erfolgte in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe des *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* von *Life Technologies* nach Angaben des Herstellers in einem *PRIMUS 25 Advanced PCR*-Zyklus.

Ansatz für die Synthese der cDNS:

10 µl	RNS (eingestellt auf 0,2 µg/µl)
2 µl	10x RT-Puffer
0,8 µl	25x dNTP Mix (100 mM)
2 µl	10x RT Random Primer
1 µl	<i>Multiscribe Reverse Transkriptase</i>
4,2 µl	Nuklease-freies Wasser

Zyklus-Programm für die Synthese der cDNS:

<u>Schritt</u>	<u>Dauer</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Zyklen</u>
1	10 min	25 °C	1
2	120 min	37 °C	1
3	5 min	85 °C	1
4	unendlich	4 °C	/

Die synthetisierte cDNS wurde in einem finalen Schritt im Verhältnis 1:10 mit nuklease-freiem Wasser verdünnt und bei -20 °C gelagert.

3.2.1.6 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

(nach Protokoll *Fast SYBR Green Master Mix Kit*, Thermo Fisher Scientific und (GRÖSGEN, 2013))

Bei der qRT-PCR handelt es sich um eine Methode, mit welcher das Expressionsniveau von Genen quantitativ bestimmt werden kann. Es werden spezifische Gensequenzen der aus RNS-Isolation (Kapitel 3.2.1.4) und reverser Transkription (Kapitel 3.2.1.5) gewonnenen cDNS amplifiziert, was durch die Verwendung Gen-spezifischer Primer ermöglicht wird (GIBSON et al., 1996; NOLAN et al., 2006).

In dieser Arbeit wurde der *Fast SYBR green Master Mix* auf einem *PikoReal Real-Time PCR System* verwendet. Der Master Mix enthält neben der *AmpliTaq®Fast* DNS-Polymerase und Deoxynukleotiden auch den *SYBR®green I* Fluoreszenzfarbstoff, der mit doppelsträngiger DNS interagiert und so zu deren Nachweis dient (ZIPPER et al., 2004). Die herangezogenen Primer für murine und humane Proben sind in den Tabellen 14 und 15 aufgelistet.

Tabelle 14: Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten murinen Primer. Die verwendeten *housekeeping* Gene (HKG) sind hervorgehoben.

Gen	<i>forward</i> Primer (5' → 3')	<i>reverse</i> Primer (5' → 3')
<i>A2m</i>	GACGCAGGGACACAAGAAAG	TCCATTGGGCAGAATGGTAT
<i>Aass</i>	ACGGGAGGGTCCATAGATTT	GGAGCCTTCAACACTGTCTG
<i>Abca1</i>	CATGAAGGTTGCTGTGGATG	TTGACATGGTGGTGGTCTTC
<i>Acat1</i>	GCTGCAGGAAGTAAGATGCC	GGAAGGATCCAATGGGAGTT
<i>Acat2</i>	CCCGTCATGGGAGTAACCT	ATCGTTCATTCTGATGCGT
<i>Acat3</i>	TGGGCAAGCTGAAACCTTAC	CATAAGGACCACAGCAGCAG
<i>Ache</i>	GCAGCAATATGTGAGCCTGA	AGTATCGGTGGCGCTGAG
<i>Ace</i>	CCTGAGTTCTGGAACAAGTCG	TTGATCCTGAAGTCCTTGCC
<i>Actb</i>	CCTAGGCACCAGGGTGTGAT	TCTCCATGTCGTCCCAGTTG
<i>Adam9</i>	AAGCTGCCTGCTTAACATCC	ACCTCACACTCCTTCGCTGT
<i>Adam17</i>	TGACATCAAGTACCGAACGC	GAGTCAGGCTCACCAACCAC
<i>Als2</i>	CTCTTCAATGATGCCCTGGT	CCATTACGCTACCAGCTTC
<i>Apba1</i>	AGCCAATGACTGAGGTGGAC	GGAAATGGTCTCAGAGGGT
<i>Apba3</i>	GTAGGGAGGTTTGCATCCAG	AGCAGGTTGGCAATGACC
<i>Apbb1</i>	TGCATGAGATCTGCTCCAAG	TTCCACTTGAAAGGGACAT
<i>Apbb2</i>	ATCGTGAACATCCGAGTGTG	GTCACATCGAAACACATGGC
<i>Aph1a</i>	ACAAGCTCCTTAAGAAGGCAGA	CCGAAGGACAGACCAGAAAC
<i>Aph1b</i>	GCTGTTCAAGGCTCGCATATT	AGAAACATAGGCCAACAGTCG
<i>Aph1c</i>	CTCATCGCTGGTGTCTTCTT	AGAAACATACGCCAACAGTCG
<i>Aplp2</i>	TGTTAAAGCTGTCTGCTCCCA	TAAAGCGTACGCACTTTCCC
<i>Apoa1</i>	GCCAACAGCTGAACCTGAAT	CAGAAGTCCCGAGTCAATGG
<i>Apoe</i>	CTGAACCGCTTCTGGGATTA	GTGCCGTCAGTTCTTGTGTG
<i>App</i>	CCGTTGCCTAGTTGGTGAGT	GTGCCAGTGAAGATGGGTCT
<i>Appbp1</i>	CTGCTGCTGTAGGCAATCAC	ACCACTCGAAGAAATGCAGAA
<i>Atp5b</i>	GGATCTGCTGGCCCCATAC	CTTTCCAACGCCAGCACCT
<i>Bace1</i>	ACATTGCTGCCATCACTGAA	TCCAAGAAGGGCTCCAAAGA
<i>Bace2</i>	GCATGCTGGACAAATTCTGA	TGTAGAGCTGTGGGAGAATGG
<i>Bche</i>	ATTTCCCTGGAGTGAGCAGA	CCAAAGCGTCACGGTAGACT
<i>Bdnf</i>	AGGACGCGGACTTGTACTACT	CATAGACATGTTTGCGGCAT
<i>Casp3</i>	ACGCGCACAAAGCTAGAATTT	CTTTGCGTGGAAAGTGGAGT
<i>Casp4</i>	TGGTGGTGAAAGAGGAGCTT	GCCATGAGACATTAGCACCA
<i>Cat</i>	AACTGGGATCTTGTGGGAAA	TGTGGGTTTCTCTTCTGGCT
<i>Cdc2</i>	AGGAAGAAGGAGTGCCAGT	TACAGCCTGGAGTCCTGCAT
<i>Cdk5</i>	GTCCATCGACATGTGGTCAG	GTGTCCCTAGCAGTCGGAAG
<i>Cdkl1</i>	GCATGCTCAAGCAACTCAAG	TCGCAGTACTCGAACACCAG
<i>Chat</i>	ACTCCTGAGGCTCTGGCTTT	GTACTIONTGGGCCTGGA
<i>Clu</i>	CTGTGTGCAAGGAGATCCG	TGGTTGAACAGTCCACAGACA
<i>Ctsb</i>	AAGCTGTGTGGCACTGTCCT	ATTGTTCCCGTGCATCAAAG
<i>Ctsl</i>	ACATCCAAATGCGAGAAAGG	CAGCTGCAGAAGCATGATGT
<i>Ctsl</i>	AAGGGTTGTGTGACTCCTGTG	TGCCGGTCTTAAGGAACATC
<i>Duox1</i>	AAGGGCTGAAGATGTGGATG	AGGCCAGAAATCTTGCATGT
<i>Ecel</i>	GATCAAGGTCGGGAGTACGA	GTATTGCTGCACCATGCACT
<i>Ece2</i>	GGTGCTGAGTGAGGTAAGCC	GACCAGTCATAACGGGATTGA
<i>Ep300</i>	CTTCCACTCCGCTTTCTCAG	GCTGCTTCTCAGGAATGGTC
<i>Epx</i>	GTCCAGATCATCACCTACCGA	CCACATTGGAGCAATACCCT
<i>Ercc2</i>	TACCCGGAGCAGTTCTCCTA	GGACACTGTCTTCCAGTGC
<i>Ercc6</i>	CAGTCCAGGCAGATGCTACA	TGTAATCAGCGCTGTCTTG
<i>Ern1</i>	GTGATCACTCCCAGCACAGA	CATGGTGTCTATGAGAAGCC
<i>Gab1</i>	AGCCTGAACCTAACAGAACC	GAGGAAGCAGGAGTCTGGTG
<i>Gap43</i>	TTGCTGATGGTGTGGAGAAG	AAGGTGCATCTCTGCCTT
<i>Gnao1</i>	GACAAGGAGAGGAAGACGGA	AGTCGCATCATGGCAGAAA

<i>Gnb1</i>	TGTTTCCTTCTCCAAGAGTGG	CCAGCTAAGACACCTGCTCTG
<i>Gnb2</i>	ACTAACAAAGGTCCACGCCAT	AGCAGATGTTGTCCAAACCC
<i>Gnb4</i>	TTGTGATGCATCCTCAAAGC	CTCGGGAAGAACTGACAGC
<i>Gnb5</i>	GAAGACCAGAAGGACCCTCA	ATCACCTTCCCATCCTGTGA
<i>Gpx1</i>	GTTCCGGACACCAGGAGAATG	TTCTCACCATTCACTTCGCA
<i>Gpx2</i>	GGGCTGTGCTGATTGAGAAT	GACAGTTCTCCTGATGTCCGA
<i>Gpx3</i>	GGCTTTGTGCCTAATTTCCA	GTGAGCCCAGGAGTTCTGC
<i>Gpx5</i>	ATGCACTCCAGGAGGATCTG	CCTGGACGAACATACTTGAGC
<i>Gpx6</i>	TGAGTATGGAGCCAACACCA	TGTGTTTCACTCAGGGTACG
<i>Gpx7</i>	ACTTCAAGGCGGTCAACATC	CTGTGAAGCCACATTTCGTA
<i>Gsk3a</i>	GGAGCCCAATGTGTCCTACA	GCTCAGCAAGTACACAGCCA
<i>Gsk3b</i>	GACTTTGGAAGTGCAAAGCAG	CGTGTAATCAGTGGCTCCAA
<i>Hadh2</i>	GGCCAACGTGGAGTTATCAT	CAGTGTGTCATGCCACTATGC
<i>Hdac1</i>	TCTGACCATCAAAGGACACG	AACATTCCGGATGGTGTAGC
<i>Hmger</i>	ATCGAGCCACGACCTAATGA	TAAGCTGGGATATGCTTGGC
<i>Ide</i>	GCTACGTGCAGAAGGACCTC	TGGACGTATAGCCTCGTGGT
<i>Idh1</i>	GCTTCATCTGGGCCTGTAAG	TGGACAAATCAGCACACTGG
<i>Il1a</i>	CCCATGATCTGGAAGAGACC	TGACAAACTTCTGCCTGACG
<i>Ins</i>	AGAGGCTCTCTACCTGGTGTGT	CCTCCCAGCTCCAGTTGTT
<i>Insr</i>	TCTTCGAGAACGGATCGAGT	TTGGCTGTCCTTTGGATACC
<i>Lpl</i>	GATGCCCTACAAAGTGTTC	CCACTGTGCCGTACAGAGAA
<i>Lrp1</i>	CAGCTCACTGTGAAGGCAAG	GGTACAGTCCTTGTGCCAT
<i>Lrp6</i>	GGCAGCCAAATGCTACAAAT	TGGGCAAGCACACTGATAAA
<i>Map2</i>	TGGCTCTCTAAAGAACATCCG	CAGGTACGTGGTGTGATTG
<i>Mapt</i>	TCAGGTCGAAGATTGGCTCT	CACACTTGGACTGGACGTTG
<i>Mmp2</i>	GACAAGTGGTCCGCGTAAAG	ATCACTGCGACCAGTGTCTG
<i>Mmp9</i>	CATGCACTGGGCTTAGATCA	GCTTAGAGCCACGACCATA
<i>Mpo</i>	CTCAAGATCCCACCCAATGA	TTGCGAATGGTGTGTTGTT
<i>Mpp4</i>	AAGTGTGTGCCACATACCA	TCCGTACATGAGGCTTTCAA
Mpr1p	GGCTGGCTAACCAAGCAGTA	TCTAGGTCAGCTGCCTCCTC
<i>Ncstn</i>	TGCTCTATGGGTTCTTGTT	CGGCGATGTAGTGTGAAGA
<i>Nep</i>	ATGGAGACCTCGTTGACTGG	TTCCATTGAGATGCTGTCCA
<i>Nqo1</i>	GCCGATTCAGAGTGGCAT	CATCCTTCCAGGATCTGCAT
<i>Nudt15</i>	TTTGGAAATTCGGTGAGACCT	AAGAATTTACCACGGAGGCA
<i>Park7</i>	GCCATCTGTGCAGGTCCTA	GCGGCTCTCTGAGTAGCTGTA
<i>Pkp4</i>	CAAACACTGGTTCAGCCATC	CGCCTGTGCTGGTAACATAA
<i>Plat</i>	GCTGAGTGCATCAACTGGAA	CTGGGTTTCTGCAGTAATTGTG
<i>Plau</i>	CCAGAAGAACAAGGGAGGAA	TTTGGGAGTTGAATGAAGCA
<i>Plg</i>	GGTGGGAATACTGCAACCTG	GCAGTCTGTCTCAGAGTCGCT
Polr2f	AAGCGGATCACCCTCTTA	TGAGCAAAGGGTCTGTCTCC
<i>Ppp1r15b</i>	TGAATCAGACGTGGAACAGG	CGTCTGAATCGTGGCTGTAA
<i>Prdx1</i>	CACCCAAGAAACAAGGAGGA	CTTCATCAGCCTTTAAGACTCCA
<i>Prdx2</i>	TAGCGACCATGCTGAGGACT	TATTGATCCACGCCAGGTG
<i>Prdx6</i>	GGGCAGGAACTTTGATGAGA	GCTCTCTCCCTTCTTCCAGTC
<i>Prkaa1</i>	TGTTCCAGCAGATCCTTTCC	TTGAAAGACCAAAGTCGGCTA
<i>Prkaa2</i>	ATGCCCAGATGAACGCTAAG	ACCTGCATACAGCCTTCTCTG
<i>Prkca</i>	GGCGGATTTATCTGAAGGCT	ATAAGGATCCGAAAGCCCAT
<i>Prkcb1</i>	GAGATCTGGGATTGGGACCT	AACTTGAACCAGCCATCCAC
<i>Prkcd</i>	GGGACACCATCTTCCAGAAA	AAACTGCCACAGTGGTCACA
<i>Prkce</i>	AGCTTTGGCAAGGTCATGTT	GTGCAGTCCACATCATCGTC
<i>Prkcg</i>	GTTCCGTCTGCACAGCTACA	CTCGCAACAGGAACATTTCA
<i>Prkcl</i>	CACCCTCAAACCTGGATTTGC	TTTGGTTTAAAGGGTGGAAAC
<i>Prkcq</i>	GCCTGAACAAGCAGGGTTAC	TATTGATTGCGGATCCTGTG
<i>Prkcz</i>	ATAGACTGGGACCTGCTGGA	TGGTGAACCTGCGTGTCAAAG

<i>Prnp</i>	CGAGACCGATGTGAAGATGA	CTGGATCTTCTCCCGTCGTA
<i>Psen1 (1)</i>	ACCCGGAGGAAAGAGGAGTA	TGGTTGTGTTCCAGTCTCCA
<i>Psen1 (2)</i>	AAACAGCCCTGCACTCGAT	TGGTTGTGTTCCAGTCTCCA
<i>Psen2</i>	TCATGCTATTTTCGTGCCTGTC	GTGTAGATGAGCTGCCCGTT
<i>Psenen2</i>	ATCTTGGTGGATTTGCGTTC	CCTTTGATTTGGCTCTGCTC
<i>Psmb5</i>	CAGATCTGCTGGACTTGGGT	AGAAACTTGAAGGCCAGGGT
<i>Serpina3a</i>	GCCCAGGATGCTAGATGAAC	CAGTGATCCCAGACAGGTCA
<i>Snca</i>	GGAGTGACAACAGTGGCTGA	GCTCCCTCCACTGTCTTCTG
<i>Sncb</i>	CAGACCTGAAGCCAGAGGAG	CTCTGGCTCGTATTCTGGT
<i>Sod1</i>	CGTACAATGGTGGTCCATGA	AATCCCAATCACTCCACAGG
<i>Tpo</i>	CCCATACAGCTTCCCTCAA	CCAAAGAGAGCACCTTGGTC
<i>Txnip</i>	GCAGCAGGTCTGGTCTGAG	TAGCAAGGAGGAGCTTCTGG
<i>Txnrd2</i>	GGCACCTTTGACACTGTCCT	CCTGGGCATCCACAATAATC
<i>Ubqln1</i>	CACCGATATCCAGGAGCCTA	GCTGAGTCCCTTCTGCTGAG
<i>Ucp3</i>	AAGACCCGATACATGAACGC	GGGCACAAATCCTTTGTAGAAG
<i>Uqcr1</i>	GTGGTGGAGTGCACCTGTC	CCAGCAGCCCAGTATCAGAG
<i>Uqcr2</i>	CAAAGGAAGTCACCAGCCTT	GCATTGATAACCTCTCCAGCA
<i>Xpa</i>	TGAACCACTTTGATCTGCCA	AGCGCTGGCTCTCTCTTCT

Tabelle 15: Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten humanen Primer. Die verwendeten *housekeeping* Gene sind fett geschrieben.

Gen	<i>forward</i> Primer (5' → 3')	<i>reverse</i> Primer (5' → 3')
<i>ACTB</i>	CTTCCTGGGCATGGAGTC	AGCACTGTGTTGGCGTACAG
<i>APP</i>	GGCAGTTATCCAGCATTTC	ATTGAGCATGGCTTCCACTC
<i>BACE1</i>	GCCTATGCTGAGATTGCCAGG	GGAGAAGAGGTTGGGAACGTG
<i>C50</i>	AAACAGTACACATCCATCCAT	CTAGTTCTGCATTTGCTCAAAG
<i>IDE</i>	TGCCCTAGACAGGTTTGCAC	CTCCAGGCATCATTATCACAT
<i>IL-34</i>	AATCCGTGTTGTCCCTCTTG	CAGCAGGAGCAGTACAGCAG
<i>NCSTN</i>	CTGTACGGAACCAGGTGGAG	GAGAGGCTGGGACTGATTG
<i>NEP</i>	GATCAGCCTCTCGGTCCTTG	TGTTTTGGATCAGTCGAGCAG
<i>PGC-1α</i>	GTTCAAGATCGCCCTACAGC	CCCTCTCAGACTCTCGCTTC
<i>RN18S1</i>	GGAGTATGGTTGCAAAGCTGA	ATCTGTCAATCCTGTCCGTGT
<i>TBP</i>	CGGAGAGTTCTGGGATTGT	GGTTCGTGGCTCTCTTATC

Die Verwendung von mindestens zwei HKG wurde favorisiert, um zufällige Unterschiede in der Amplifikationseffizienz ausschließen zu können. Durch Anwendung der *Normfinder*-Software wurde eine Rangfolge von 19 ausgewählten HKG, die häufig in der Literatur verwendet werden, erstellt und anhand derer die stabilsten HKG für die Normalisierung ausgewählt (PENNA et al., 2011). Die Genexpression wurde auf die Expression der HKG normalisiert und relative Änderungen mit Hilfe der $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ Methode quantifiziert (LIVAK, SCHMITTGEN, 2001). Dabei beschreibt der Schwellenwert (Ct-Wert, *Threshold Cycle* oder auch Cq-Wert, *Quantification Cycle*) den Zyklus, bei welchem die Menge an amplifiziertem Produkt einen definierten Schwellenwert überschreitet. Durch spezifische Primer, welche mit einem Programm der Firma *GenScript* selbst konzipiert wurden, wurde die Länge der Amplifikate auf ein Maximum von 150 Basenpaaren begrenzt. Unter diesen Bedingungen liegt die Amplifikationseffizienz nahezu bei eins und somit konnte die Formel $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ für die Menge an Amplifikat, welches auf die endogene HKG-Expression normiert und in Relation zur Kontrolle gesetzt wurde, angewendet werden.

Zusammensetzung der Real-Time PCR-Reaktionsansätze:

2,5 µl	cDNS-Lösung (3.2.1.5)
0,25 µl	<i>forward</i> Primer (10 µM)
0,25 µl	<i>reverse</i> Primer (10 µM)
2 µl	ddH ₂ O
5 µl	<i>Fast SYBR Green Master Mix</i>

Real-Time-PCR-Programm:

<u>Schritt</u>	<u>Dauer</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Zyklen</u>
1: Aktivierung Polymerase, Denaturierung DNS	20 s	95 °C	1
2: Denaturierung	3 s	95 °C	40
3: Annealing / Elongation	30 s	60 °C	
4: Schmelzkurvenanalyse		60-95 °C	1

3.2.1.7 IDE-Promotor-Aktivitätsmessungen mittels Luciferase-Analyse

(nach Herstellerprotokoll *Secrete-Pair Dual Luminescence Assay Kit*, GeneCopoeia, Version 2013 und (METT, 2017))

Die Methode der Promotor-Aktivitätsmessung wurde von Dr. Janine Mett basierend auf den Herstellerprotokollen des *Secrete-Pair Dual Luminescence Assay Kit* (GeneCopoeia; Version 2013) beziehungsweise *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega; Juni 2011) im Labor der Experimentellen Neurologie etabliert. Sie umfasst die indirekte Detektion der Promotoraktivität durch ein Reporterenzym, dessen Transkription unter der Kontrolle des zu analysierenden Promotors steht. Auf dem verwendeten Plasmid befindet sich ebenfalls ein zweites Reporter-gen (Standardreporterenzym), welches durch einen konstitutiv aktiven Promotor reguliert wird und daher die Normierung auf Schwankungen in der Transfektionseffizienz ermöglicht (ALAM, COOK, 1990). Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte IDE-Promotoraktivitätsanalyse wurden unterschiedliche MEF-Zellen transient mit dem dualen Reportersystem Vektor pEZX-PG04-IDE-GLuc (Tabelle 13) transfiziert. Hierbei agierte das *Gaussia* Luciferase-Gen (*GLuc*) als Reporter-gen, dessen Expression durch die IDE-Promotorregion reguliert ist. Zudem wurde das Gen, welches die Sekretorische Alkalische Phosphatase (SEAP) kodiert, konstitutiv durch den Cytomegalovirus-(CMV-)Promotor exprimiert und diente als Standardreporterenzym. 48 Stunden nach der transienten Transfektion (Kapitel 3.2.2.3) wurde das *Secrete-Pair Dual Luminescence Assay Kit* herangezogen, um die Aktivitäten von GLuc und SEAP im konditionierten Medium zu analysieren. Die Detektion der Lumineszenz erfolgte in einem Infinite M1000Pro-Fluorometer/Luminometer mit einer Integrationszeit von 500 ms. Um Varianzen in der Zellkonfluenz oder der Transfektionseffizienz zu eliminieren, wurde für jede Probe das Signal der Gluc-Aktivität auf das Signal der SEAP-Aktivität normalisiert.

3.2.2 Zellbiologische Methoden

3.2.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

(nach (FRESHNEY, 2011))

Die Arbeiten an den in Tabelle 4 aufgelisteten eukaryotischen Zellen wurde in einer Sterilwerkbank mit zirkulierendem Luftstrom unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte in Zellkulturschalen (10 cm) in 10 ml entsprechendem Zellkulturmedium bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit.

Je nach individuellem Wachstumsverhalten wurden die Zellen zwei- bis dreimal pro Woche nach Erreichen einer Konfluenz von 85 - 100 % passagiert, indem das verbrauchte Medium abgesaugt, die Zellen mit 3 ml DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) gewaschen und 1,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung für ein bis zwei Minuten bei 37 °C inkubiert wurden, was das Ablösen der adhären Zellen bedingte. Die Trypsin-Reaktion wurde durch Zugabe von 8,5 ml frischem, der Zelllinie entsprechendem DMEM-Kultivierungsmedium, welches 10 % FCS enthielt (Zusammensetzung in Tabelle 16), gestoppt und die Zellen wurden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mit Hilfe einer serologischen Pipette vereinzelt, bevor sie abhängig ihres Wachstumsverhaltens oder der folgenden Experimente auf 10 cm-Zellkulturschalen oder 6-, 12-, 24- bzw. 96-Vertiefungsplatten ausgesät wurden. Die für die Folgeexperimente gewählten Inkubationsbedingungen sind in Kapitel 3.2.2.4 beschrieben.

Tabelle 16: Zusammensetzung der Zellkulturmedien.

Zelllinie	Medium	Antibiotika-Zusatz
MEF WT		
MEF PS1 ^{2-/-}		
MEF PS1 ^{res}	DMEM	300 µg / ml Zeocin
MEF APP/APLP2 ^{2-/-}	10% (v/v) FCS	
MEF APP Δ CT15		
MEF APP Δ CT15 + C50		300 µg / ml Zeocin
N2a WT	DMEM 0,1 mM MEM-Aminosäurelösung 10 % (v/v) FCS	
N2a WT mock zu IDE-KD	100 U/ml Penicillin 0,1 mg/ml Streptomycin	400 µg / ml Hygromycin B
N2a IDE-KD	2 mM L-Glutamin 1 mM Natriumpyruvat	400 µg / ml Hygromycin B
SH-SY5Y WT		
SH-SY5Y APP ⁶⁹⁵		400 µg / ml Hygromycin B
SH-SY5Y C50	DMEM	300 µg / ml Zeocin
SH-SY5Y mock	0,1 mM MEM-Aminosäurelösung	
SH-SY5Y APP ^{2-/-}	10 % (v/v) FCS	
SH-SY5Y PS1 ^{2-/-}		

3.2.2.2 Kryokonservierung und Reaktivierung eukaryotischer Zellen

(nach (FRESHNEY, 2011))

Zur Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff wurden Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase (60 – 80 %-ige Konfluenz), wie in Kapitel 3.2.2.1 beschrieben, chemisch vom Boden der 10 cm-Zellkulturplatte abgelöst und die Reaktion unter Verwendung von 4,5 ml 10 %-FCS-haltigem Kultivierungsmedium abgestoppt.

Nach Überführung der Zellkultursuspension erfolgte eine Zentrifugation für fünf Minuten bei 355 x g und Raumtemperatur (RT) und das überständige Medium wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 4,5 ml Einfriermedium resuspendiert und zu je 1,5 ml in drei Kryogefäße aliquotiert. Zur kontinuierlichen Abkühlung der Kulturen um 1 °C pro Minute, wurden diese in eine mit Isopropanol befüllte Einfrierbox gegeben und für 48 – 72 Stunden bei -80 °C gelagert, bevor sie zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff transferiert wurden.

Zusammensetzung des Einfriermediums:

- 5 ml FCS
- 5 ml Dimethylsulfoxid (DMSO)
- 40 ml Kultivierungsmedium (siehe Tabelle 16)

Die Rekultivierung erfolgte durch zügiges Auftauen der Kryokulturen im 37 °C-Wasserbad und die Zugabe von 8,5 ml frischem, vorgewärmtem Kultivierungsmedium. Das aus der fünfminütigen Zentrifugation bei 355 x g und RT resultierte Zellpellet wurde in 10 ml Kultivierungsmedium resuspendiert und in eine 10 cm-Zellkulturschale überführt. Unter Verwendung des *PCR Mycoplasma Test Kit I/C* nach Herstellerangaben wurde nach Rekultivierung der Zellen eine Mykoplasmenkontamination ausgeschlossen. Zwischen der Rekultivierung der Zellen und den folgenden Experimenten (Kapitel 3.2.2.3 und 3.2.2.4) wurden die Kulturen mindestens zwei Mal passagiert.

3.2.2.3 Transfektion eukaryotischer Zellen durch Lipofektion

(nach Herstellerprotokoll *Lipofectamine 2000*, Invitrogen, Version Juli 2005)

Unter der Liposomen-basierten Transfektion beziehungsweise Lipofektion wird der Prozess verstanden, bei welchem ein Lipidkomplex aus winzigen vesikulären Strukturen, der dieselbe Komposition wie die zelluläre Membran hat, verwendet wird, um DNS transient oder stabil in Zellen einzubringen. Dies kann entweder über Endozytose des Liposomes oder direkte Fusionierung mit der Zellmembran und Entlassung des DNS-Konstruktes in die Zelle geschehen.

Bevor die Zellen nach dem Auftauen für weiterführende Experimente, wie die transiente Transfektion mit Plasmid-DNS, verwendet wurden, wurden sie mindestens zwei Mal passagiert, um mögliche Einflüsse potenzieller DMSO-(Gefrierschutzmittel-)Rückstände, welche toxische Eigenschaften besitzen könnten, ausschließen zu können. In dieser Arbeit erfolgte das Einbringen von Plasmid-DNS in eukaryotische Zellen mittels Transfektionsreagenz *Lipofectamine 2000* nach Angaben des Herstellers und mit den in Tabelle 17 aufgeführten Volumina. Vier bis sechs Stunden nach der Transfektion wurde das Plasmid-DNS-Lipofectamine-Reagenz von den Zellen entfernt und Kultivierungsmedium zugegeben. Nach einer Expressionszeit von 24-48 Stunden wurden die transient transfizierten Zellen für nachfolgende Experimente verwendet.

Tabelle 17: Volumina der Reagenzien zur lipofektions-basierten Transfektion.

Zellkulturschalen- Format	DNS [µg]	Lipofectamine 2000 Transfektionsreagenz [µl]	OptiMEM [µl]	vorgelegtes OptiMEM [ml]
24-Vertiefung	1	1,5	50	0,5
12-Vertiefung	2	3	100	0,7
6-Vertiefung	6-7	6	200	0,8

3.2.2.4 Inkubation von Zellen mit additiven Substanzen

(nach (METT, 2017))

Die Inkubation der Zellen mit verschiedenen additiven Substanzen erfolgte je nach Versuchsdesign im 24-Vertiefung, 6-Vertiefung oder 10 cm-Zellkulturschalen-Maßstab und wurde an die entsprechende Fragestellung angepasst. Die einzelnen Inkubationsschemata können aus Tabelle 18 entnommen werden. Lag während der Inkubation ein FCS-Gehalt $< 10\%$ vor, so wurde das Standard-Kultivierungsmedium der entsprechenden Zelllinie 16 Stunden vor Beginn der Inkubation durch Medium mit der reduzierten FCS-Konzentration ersetzt, sodass die Zellen sich langsam an den verminderten FCS-Gehalt adaptieren konnten. Die Reduktion des FCS-Gehaltes wurde vorgenommen, um in späteren (Lipid-) Analysen Effekte der natürlich im FCS enthaltenen Lipide auf ein Minimum begrenzen zu können.

Tabelle 18: In der vorliegenden Arbeit verwendete Inkubationsschema.

additive Substanz	finale Konzentration	Inkubations-Dauer / -Rhythmus	FCS-Gehalt	inkubierte Zellen
Vitamin D / -Analoga (siehe Tabelle 9)	100 nM	24 Stunden (8+16 h)	0,1-2.5 % (v/v)	N2a WT SH-SY5Y WT SH-SY5Y APP ⁶⁹⁵
Vitamin D / -Analoga (siehe Tabelle 9)	100 nM	15 min, 4 °C	-	Maushirn-Homogenate / isolierte Membranen
1 α ,25(OH) ₂ Vitamin D ₃ (Calcitriol)	100 nM	48 Stunden (24 + 24 h)	1 % (v/v)	SH-SY5Y WT
Phospholipide (siehe Tabelle 10)	10 μ M	18 Stunden	0,1 % (v/v)	N2a WT
Phospholipide (siehe Tabelle 10)	10 μ M	24 Stunden (18 + 6 h mit A β ₄₀)	0,1 % (v/v)	N2a WT (mock) N2a IDE-KD
γ -Sekretase-Inhibitor DAPT	2,5 μ M	48 Stunden (24 + 24 h)	1 % (v/v)	MEF PS1res
γ -Sekretase-Inhibitor X	2 μ M	48 Stunden (24 + 24 h)	1 % (v/v)	SH-SY5Y WT
synthetisches AICD-Peptid, Langzeitinkubation	2 μ M	> 9 Tage (12+12+... h)	10 % (v/v)	MEF APP Δ CT15

Für die 48-stündige Inkubation von MEF APP Δ CT15 und MEF PS1/2^{-/-} Zellen mit 2,5 μ M synthetischem AICD-Peptid (Aminosäure-Sequenz: KMQQNGYENPTYKFFEQMQN; entspricht den letzten 20 C-terminalen Aminosäuren von APP) oder der Lösungsmittelkontrolle Wasser wurde das *Saint-PhD* Protein-Transfektionsreagenz nach Herstellerangaben angewendet.

3.2.2.5 Bestimmung der Zellviabilität mittels LDH-Analyse und Propidiumiodidfärbung

(nach Herstellerprotokoll *Cytotoxicity Detection Kit* von Roche, Version März 2012)

An die Behandlung unterschiedlicher Zellen mit verschiedenen additiven Substanzen schloss sich die Detektion der Zytotoxizität nach Angaben des *Cytotoxicity Detection Kits* an. Mit Hilfe dieses Kits wurde die Konzentration des eigentlich zytosolisch vorliegenden Enzyms LDH im konditionierten Medium, welches am Ende der Inkubationsperiode abgenommen wurde (Kapitel 3.2.3.1), detektiert.

Die oxidative Umsetzung von Laktat zu Pyruvat, gekoppelt an die Reduzierung von NAD^+ zu $\text{NADH}+\text{H}^+$, bedingt eine zweite enzymatische Reaktion, in welcher durch Diaphorase zwei Protonen von $\text{NADH}+\text{H}^+$ auf das Tetrazoliumsalz INT (2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid) transferiert werden, woraus die Entstehung von rotem Formazan resultiert. Diese Reaktion wurde mittels Absorptionsmessung bei 491 nm in einem Photometer nachgewiesen. Das LDH-Enzym liegt bei Zellen mit intakter Plasmamembran-Integrität ausschließlich zytosolisch vor, weshalb eine Aktivität dieses Enzyms im Zellkulturmedium direkt proportional zu der Anzahl nekrotisierender Zellen ist. Mit Hilfe dieses *Cytotoxicity Detection Kits* ist keine Aussage über die Apoptose-Rate nach Inkubation mit unterschiedlichen additiven Substanzen möglich, da während dieses Prozesses des kontrollierten Zelltods Vesikel gebildet werden und kein Zellplasma freigesetzt wird. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Inkubationsbedingungen verwendet, die keine Zytotoxizität > 5 % bedingten.

Der Farbstoff Propidiumiodid dient dem Anfärben toter Zellen, da dieses kleine Fluoreszenz-Molekül, welches an DNS bindet, nicht in Zellen eindringen kann, die eine intakte Plasmamembran haben (CROWLEY et al., 2016). Zur Bestimmung der Zellviabilität mittels Propidiumiodidfärbung wurden Zellen in DMEM, welches kein Phenolrot enthält, mit Phospholipiden inkubiert (Kapitel 3.2.2.4). Im Anschluss wurden 10 μM Propidiumiodid zum Inkubationsmedium gegeben und die Zellen für 10 min bei 37 °C inkubiert. Die resultierende Fluoreszenz wurde in einem Safire² Fluorometer (Tecan) bei einer Anregung von 510 ± 20 nm und einer Emission von 617 ± 20 nm detektiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 0,5 % Triton X-100 lysiert und die Fluoreszenz-Messung wiederholt, um die Gesamtzellzahl pro Vertiefung bestimmen zu können.

3.2.2.6 Analyse der Proteinsekretion über das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) mittels SEAP-Analyse

(nach Herstellerprotokoll *1-Step PNPP*, Thermo Fisher Scientific, Version 2012)

Durch den Nachweis der SEAP im konditionierten Medium von mit dem für SEAP kodierenden Plasmid pVectOZ-SEAP transfizierten Zellen wurde die Proteinsekretion über das TGN quantifiziert. Die SEAP ist eine verkürzte Form der Alkalischen Phosphatase, welche über das TGN in sekretorischen Vesikeln sezerniert wird. Durch Zugabe des SEAP-spezifischen Substrats *para*-Nitrophenyl-Phosphat (p-NPP), bei dessen Umsetzung der wasserlösliche Farbstoff p-Dinitrophenol entsteht, erfolgte der photometrische Nachweis.

Die Analyse der Proteinsekretion über das Trans-Golgi-Netzwerk mittels SEAP-Analyse (Abbildung 33 B) wurde von Dr. Janine Mett durchgeführt.

3.2.3 Proteinbiochemische Methoden

3.2.3.1 Prozessierung von Zellen und konditioniertem Medium

(nach (METT, 2017))

Das konditionierte Zellkulturmedium wurde je nach Volumen in 2 ml-Reaktionsgefäße oder 15 ml-Röhrchen überführt und für fünf Minuten bei 13.000 x g und 4 °C zentrifugiert, sodass abgestorbene Zellen oder Zellfragmente sedimentierten. Nachdem der Überstand in frische Gefäße überführt wurde, wurde dieser entweder direkt weiterverwendet oder bei -20 °C gelagert. Zur Detektion von extrazellulärem IDE wurde das konditionierte Medium durch die Verwendung von *Amicon Ultra* Filtern mit einer Grenze von 30 kDa vor der Gelelektrophorese angereichert.

Erfolgte eine Lipidanalytik, wurden Zellhomogenate, die ohne den Einsatz jeglichen Detergens gewonnen wurden, benötigt. Hierzu wurden die Zellen zwei Mal mit HPLC-grade H₂O gewaschen und unter Verwendung eines Zellschabers in 180 µl HPLC-grade-H₂O vom Boden der 10 cm-Zellkulturschalen abgelöst und in Minilys-Reaktionsgefäße überführt. Nach Zugabe von Keramikkügelchen (Durchmesser 1,4 mm) erfolgte die mechanische Herstellung von Zellhomogenaten mittels Minilys-Homogenisator in 30-60 Sekunden bei maximaler Intensität (5000 U/min).

Für die Proteinanalytik wurden Zelllysate benötigt. Dafür wurden die Zellen drei Mal mit gekühltem 1x PBS gewaschen, anschließend mit Lysepuffer, der Protease-Inhibitor-Cocktail mit oder ohne EDTA enthielt, chemisch lysiert und nach einer einstündigen Inkubation auf Eis mittels Zellschaber abgelöst und in Reaktionsgefäße überführt. Die anschließende fünfminütige Zentrifugation bei 13.000 x g und 4 °C diente der Sedimentierung von Zelldebris. Der Überstand wurde in frische Gefäße überführt und entweder direkt verwendet oder bei -20 °C gelagert.

1xPBS:

137 mM	NaCl	
2,7 mM	KCl	
8,1 mM	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	
1,5 mM	KH ₂ PO ₄	in ddH ₂ O
	einstellen des pH-Wertes auf 7,5 mit HCl	

10x Protease-Inhibitor Cocktail mit / ohne EDTA:

1 Complete-Tablette gelöst in 5 ml ddH₂O, Lagerung bei -20 °C

Standard-Lysepuffer:

50 mM	Tris/HCl pH 7,4	
150 mM	NaCl	
2 mM	EDTA	
0,1 % (v/v)	Nonidet P-40	
0,1 % (v/v)	Triton X-100	in ddH ₂ O
Unmittelbar vor der Verwendung: Zugabe von Protease-Inhibitor-Cocktail mit / ohne EDTA		

Lysepuffer für die IDE- und NEP-Enzymaktivitätsbestimmung:

20 mM	Tris/HCl pH 7,4	
10 % (w/v)	Saccharose	
0,5 % (v/v)	Triton X-100	in ddH ₂ O
Zugabe von Protease-Inhibitor-Cocktail ohne EDTA unmittelbar vor Verwendung		

3.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bicinchoninsäure-Analyse

(nach (SMITH et al., 1985))

Zur Erhöhung der Vergleichbarkeit verschiedener biologischer Proben erfolgte die Bestimmung der jeweiligen Proteinkonzentration mittels BCA-Analyse. Basierend auf den erhaltenen Ergebnissen erfolgte das Einstellen auf eine einheitliche Proteinkonzentration. Die Analyse basiert auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ in Anwesenheit von Proteinen im alkalischen Milieu und der Bildung eines violetten Komplexes von Cu^+ mit Bicinchoninsäure, welcher photometrisch bei einer Absorption von 560 nm detektiert werden kann (SMITH et al., 1985). Zwischen der Absorption und der enthaltenen Proteinkonzentration besteht eine direkte Proportionalität. Mit Hilfe einer in Wasser angesetzten Verdünnungsreihe aus Rinderserum-Albumin (engl. *bovine serum albumin*, BSA), welche von 0,1 mg/ml bis 1,1 mg/ml reicht, wurde nach Bestimmung der Absorption bei 560 nm die Proteinkonzentration berechnet.

Für die Durchführung der BCA-Analyse wurden 3-5 μl pro Probe als Dreifachbestimmung sowie 20 μl der BSA-Standardreihe in die Vertiefungen einer farblosen 96-Vertiefungsplatte pipettiert. Unter Verwendung einer Achtkanal-Pipette wurden 200 μl der frisch angesetzten BCA-Reaktionslösung pro Vertiefung zugegeben und die Platte für 15 min bei 37 °C und anschließend für 15 weitere Minuten bei RT und unter 200 U/min schüttelnd inkubiert, bevor die Absorptionsmessung mittels Platten-Photometer erfolgte.

BCA-Reaktionslösung:

4 % (w/v) $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ und Bicinchoninsäure 1:39 (v/v)

3.2.3.3 Immunpräzipitation von Amyloid- β

(nach (METT, 2017))

Mittels Immunpräzipitation wurde $\text{A}\beta$ aus dem konditionierten Medium angereichert, um eine folgende Detektion dieses Peptides mittels Western Blot-Analyse zu ermöglichen. Hierzu wurden der W02 Antikörper (Tabelle 11) in einer Konzentration von 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sowie 20 μl Protein-G-Sepharose herangezogen. 1 ml konditioniertes und an den Proteingehalt der Zellen angeglichenes Medium wurde mit Antikörper und G-Sepharose versetzt und über Nacht bei 4 °C in einem Überkopftaumler inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte eine Zentrifugation für 1 min bei 13.000 x g und 4 °C, um die G-Sepharose und daran gebundene Antikörper- $\text{A}\beta$ -Komplexe zu pelletieren.

Der Überstand wurde verworfen und das Pellet jeweils einmal mit 1 ml Waschpuffer A, B und C unter gleichbleibenden Zentrifugationsbedingungen gewaschen. Im Anschluss an den letzten Waschschrift wurde der Waschpuffer C unter Verwendung einer Hamilton-Kapillare vollständig abgenommen und das Präzipitat für die gelelektrophoretische Auftrennung mittels Western Blot-Analyse (Kapitel 3.2.3.5 und 3.2.3.6) verwendet.

Waschpuffer A:

10 mM	Tris/HCl pH 7,5	
150 mM	NaCl	
0,1 % (v/v)	Nonidet P-40 (NP-40)	
0,1 % (v/v)	Triton X-100	
2 mM	EDTA	in ddH ₂ O

Waschpuffer B:

10 mM	Tris/HCl pH 7,5	
500 mM	NaCl	
0,1 % (v/v)	Nonidet P-40 (NP-40)	
0,1 % (v/v)	Triton X-100	
2 mM	EDTA	in ddH ₂ O

Waschpuffer C:

10 mM	Tris/HCl pH 7,5	in ddH ₂ O
-------	-----------------	-----------------------

3.2.3.4 Elektrophoretische Trennung von Proteinen mittels vertikaler diskontinuierlicher Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

(nach (SCHAGGER, VON JAGOW, 1987) und (METT, 2017))

Durch die SDS-PAGE (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) werden Proteine in Abhängigkeit ihres Molekulargewichtes aufgetrennt.

In der vorliegenden Arbeit wurden diskontinuierliche, 10-20 %-ige Tris/Tricin-Gradienten-Gele verwendet, um Proteingemische aus Lysaten und Homogenaten (Kapitel 3.2.3.1) sowie Immunpräzipitate (Kapitel 3.2.3.3) durch Anlegen einer elektrischen Spannung aufzutrennen. Die Immunpräzipitations-Proben wurden mit 15 µl 3x Protein-Probenpuffer und alle weiteren Proben mit 1/3 Volumen 3x Protein-Probenpuffer versetzt und zur Denaturierung der Proteine für fünf Minuten bei 98 °C in einem Heizblock inkubiert. Das im Protein-Probenpuffer enthaltene SDS diente der Maskierung der Eigenladung der Proteine durch eine negative Ladung. Dies war notwendig, damit sich die Proteine nach Anlegung einer Spannung im entstandenen elektrischen Feld in Richtung der Anode bewegen und sich anhand ihres molekularen Gewichts auftrennen.

Nachdem die denaturierten Proben für 30 Sekunden zentrifugiert wurden, erfolgte das Beladen der Geltaschen mit Hilfe einer Hamilton-Kapillare. Neben den Proben wurden auch 5 µl des Proteingrößenstandards *Page Ruler* aufgetragen, um das Molekulargewicht der Proteine daran abschätzen zu können. Die gelelektrophoretische Auftrennung fand unter einer elektrischen Spannung von 120 V in einer mit Laufpuffer gefüllten Kammer über einen Zeitraum von 60 – 90 Minuten statt.

1x Laufpuffer für SDS-PAGE:

100 mM	Tris/HCl pH 8,25-8,5	
100 mM	Tricin	
0,1 % (w/v)	SDS	in ddH ₂ O

3x Protein-Probenpuffer:

187,5 mM	Tris/HCl pH 6,8	
6 % (w/v)	SDS	
30 % (w/v)	Glycerin	
15 % (v/v)	β-Mercaptoethanol	
0,03 % (w/v)	Bromphenolblau	in ddH ₂ O

3.2.3.5 Western Blot-Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

(nach (TOWBIN et al., 1979) und (METT, 2017))

Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine anhand ihres Molekulargewichtes wurde der Western Blot-Transfer durchgeführt, um die Proteine aus dem Gel auf eine Membran zu übertragen und zu immobilisieren. Dieses Verfahren, welches durch Anlegen einer äußeren, elektrischen Spannung geschieht, ermöglicht es, in einem folgenden Schritt die Proteine unter Verwendung spezifischer Antikörper nachzuweisen.

In dieser Arbeit wurde das Nass-Blot-Verfahren herangezogen, indem die Tris-Tricin-Gele auf einer Nitrozellulosemembran platziert und beidseitig mit jeweils zwei Lagen Whatman-Filterpapier sowie jeweils einem Schwamm umhüllt wurden. Dieses Sandwich wurde in eine mit Transferpuffer gefüllte Kammer eingehängt, in welcher der Transfer der durch das SDS negativ geladenen Proteine bei 380 mA und 4 °C in Richtung der Anode erfolgte. Standardmäßig erfolgte der Transfer für drei Stunden, was sich nach dem Molekulargewicht der zu analysierenden Proteine richtete. Zur Übertragung von A β wurde eine Transferzeit von 45 Minuten verwendet.

Transferpuffer:

25 mM	Tris/HCl pH 8,7	
192 mM	Glycin	
20 % (v/v)	Methanol	
0,025 % (w/v)	SDS	in ddH ₂ O

3.2.3.6 Immunologischer Nachweise von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

(nach (IDA et al., 1996) und (METT, 2017))

Dem Western Blot-Transfer auf eine Nitrozellulosemembran schloss sich der immunologische Nachweis der Proteine mit Hilfe spezifischer Primärantikörper (Kapitel 3.1.7) an. Nach Bindung des primären Antikörpers an sein spezifisches Epitop wurde dieser selbst von einem spezies-spezifischen Sekundärantikörper erkannt, der an das Enzym Meerrettichperoxidase (engl. *horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelt ist. Dieses Enzym katalysiert bei Kontakt mit der ECL- (engl. *enhanced chemiluminescence*-) Reaktionslösung eine Lichtreaktion, durch welche die markierten Proteine auf einem lichtempfindlichen Film dargestellt werden können.

In einem ersten Schritt wurden zur Reduzierung unspezifischer Antikörperbindungen freie Bindestellen durch eine für den Antikörper spezifische Blockierlösung unterdrückt (Tabelle 19). Damit der Primärantikörper W02 sein Epitop erkennt, musste die Nitrozellulosemembran zunächst für fünf Minuten in 100 ml 1x PBS (Kapitel 3.2.3.1) bei 700 W in einer Mikrowelle erhitzt werden, bevor die Blockierlösung inkubiert wurde (IDA et al., 1996). Nach zwei fünfminütigen Waschschrritten erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden Primärantikörper. Vor der einstündigen Inkubation der Membran mit dem entsprechenden Sekundärantikörper wurde diese drei Mal für fünf Minuten gewaschen. Nach erneutem viermaligem Waschen wurde die ECL-Reaktionslösung auf die Membran gegeben, sodass die HRP-katalysierte Chemilumineszenz-Reaktion stattfinden konnte. Zur Detektion der entstandenen Lichtsignale wurde die Membran unter Vermeidung von Luftblasen zwischen zwei Kopierfolien gelegt. Anschließend wurde sie unter Lichtausschluss in einer Dunkelkammer auf einem ECL-Hyperfilm, der lichtempfindlich ist, exponiert.

Das Programm Image Gauge V3.45 (Fujifilm) wurde im Anschluss für die densitometrische Analyse der Signalintensitäten angewendet, wobei zur Auswertung die jeweiligen Hintergrund-Signale subtrahiert wurden. Die Detektion der Gesamtproteine erfolgte direkt im Anschluss an den Western Blot-Transfer auf die Nitrozellulosemembran unter Verwendung der Färbelösung Ponceau S wie in (JANITSCHKE et al., 2019) beschrieben.

TBS (*Tris-buffered saline*)-T:

10 mM Tris/HCl
150 mM NaCl
0,2 % (v/v) Tween-20 in ddH₂O

ECL-Reaktionslösung:

ECL-Lösung 1 und ECL-Lösung 2 im Verhältnis 1:1 (v/v) frisch vermischen

Tabelle 19: In der vorliegenden Arbeit angewendete Blockier- und Inkubationsbedingungen im Rahmen des immunologischen Proteinnachweises. Der Fettgehalt des eingesetzten Magermilchpulvers lag bei $\leq 1,5$ %. TBS-/PBS-T setzte sich aus TBS/PBS und 0,05 % Tween-20 zusammen. ÜN: Über Nacht. RT: Raumtemperatur.

analysiertes Protein oder Peptid	Blockierlösung, Inkubationsbedingungen	Primärantikörper, Verdünnung, Inkubationsbedingung	Sekundärantikörper, Verdünnung, Inkubationsbedingung	Waschpuffer
APP/A β / sAPP α / β -CTF (human)	10 % Milchpulver (w/v) in PBS, ÜN, 4 °C	W02, 5 μ g/ml in 1 % Milchpulver (w/v) in PBS, 90 min, RT	P0260, 1:5000 in PBS, 1 h, RT	PBS
sAPP β	10 % Milchpulver (w/v) in PBS, ÜN, 4 °C	Mbs492139, 1:200 in 5 % Milchpulver (w/v) in PBS, 90 min, RT	W4011, 1:5000 in PBS, 1 h, RT	PBS
IDE	10 % Milchpulver (w/v) in TBS-T, ÜN, 4 °C	ST1120, 1:2000 in 5 % Milchpulver (w/v) in TBS-T, 90 min, RT	W4011, 1:5000 in TBS-T, 1 h, RT	TBS-T
IDE	5 % Milchpulver (w/v) in TBS-T, ÜN, 4 °C	67106-1-Ig, 1:5000 in 5 % Milchpulver (w/v) in TBS-T, 90 min, RT	P0260, 1:5000 in 5 % Milchpulver (w/v) in TBS-T, 1 h, RT	TBS-T
β -Aktin	5 % Milchpulver (w/v) in PBS, ÜN, 4 °C	A5441, 1:5000 in 5 % Milchpulver (w/v) in PBS, 90 min, RT	P0260, 1:5000 in PBS, 1 h, RT	TBS-T
β -Aktin	5 % BSA (w/v) in PBS-T, ÜN, 4 °C	ab1801, 1:1000 in 5 % BSA (w/v) in PBS-T, 90 min, RT	W4011, 1:5000 in PBS-T, 1 h, RT	PBS-T
BACE1	5 % Milchpulver (w/v) in PBS, ÜN, 4 °C	ab2077, 1:1000 in 5 % Milchpulver (w/v) in PBS, 90 min, RT	W4011, 1:5000 in 5 % Milchpulver (w/v) in PBS, 1 h, RT	PBS
PS1	10 % Milchpulver (w/v) in PBS, ÜN, 4 °C	sc-7860, 1:5000 in 5 % Milchpulver (w/v) in PBS, 90 min, RT	W4011, 1:5000 in 5 % Milchpulver (w/v) in PBS, 1 h, RT	PBS

3.2.3.7 Nachweis von A β mittels ELISA

(nach Herstellerprotokoll *Human A β ₄₀-ELISA-Kit*, Thermo Fisher Scientific, Januar 2018)

Die ELISA-Analyse (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) basiert auf einer spezifischen Isolierung von Proteinen durch eine mit entsprechendem Antikörper beschichtete 96-Vertiefungsplatte. Die isolierten Proteine werden in einem zweiten Schritt von einem Detektionsantikörper, welcher von einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper erkannt wird, gebunden. Nach Zugabe einer *Stabilized Chromogen*-Lösung katalysiert die HRP eine Reaktion, die in der Entstehung eines farbigen Komplexes resultiert, welcher durch Detektion der Absorption bei 450 nm mit Hilfe eines Platten-Photometers quantitativ nachgewiesen werden kann. Vorteilhaft bei der ELISA-Analyse sind die schnelle und einfache Durchführbarkeit, die eindeutige Quantifizierung sowie die hohe Sensitivität. Ein Nachteil dieser Methode, im Vergleich zum SDS-PAGE mit anschließender Immundetektion, liegt darin, dass die Hintergrundaktivität, also unspezifische Bindungen des Primär- und / oder Sekundärantikörpers, nicht detektiert und somit evaluiert werden können. Zudem kann häufig eine vorherige Reinigung der Proben notwendig sein, um unspezifische Bindungen an den am Plattenboden gebundenen Antikörper zu minimieren. Das in dieser Arbeit verwendete humane A β ₄₀-ELISA-Kit wurde nach Angaben der Hersteller verwendet.

3.2.3.8 Nachweis von IL-1 β mittels ELISA

(nach Herstellerprotokoll *Human IL-1 beta-ELISA-Kit*, Abcam, Version Juli 2020)

Die Menge des Zytokins IL-1 β im Medium von Calcifediol- und Analoga-inkubierten SH-SY5Y-WT-Zellen wurde unter Verwendung des humanen IL-1 β -ELISA-Kits der Firma Abcam nach Angaben des Herstellers bestimmt.

3.2.3.9 Messung der Degradation von A β ₄₀

(nach (SUN et al., 2005) und (METT, 2017))

Zur Ermittlung der Degradation von A β ₄₀ wurde humanes synthetisches A β ₁₋₄₀ (Bachem; folgend als A β ₄₀ bezeichnet) zu murinen N2a-Zellen oder murinem Hirngewebe gegeben und nach einer festgelegten Zeitperiode das nicht-degradierte humane A β ₄₀ mittels Western Blot-Analyse und folgender Immundetektion durch W02 detektiert.

Die relative Menge an verbliebenem A β ₄₀ war in diesem experimentellen Ansatz umgekehrt proportional zu der A β -degradierenden Aktivität. Da sich humanes A β im W02-Epitop von murinem A β in drei N-terminalen Aminosäuren unterscheidet (YAMADA et al., 1987), bindet der W02-Antikörper spezifisch an humanes A β . Durch Verwendung von murinen Proben konnte somit ausgeschlossen werden, dass endogen produziertes A β detektiert wurde. Zudem wurde so lediglich der A β -Katabolismus analysiert und nicht die Summe aus Anabolismus und Katabolismus. Die Linearität der A β ₄₀-Detektion mittels Western Blot-Analyse wurde verifiziert, indem humanes A β ₄₀ in einer Konzentrationsreihe von 0 μ g/ml bis 0,5 μ g/ml (0 – 0,025 – 0,05 – 0,125 – 0,25 – 0,5 μ g/ml) geblottet und die Signalintensitäten densitometrisch quantifiziert wurden (Abbildung 6).

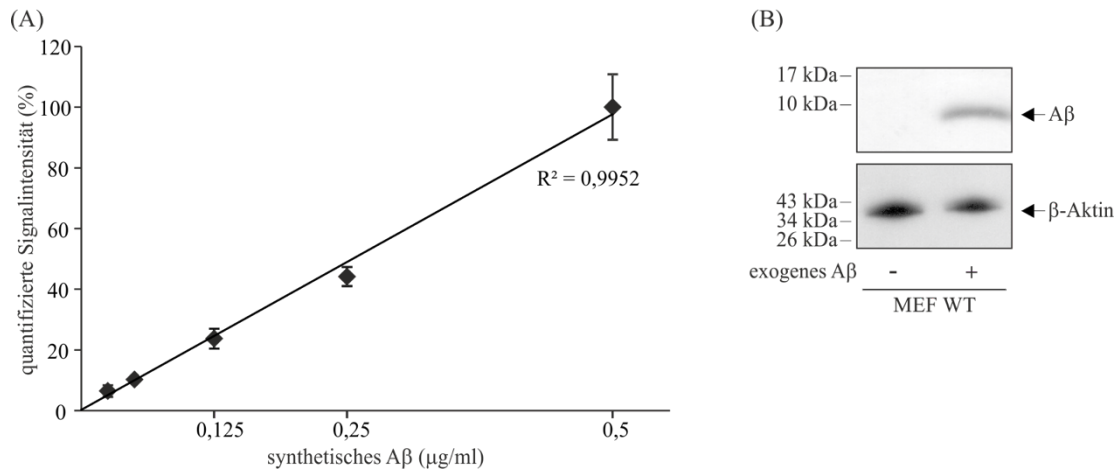


Abbildung 6: Validierung der in dieser Arbeit verwendeten Methode zur Aβ-Degradationsanalyse mittels Western Blot-Analyse und synthetischem Aβ. (A) Signifikante lineare Pearson-Korrelation ($R^2 = 0,995$ mit $p \leq 0,001$) zwischen der quantifizierten Signalintensität nach immunologischer Detektion und eingesetztem synthetischem humanem Aβ₄₀ im Konzentrationsbereich von 0 - 0,5 µg/ml ($n = 4$). (B) Verifizierung der W02-Detektion von exogenem und nicht endogenem Aβ in embryonalen Maus-Fibroblasten. Abbildung verändert nach (METT et al., 2021) und (LAUER et al., 2020).

In der vorliegenden Arbeit wurden je nach experimenteller Fragestellung verschiedene Versuchsansätze der Aβ-Degradationsanalyse herangezogen, welche in Tabelle 20 aufgelistet sind und im 24-Vertiefungsformat durchgeführt wurden. Der Inkubation mit additiven Substanzen folgte eine kombinierte Inkubation mit der additiven Substanz und 0,5 µg/ml humanem synthetischen Aβ₄₀. Für die Bestimmung der Aβ-Degradation in Vitamin D-Mangel-Maushirnen wurde das Probenmaterial in kleinen Glasfläschchen mit 1 µg/ml humanem synthetischen Aβ₄₀ sowie 1 µM β-Inhibitor und 20 µM γ-Inhibitor versetzt und für eine Stunde bei 37 °C und 300 U/min inkubiert.

Tabelle 20: Versuchsansätze im Rahmen der Bestimmung der Degradation von Aβ₄₀.

Probenmaterial	Probenmenge und Puffer	Aβ ₄₀ -Konzentration	Inkubationszeit
N2a-WT-Zellen	eine Vertiefung einer 24-Vertiefungsplatte + 200 µl Kultivierungsmedium mit 0,1 % FCS	0,5 µg/ml	6 Std
Hirn-Homogenat Vitamin D-Mangel-Mäuse	50 µg Gesamtprotein in 10 µl H ₂ O	1 µg/ml	1 Std
MEF-Zelllysate	60 µg Gesamtprotein in PBS (+/- 10 µM Insulin / 10 µM Thiorphan)	1 µg/ml	1 Std

3.2.3.10 Fluorometrische Bestimmung von Enzymaktivitäten

(nach (GRIMM et al., 2013a; GRIMM et al., 2015b; METT, 2017; MINERS et al., 2008b))

Zur Enzymaktivitätsanalyse wurden spezifische fluorometrische Substrate herangezogen, in welchen die Aminosäure-Sequenz, welche die Schnittstelle für das analysierte Enzym enthält, ein Fluorophor mit einem Quencher verbindet. Der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) zwischen der Quencher-Gruppe und dem Fluorophor inhibiert in einem intakten Substrat-Molekül die Freisetzung von Fluoreszenz. Wird das Substrat durch das analysierte Enzyme hydrolysiert, werden beide Gruppen räumlich getrennt und das Fluorophor kann bei einer definierten Wellenlänge angeregt werden (ERMOLIEFF et al., 2000; FARMERY et al., 2003). Die Detektion der dabei freigesetzten Fluoreszenz erfolgte in Zellen, isolierten Membranen und homogenisierten Geweben in Echtzeit mittels Safire² Fluorometer (Tecan) unter Lichtausschluss bei 37 °C. Tabelle 21 listet die verwendeten fluorometrischen Substrate, welche spezifisch für die analysierten Enzyme sind, sowie die angewendeten Messparameter auf. Für die Auswertung der Enzymaktivität, welche proportional zur detektierten Fluoreszenz ist, wurde der lineare Messbereich, der zwischen der Lag-Phase und dem Wendepunkt liegt, nach Abzug der Unspezifität, welche durch die Anwesenheit eines Inhibitors quantifiziert wurde, herangezogen.

Tabelle 21: Im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Messung der Enzymaktivität verwendete fluorometrische Substrate und Messparameter.

Enzym	Probenart	Substrat	Substrat-Konzentration	Messparameter
IDE	MEF-Zelllysate	MCA-RPPGFSAFK (DNP)-OH	10 µM	Exzitation: 320 ± 10 nm Emission: 405 ± 10 nm
IDE	rekombinantes IDE	MCA-RPPGFSAFK (DNP)-OH	5 µM	Exzitation: 320 ± 10 nm Emission: 405 ± 10 nm
NEP	N2a-Zelllysate	MCA-RPPGFSAFK (DNP)-OH	5 µM	Exzitation: 320 ± 10 nm Emission: 405 ± 10 nm
α-Sekretase	SH-SY5Y-Zellen	α-Sekretase-Substrat (Calbiochem, Nr. 565767)	3 µM	Exzitation: 340 ± 10 nm Emission: 490 ± 10 nm
β-Sekretase	SH-SY5Y-Zellen	β-Sekretase-Substrat (Calbiochem, Nr. 565758)	20 µM	Exzitation: 345 ± 5 nm Emission: 500 ± 5 nm
β-Sekretase	isolierte Membranen von SH-SY5Y-Zellen	β-Sekretase-Substrat (Calbiochem, Nr. 565758)	20 µM	Exzitation: 345 ± 5 nm Emission: 500 ± 5 nm
γ-Sekretase	SH-SY5Y-Zellen	γ-Sekretase-Substrat (Calbiochem, Nr. 565764)	6,25 µM	Exzitation: 355 ± 10 nm Emission: 440 ± 10 nm

3.2.3.10.1 Bestimmung der IDE-Enzymaktivität aus Zellen

(nach (GRIMM et al., 2016c; METT, 2017; MINERS et al., 2008a))

Der Messung der IDE-spezifischen Enzymaktivität ging eine Isolation des Enzyms durch Inkubation der Zellysate, die durch chemische Lyse unter Verwendung von Lysepuffer generiert wurden, auf einer mit dem IDE-Antikörper beschichteten 96-Vertiefungsplatte voraus. Das Beschichten einer MaxiSorp-96-Vertiefungsplatte erfolgte durch 100 µl IDE-Antikörper ST1120 (Tabelle 11) in einer Konzentration von 5 µg/ml in PBS. Dem fünfminütigen Schütteln der beschichteten Platte bei 150 U/min und Raumtemperatur folgte eine Inkubation für 24 Stunden bei Raumtemperatur, wobei die Platte mit einer Folie verschlossen wurde. Dem Blocken mit 200 µl 10 % (w/v) fettsäure-freiem bovinen Serumalbumin (BSA) in PBS, welches schüttelnd für zwei Stunden bei Raumtemperatur stattfand, gingen fünf Waschschriffe mit jeweils 200 µl PBS + 0,05 % Tween 20 pro Vertiefung voraus. Zwischenzeitlich wurden die Zellen, wie in Kapitel 3.2.3.1 beschrieben, geerntet und mit speziellem IDE-Enzymaktivitätsanalyse-Lysepuffer lysiert und mittels BCA-Analyse (Kapitel 3.2.3.2) auf einen Proteingehalt von 50 µg in einem Endvolumen von 20 µl eingestellt. Im Anschluss an das Blocken wurde die Platte erneut dreimalig gewaschen und 20 µl der Zellysate, versetzt mit 80 µl PBS + 0,05 % Tween 20, auf die mit IDE-Antikörper beschichtete und geblockte 96-Vertiefungsplatte gegeben und für eine Stunde bei 20 °C und 150 U/min inkubiert. Dem anschließenden fünfmaligen Waschen folgte eine Vorinkubation mit 100 µl IDE-Analysepuffer pro Vertiefung für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Im Analysepuffer befanden sich spezifische β- und γ-Sekretase-Inhibitoren sowie Protease-Inhibitor-Cocktail ohne EDTA, um die Spezifität der Analyse zu erhöhen, da das verwendete MCA-RPPGFSAFK(DNP)-OH Substrat auch durch unter anderem das Endothelin-konvertierende Enzym 1 (ECE1), Matrixmetalloproteasen (MMP), Neprilysin (NEP), BACE1 oder den γ-Sekretase-Komplex umgesetzt werden kann. Nach Zugabe von 10 µM IDE-Substrat (Tabelle 21) erfolgte die kontinuierliche Messung der Fluoreszenz im Safire² Fluorometer (Tecan).

Lysepuffer für die IDE-Enzymaktivitätsbestimmung:

0,5 %	Triton X-100	
20 mM	Tris/HCl, pH 7,4	
10 %	Saccharose	in ddH ₂ O

IDE-Analysepuffer:

50 mM	Tris/HCl pH 7,4
1 M	NaCl
10 µM	MgCl ₂
1 µM	β-Sekretase-Inhibitor II (Zugabe unmittelbar vor Verwendung)
25 µM	γ-Sekretase-Inhibitor IV (Zugabe unmittelbar vor Verwendung)
	1x Complete Protease-Inhibitor ohne EDTA (Zugabe unmittelbar vor Verwendung)
	in ddH ₂ O

3.2.3.10.2 Bestimmung der Enzymaktivität rekombinanten IDEs nach Lipidinkubation

(nach (GRIMM et al., 2016c; METT, 2017))

Zur Analyse eines direkten Einflusses verschiedener Phospholipide (Tabelle 10) auf die enzymatische Aktivität von IDE wurden 50 ng rekombinantes humanes IDE *in vitro* in Glasfläschchen für 15 min bei 37 °C und 300 U/min mit 10 µM Phospholipiden in 200 µl IDE-Analyse-Puffer unter ständigem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden je 50 µl der IDE-Phospholipid-Proben in Triplikaten auf eine schwarze 96-Vertiefungsplatte transferiert und mit 5 µM des Substrats MCA-RPPGFSAFK(DNP)-OH versetzt. Die resultierende Fluoreszenz wurde kontinuierlich mittels Safire² Fluorometer (Tecan) gemessen.

IDE-Analysepuffer zur Analyse direkter Einflüsse:

100 mM	Tris/HCl, pH 7,5	
50 mM	NaCl	
10 µM	ZnCl ₂	in ddH ₂ O

In einem, auf diesem experimentellen Ansatz beruhenden, weiteren Versuch wurde analysiert, ob IDE in Anwesenheit von Phospholipiden direkt zu einer Reduzierung von A β ₄₀ in der Lage ist. Hierzu wurde unter oben beschriebenen Versuchsbedingungen anstelle des fluorometrischen Substrats MCA-RPPGFSAFK(DNP)-OH, humanes A β ₄₀ in einer Konzentration von 0,5 µg/ml zugegeben. Die Proben wurden schüttelnd (300 U/min) für 90 min bei 37 °C in Glasfläschchen inkubiert und anschließend wurde die Menge des nicht-degradierten, humanen A β ₄₀ mittels ELISA (Kapitel 3.2.3.7) quantifiziert.

3.2.3.10.3 Analyse der IDE-Enzymaktivität in murinen Serumproben

(nach (LIU et al., 2012; METT, 2017))

Bei IDE handelt es sich um ein Enzym, welches sowohl intrazellulär als auch extrazellulär lokalisiert ist, weshalb eine Analyse der IDE-Enzymaktivität im Serum von Bedeutung sein kann (LIU et al., 2012; QIU et al., 1998).

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität von IDE im Serum wurde dieses 1:100 in IDE-Analysepuffer verdünnt und je 100 µl der Proben auf eine schwarze 96-Vertiefungsplatte transferiert. Nach Zugabe von 10 µM MCA-RPPGFSAFK(DNP)-OH Substrat wurde die resultierende Fluoreszenz, wie in Tabelle 21 beschrieben, mittels Safire² Fluorometer detektiert.

Die Enzymaktivität von IDE wurde berechnet, indem der unspezifische Substratumsatz in der Anwesenheit von 1 mM des IDE-Inhibitors N-Ethylmaleinimid (NEM) subtrahiert wurde und die Enzymaktivität auf den Proteingehalt jeder Serumprobe normalisiert wurde. Die Analyse der IDE-Enzymaktivität in Serumproben (Abbildung 35) wurde von Dr. Janine Mett durchgeführt.

IDE-Analysepuffer zur Messung der Enzymaktivität im Serum:

100 mM	Tris/HCl, pH 7,5
50 mM	NaCl
10 µM	ZnCl ₂
1 µM	β-Sekretase-Inhibitor II (Zugabe unmittelbar vor Verwendung)
25 µM	γ-Sekretase-Inhibitor IV (Zugabe unmittelbar vor Verwendung)
	1x Complete Protease-Inhibitor ohne EDTA (Zugabe unmittelbar vor Verwendung)
	in ddH ₂ O

3.2.3.10.4 Bestimmung der NEP-Enzymaktivität aus Zellen und Gewebe

(nach (METT, 2017; MINERS et al., 2008b))

Die Bestimmung der enzymatischen NEP-Aktivität erfolgte analog zur Messung der IDE-Enzymaktivität (Kapitel 3.2.3.10.1) mit den Änderungen, dass der NEP-spezifische Antikörper AF1182 in einer Konzentration von 1,6 µg/ml in PBS zum Beschichten der 96-Vertiefungs-MaxiSorp-Platte herangezogen wurde. Nach der Lyse wurden die Proben mit PBS auf eine einheitliche Proteinkonzentration von 1,25 mg/ml eingestellt. Zudem enthielt der NEP-spezifische Analysepuffer den IDE-Inhibitor Bacitracin und das Substrat wurde in einer finalen Konzentration von 5 µM zu den Proben gegeben, bevor die Fluoreszenz kontinuierlich mittels Safire² Fluorometer (Tecan) detektiert wurde.

NEP-Analysepuffer:

100 mM	Tris/HCl pH 7,0
50 mM	NaCl
10 µM	ZnCl ₂
1 µM	β-Sekretase-Inhibitor II (Zugabe unmittelbar vor Verwendung)
25 µM	γ-Sekretase-Inhibitor IV (Zugabe unmittelbar vor Verwendung)
10 µM	Bacitracin (Zugabe unmittelbar vor Verwendung)
1x Complete Protease-Inhibitor ohne EDTA	(Zugabe unmittelbar vor Verwendung)
in ddH ₂ O	

3.2.3.10.5 Messung der α-, β- und γ-Sekretase-Enzymaktivitäten in metabolisch aktiven Zellen

(nach (GRIMM et al., 2013a; GRIMM et al., 2015b; METT, 2017))

Zur Bestimmung der Enzymaktivitäten in SH-SY5Y-Zellen, wurden diese nach Inkubation mit additiven Substanzen im 96-Vertiefungsplatten-Format (Kapitel 3.2.2.4) zwei Mal mit vorgewärmter *Life Cell Imaging*-Lösung gewaschen, bevor 100 µl dieser Lösung versetzt mit α-Sekretasesubstrat oder 50 µl versetzt mit β- oder γ-Sekretasesubstrat (Tabelle 21) in jede Vertiefung gegeben wurden und die resultierende Fluoreszenz unter den in Tabelle 21 aufgeführten Parametern in Echtzeit ermittelt wurde. Bei der *Life Cell Imaging* Lösung handelte es sich um einen Carbonatpuffer, der der Konstanthaltung der optimalen CO₂-Konzentration und des pH-Wertes während der Dauer der Messung diene.

Life Cell Imaging Lösung:

140 mM	NaCl
5 mM	KCl
8 mM	CaCl ₂
1 mM	MgCl ₂
20 mM	HEPES, pH 7,4
in ddH ₂ O	

3.2.3.10.6 Messung der β-Sekretase-Enzymaktivität in isolierten Membranen

(nach (METT, 2017; ROTHHAAR et al., 2012))

Vor der Enzymaktivitätsbestimmung in isolierten Membranen wurden SH-SY5Y-Zellen in Sukrose-Puffer mit Hilfe von Keramikkügelchen mit einem Durchmesser von 1,4 mm und dem Minilys-Homogenisator (5000 U/min für 30 Sekunden) homogenisiert (Kapitel 3.2.3.1), mittels BCA-Analyse (Kapitel 3.2.3.2) auf eine einheitliche Proteinmenge von 2 mg/ml eingestellt und postnukleäre Fraktionen (PNF) durch Sukrose-Dichten-Zentrifugation (900 x g für 10 min bei 4 °C), isoliert.

Diese wurden mit Calcifediol oder seinen Analoga für 15 min bei 4 °C inkubiert und die Membranen durch Ultrazentrifugation für 75 min bei 55.000 U/min und 4 °C pelletiert. Nach Resuspendieren der Membranen in 350 µl Sukrose-Puffer mit Hilfe von Glaskügelchen (Durchmesser: 0,5 mm) im Minilys-Homogenisator (4000 U/min für 10 Sekunden) wurden 20 µM β-Sekretase-Substrat zu 125 µg Protein, welches 1:1 mit 1xPBS (pH 4,5) in einem Endvolumen von 100 µl verdünnt wurde, gegeben und die Fluoreszenz gemäß den in Tabelle 21 gelisteten Parametern in Echtzeit gemessen. Die Verdünnung der Proben mit 1xPBS (pH 4,5) diente der Anpassung des pH-Wertes an ein für die β-Sekretase optimales saures Milieu.

Sukrose-Puffer:

200 mM	Saccharose	
10 mM	Tris/HCl (pH 7,4)	
1 mM	EDTA	in ddH ₂ O

3.2.3.10.7 Bestimmung des Sauerstoff-Verbrauches

(nach Herstellerangaben *Extracellular Oxygen Consumption Assay*, Abcam, Version 2021)

Aussagen über die mitochondriale Funktion sowie die β-Oxidation von SH-SY5Y-WT-Zellen nach Inkubation mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ wurden indirekt durch die Messung des Sauerstoff-Verbrauches mittels *Extracellular Oxygen Consumption*-Analyse getroffen. Nach Inkubation der Zellen mit der additiven Substanz Calcitriol (Kapitel 3.2.2.4) wurde das Kit nach Herstellerangaben angewendet und der multifunktionale, Monochromator-basierte Mikroplatten-Leser *Infinite M1000Pro* (Tecan) herangezogen, um die Fluoreszenz bei einer Anregung von 380 ± 20 nm und einer Emission von 650 ± 20 nm zu detektieren.

3.2.4 Lipidanalytische Methoden

3.2.4.1 Färbung von Lipidtropfen mittels Ölrot O-Lösung

Der fettlösliche nicht-fluoreszierende Azofarbstoff Ölrot O (*Oil Red O*; ORO) wird zum Anfärben von Triacylglyceriden (TAG) in Zellen verwendet. In dieser Arbeit wurde die ORO-Färbung von Lipidtropfen im Lebergewebe von Acitretin- und Kontroll-behandelten Mäusen herangezogen. Die Durchführung der Lipidtropfen-Färbung mittels Ölrot O (Abbildung 28) wurde von Prof. Bianca Schrul und Sen Qiao durchgeführt.

Hierzu wurde das Lebergewebe in Gefriermedium eingebettet und sofort bei -80 °C zum Aushärten eingefroren. Das so eingebettete Gewebe wurde bei -20 °C in 14 µm-Schnitte präpariert, auf Glas-Objektträger aufgebracht und bei -80 °C gelagert. Zur ORO-Färbung wurden die Objektträger zunächst mit 60 % (v/v) Isopropanol für fünf Minuten inkubiert und es folgte eine zehnmünütige Inkubation mit frischer ORO-Arbeitslösung. Die Entfärbung erfolgte durch zwei aufeinanderfolgende Waschschriffe für zwei Minuten in 60 % Isopropanol und Schütteln (100 U/min). Nach drei je ein-minütigen Waschschriffen in Wasser wurden die gefärbten Schnitte mit Fluormount G eingedeckelt. Zur Visualisierung wurden die Schnitte unter Verwendung eines ZEISS *Axio Scan Z1* mit 20-facher Vergrößerung gescannt. Abgebildet ist jeweils eine Maximalintensitätsprojektion von drei Schnitten mit einer Dicke von 1 µm in z-Richtung.

ORO-Stocklösung:

300 mg	ORO
100 ml	Isopropanol (100%)

ORO-Arbeitslösung:

7:5 Verdünnung (v/v) der ORO-Stocklösung mit Wasser

3.2.4.2 Extraktion von Lipiden mittels Fest-Flüssig-Extraktion

(nach (GRIMM et al., 2011a; STAHLMANN, 2018))

Die in dieser Arbeit verwendete Fest-Flüssig-Lipidextraktion bietet den Vorteil, dass eine große Probenanzahl zeitgleich im 96-Vertiefungsplatten-Format mittels Sterilfilterplatte extrahiert werden kann. Alle für die Probenvorbereitung, Lipidextraktion und massenspektrometrische Analyse verwendeten Chemikalien waren von Hochleistungsflüssigkeitschromatographie- (engl. *high-performance liquid chromatography*, HPLC-) Qualität. Die für die Lipidextraktion in Wasser geernteten und homogenisierten Zell- und Gewebeproben (Kapitel 3.2.3.1) wurden mittels BCA-Analyse (Kapitel 3.2.3.2) auf eine einheitliche Proteinkonzentration von 10 mg/ml in HPLC-Wasser eingestellt. Eine 96-Vertiefung-Filterplatte (0,45 µm) wurde auf einer 96-Tiefvertiefungsplatte befestigt und Kreise aus Whatman Blotting-Papier mit einem Durchmesser von 6 mm wurden in jeder Vertiefung der Filterplatte platziert. 1 µl der Lipidstandardmischung I sowie 5 µl der Lipidstandardmischung II wurden nacheinander auf jedes Whatman Blotting-Papier gegeben. Nachdem jeweils 10 µl der zuvor eingestellten Probe auf die entsprechenden Whatman-Kreise zugegeben wurden, erfolgte die Trocknung der Proben unter Stickstoffstrom (1-2 Bar) für 45 Minuten. Es folgte eine 20-minütige Inkubation von 20 µl EtOH/H₂O/Pyridin/PITC-Lösung pro Vertiefung, der sich eine erneute Trocknung unter zuvor beschriebenen Bedingungen anschloss. Die Extraktion der Lipide erfolgte durch Zugabe von 300 µl 4,93 mM Ammoniumacetat in Methanol pro Vertiefung und Schütteln der Platte für 30 min bei 450 U/min, RT auf einem Plattenschüttler. Durch Zentrifugation (2 min, 500 x g, RT) erfolgte der Transfer der Proben auf die 96-Tiefvertiefungsplatte. Nach Verdünnung der extrahierten Lipide mit 600 µl 5 mM Ammoniumacetat in Methanol/Wasser (97:3, v/v; Laufpuffer) wurde die 96-Tiefvertiefungsplatte mit einer durchstechbaren Silikonmatte verschlossen und für weitere zwei Minuten bei 450 U/min und RT geschüttelt, bevor die Lipidproben massenspektrometrisch analysiert wurden (Kapitel 3.2.4.3).

Die durchschnittliche Extraktionseffizienz dieser Methode lag über 80,7 % mit einer Intra-Tagesabweichung von 3,9 % und einer Linearität von $R^2 > 0,96$ (Abbildung 7).

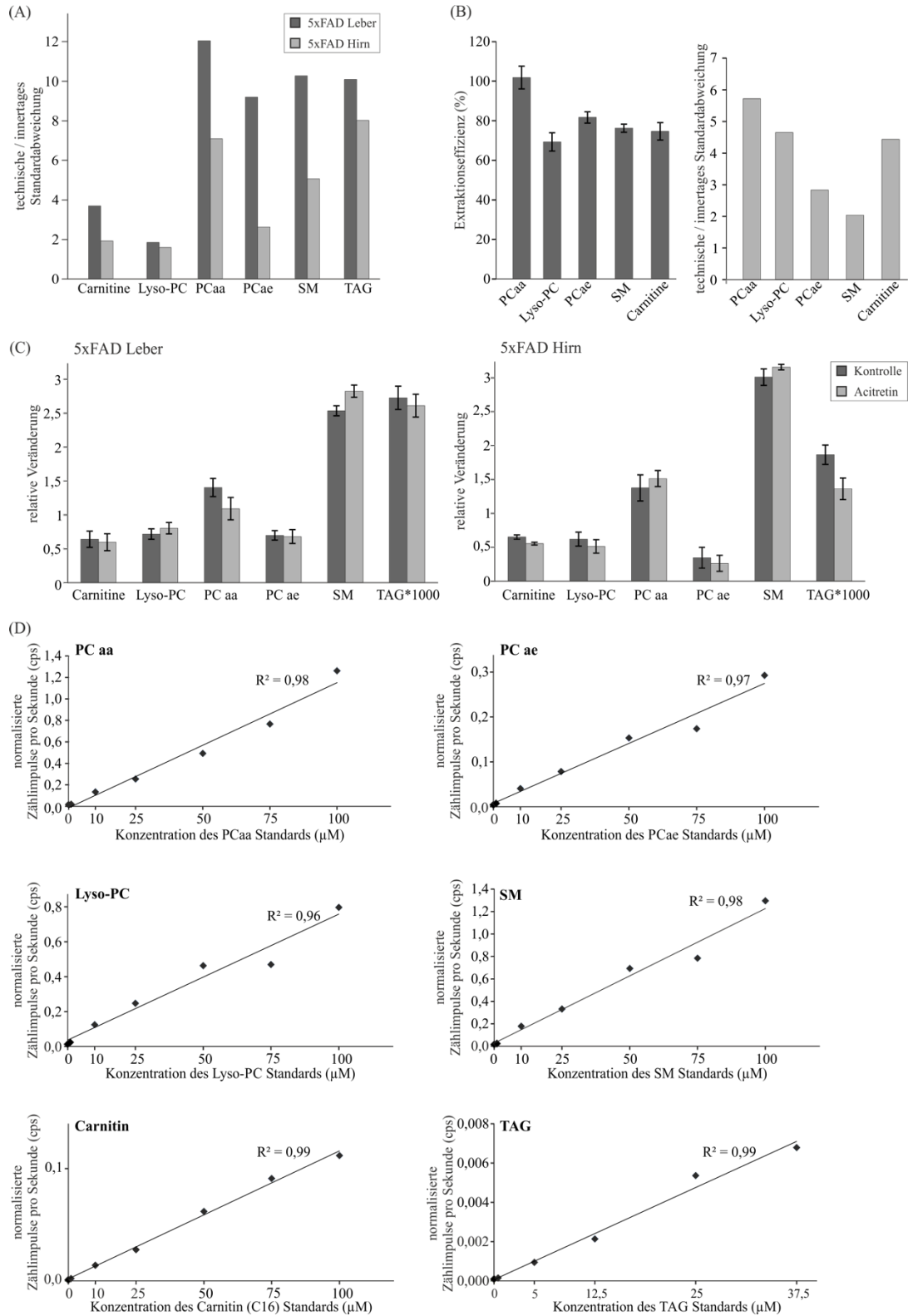


Abbildung 7: Validierung der Lipidextraktion sowie der massenspektrometrischen Methodik. (A) Exemplarische technische / intra-Tages-Standardabweichung im analysierten Leber- und Hirngewebe von 5xFAD-transgenen Mäusen (n = 1). (B) Repräsentative Extraktionseffizienz der analysierten Lipidspezies (links) und entsprechende technische / intra-Tages-Standardabweichung (rechts). (C) Kalkulierte Matrixeffekte der gemessenen Lipidklassen Carnitine, Lyso-Phosphatidylcholine (Lyso-PC), Phosphatidylcholine (PCaa), Phosphatidylcholin-Plasmalogene (PCae), Sphingomyeline (SM) und Triacylglyceride (TAG) in Kontroll- und Acitretin-behandelten 5xFAD-Mäusen. (D) Linearität der gemessenen Lipidklassen und korrespondierende Korrelationskoeffizienten. Standardbalken entsprechen dem Standardfehler. Abbildung verändert nach (LAUER et al., 2021b).

3.2.4.3 Massenspektrometrie

(nach (GRÖSGEN, 2013; STAHLMANN, 2018))

Zur Analyse der Molekülmasse einzelner Ionen wurde in der vorliegenden Arbeit die Methode der Massenspektrometrie (MS) angewendet. Für die Messung verschiedener Diacyl-Phosphatidylcholin- (PCaa-), Phosphatidylcholin-Plasmalogen- (PCae-), Lyso-Phosphatidylcholin- (Lyso-PC-), Diacyl-Phosphatidylethanolamin- (PEaa-), Phosphatidylethanolamin-Plasmalogen- (PEae-), Lyso-Phosphatidylethanolamin- (Lyso-PE-), Acyl- und Acetylcarnitin-, Sphingomyelin- (SM-) und Triacylglycerid- (TAG-) Spezies wurde das vierpolige Spektrometer 4000 QTRAP (*4000-quadropole-linear-ion trap*) der Firma AB Sciex, welches mit einer Turbospray Ionenquelle ausgestattet ist, verwendet.

Bei der Elektronenspray-Ionisation (ESI) handelt es sich um eine „sanfte“ Ionisationsmethode, welche der Erzeugung von Ionen unter Atmosphärendruck dient. Hierzu wird die Lösung mit Analyten pneumatisch durch eine Edelstahlkapillare, an der eine Hochspannung angelegt wird, in einen Stickstoffstrom versprüht und es kommt zu einer Coulomb-Explosion, wobei die Lösungsmitteltröpfchen auf Grund der Abstoßungskräfte zwischen gleichen Ladungen zu winzigen Tröpfchen zerfallen und es zur Bildung freier Ionen kommt. Diese können folgend per Massenanalysator im Hochvakuum nach ihrer Molekülmasse aufgetrennt werden. Je nach angelegter positiver oder negativer ESI-Spannung, entstehen durch die ESI-MS überwiegend einfach-positiv ($[M+H]^+$) oder einfach-negativ ($[M-H]^-$) geladene Ionen. Zusätzlich können sich unterschiedliche Addukte (Anlagerungsprodukte) bilden.

Das 4000QTRAP-Massenspektrometer ist aus vier Quadrupolen (Q0-Q3) und einer integrierten Ionenfalle aufgebaut. Ein Quadrupol besteht aus vier runden, gleichartigen und kreisförmig angeordneten Metallstäben, an welchen eine Gleich- und eine Wechsellspannung mit hoch-frequenter Wechsel angelegt wird, wobei die beiden gegenüberliegenden Stäbe die gleiche Polarität haben. Über die so entstehende Potentialdifferenz werden die Ionen in ihrer Flugachse in der Kreismitte anhand ihres Masse- (m) zu Ladungs- (z) Verhältnisses (m/z) transportiert.

Durch Anlegen spezifischer Spannungen können gewünschte Massen stabilisiert oder destabilisiert werden und es kommt zur Auftrennung der Ionen. Das elektrostatische Feld, welches vom Quadrupol erzeugt wird, stabilisiert lediglich die Flugbahn von Ionen mit einem definierten Masse-Ladungs-Verhältnis. Der Quadrupol fungiert somit als Massenfilter, da nur definierte Massen passieren können und die anderen durch eine Kollision mit den Metallstäben an ihrem Weitertransport gehindert werden. Der periodische Wechsel der Polarität der Spannung zwischen den Elektroden bedingt eine Stabilisierung in x- und z-Richtung für bestimmte Ionenmassen. Die Massenselektion wird durch das Verhältnis U/V von Gleich- und Wechsellspannungsamplitude und die Frequenz bedingt. Bei stabilen Lösungen schwingen die Ionen mit begrenzter Amplitude in x- und z- Richtung und können das Quadrupolfeld durchqueren, während die Schwingungsamplituden bei instabilen Lösungen in x- oder z- Richtung exponentiell anwachsen, was ein Anstoßen an die Elektroden bedingt. Auf mathematischer Ebene sind zwei Parameter, die von der Masse der Teilchen abhängen, für die Eingrenzung der Stabilitätsbereiche verantwortlich und durch eine definierte Wahl dieser Parameter kann erreicht werden, dass nur Teilchen mit der gewünschten Masse den Filter passieren.

Der Quadrupol Q0 dient zu Beginn der Analyse lediglich dem Transport und der Fokussierung der Ionen. Der zweite Quadrupol (Q1) stellt den ersten Massefilter dar, der nur den Transport definierter Massen in den dritten Quadrupol (Q2) zulässt. In Q2 werden die Ionen in einer Kollisionszelle, in welche Stickstoff eingeleitet wird, beschleunigt und durch Kollision mit den Stickstoffmolekülen fragmentiert. Im vierten Quadrupol (Q3), in welchen eine Ionenfalle (*ion trap*) integriert ist, werden die in Q2 entstandenen Molekülfragmente detektiert. Die Ionenfalle erlaubt es auch, Ionen in geringer Konzentration zu detektieren, da sie mit Hilfe einer Ringelektrode definierte Massen stabilisiert, anreichert und dann zum Scannen entlässt.

Die Geräteeinstellungen der 4000QTRAP zur Messung von Phospholipiden, Neutrallipiden und Carnitinen sind in Tabelle 22 aufgelistet.

Tabelle 22: Geräteeinstellung 4000QTRAP zur Detektion von Phospholipiden, Triacylglyceriden und Carnitinen.

Parameter	verwendete Einstellung
Messperiode	drei Minuten
Scan-Typ	MRM (<i>multiple reaction monitoring</i>)
Curtain Gas	20 psi
Kollisionsinduzierte Dissoziation	mittel
Ionenspray Spannung	5500 V
Temperatur	200 °C
Ionenquelle Gas 1	40 psi
Ionenquelle Gas 2	50 psi
Interface Heizer	ein
Eingangspotential	10 V
Kollisionszellenausgangspotential	15 V
Injektionsvolumen	20 µl
Draw Speed	200 µl/min
Eject Speed	200 µl/min
Nadelreinigung	10 Sek

Die Detektion der verschiedenen Lipidspezies in jeder einzelnen biologischen Probe wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit unter Verwendung der Analyst 1.4.2 Software (AB Sciex) in technischen Triplikaten durchgeführt. Das angewandte experimentelle Setup der Fließinjektionsanalyse (engl. *flow injection analysis*, FIA) verwendete einen an das MS angeschlossenen HPLC-Apparat der 1200 Serie von Agilent. Der automatische Probengeber (*Autosampler*) diente dabei der hoch-automatisierten und robusten Probenzufuhr, wodurch Konzentrationsveränderungen und chromatische Beeinträchtigungen vernachlässigt werden konnten und ein kurzer und konzentrierter Probenpuls gewährleistet wurde. Per Autosampler wurden je 20 µl Probe mit einem aus vier verschiedenen Phasen bestehenden Gradienten aus Laufpuffer in das Massenspektrometer injiziert: Phase I (0-1,6 min) 30 µl/min; Phase II (1,6-2,4 min) 30 µl/min; Phase III (2,4-2,8 min) 200 µl/min; Phase IV (2,8-3 min) 200 µl/min).

Die auf diese Weise erhaltenen Daten repräsentieren die Summe der Fettacyl-Kohlenstoffatome sowie die Summe der Doppelbindungen, jedoch nicht die individuelle Komposition der Fettsäuren. Eine weitere Einschränkung dieser Methode ist die Anfälligkeit für isobare Überlagerungen der M+2-Isotope mit dem monoisotopen Peak derjenigen Komponente derselben Lipidklasse, die eine Doppelbindung weniger enthält (KOFELER et al., 2012).

Um diese Limitationen so gering wie möglich zu halten, wurde sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit des Scanmodus *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) bedient, bei welchem in Q1 und Q3 einzelne Ionen selektiv weitertransportiert werden, während die Fragmentierung in Q2 stattfindet. Die gleichzeitige Analyse mehrerer Lipidspezies wird in diesem Modus dadurch ermöglicht, dass die Parameter unter anderem für Q1- und Q3-Masse so optimiert werden, dass es eine spezifische Paarung für jedes Molekül gibt. Die entsprechend gewählten Parameter sind den folgenden einzelnen Abschnitten der jeweiligen Lipidspezies zu entnehmen. Am Beispiel von PCaa 36:0 soll dieses Prinzip verdeutlicht werden: Die Q1-Masse beträgt 790,6 kDa, was der exakten Masse dieser PC-Spezies (789,6 kDa) als positiv geladenes Ion ($[M+H]^+$; $C_{44}H_{89}NO_8P$) entspricht. Die Q3-Masse wird auf 184 kDa definiert, was mit dem m/z der abgespaltenen Kopfgruppe übereinstimmt. Durch diese gepaarte Detektion von Mutter- (PCaa 36:0) und Tochter-Ion (Kopfgruppe) können bis zu 3000 Metabolite simultan und mit größtmöglicher Sensitivität analysiert werden (*Shotgun Lipidomics*). Ein zuvor bereits erwähnter Nachteil dieser Tandem-MS-Methode besteht darin, dass auf Grund der spezifischen Abspaltung der Kopfgruppe keine Aussagen über die an sn1- und sn2-Position gebundenen Fettsäuren im Einzelnen, sondern nur in ihrer Summe, möglich sind. Es kann also nicht differenziert werden, ob es sich bei oben genannter Paarung, welche spezifisch für PCaa 36:0 ist, um PCaa (18:0/18:0) oder um beispielsweise PCaa (16:0/20:0) handelt. Um eine weitere Einschränkung dieses *Lipidomics* Ansatzes, welche darin besteht, dass nicht zwischen (Stereo-) Isomeren und Lipiden, die das identische Fragmentierungsmuster sowie die identische Q1-Masse (Mutter-Ion) haben, unterschieden werden kann, zu minimieren, wurde sich auf Lipide konzentriert, die nach aktuellem Kenntnisstand nicht hochgradig von isobaren Lipiden betroffen sind oder die ein anderes Fragmentierungsmuster im Q3-Scan haben. Diese Lipide sowie die zugehörigen MRM-Parameter, die in den Tabellen 24-28 aufgelistet sind, wurden bereits von anderen Arbeitsgruppen publiziert (BUSZEWSKI et al., 2017; LAUER et al., 2021b; RUCKER et al., 2013; SHUI et al., 2011; ZUKUNFT et al., 2018). Die potenziellen Limitierungen dieses *Shotgun Lipidomics*-Ansatzes sind zusammenfassend in einem Review von Fong-Fu diskutiert (HSU, 2018).

Für jede Lipidanalyse im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden jeweils die Intra- und Intertagesvarianz sowie die potenziellen Matrixeffekte der jeweiligen Lipidklasse bestimmt. Als Matrixeffekte sind die kombinierten Effekte auf die Quantitätsbestimmung ausgehend von allen Komponenten der Probe ausschließlich derer des Analyten selbst definiert und es kann zwischen Unterdrückung und Verstärkung unterschieden werden (STAHNKE et al., 2012). Das bedeutet, dass die Antwort eines Analyten im Massenspektrometer nicht dieselbe in einer Standardlösung verglichen mit der Antwort desselben Analyten in einer biologischen Matrix ist (PANUWET et al., 2016). Die Berechnung potenzieller Matrixeffekte erfolgte durch Bildung der Quotienten der verwendeten Lipidstandards (Tabelle 23) in Anwesenheit von Lipidextrakten der Kontroll- und Analyse-Proben (Abbildung 7).

Tabelle 23: Im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete Lipidstandards.

Lipidspezies	verwendeter Standard	Hersteller
Phosphatidylcholine	06:0 PC (DHPC)	Avanti Polar Lipids
Lyso-Phosphatidylcholine	19:0 Lyso PC	Avanti Polar Lipids
Phosphatidylethanolamine	08:0 PE	Avanti Polar Lipids
Sphingomyeline	06:0 SM (d18:1/6:0)	Avanti Polar Lipids
Triacylglyceride	Splash II Lipidomix Mass Spec	Avanti Polar Lipids
	Internal Standard: 15:0-18:1(d7)-15:0 TG	
Phosphatidylcholine Plasmalogene	Splash II Lipidomix Mass Spec	Avanti Polar Lipids
	Internal Standard: C18(Plasm)-18:1(d9) PC	
Carnitine	Octanoyl-L-Carnitin D3 und Palmitoyl-L-Carnitin D3	Supelco Analytical

3.2.4.3.1 Detektion von Phosphatidylcholinen mittels ESI-MS/MS

Die massenspektrometrische Analyse der Lipidklasse der Phosphatidylcholine umfasste neben den Diacyl-Phosphatidylcholinen (PCaa) auch die Phosphatidylcholin-Plasmalogene (PCae) sowie die Lyso-Phosphatidylcholine (Lyso-PC). Die spezifische Detektion mittels MRM-Methode beruhte dabei auf der Fragmentierung der Kopfgruppe von 184 m/z. Dieses Fragmentierungsmuster für Phosphatidylcholin ist in Abbildung 8 exemplarisch an der Spezies PC (16:0/18:1) dargestellt.

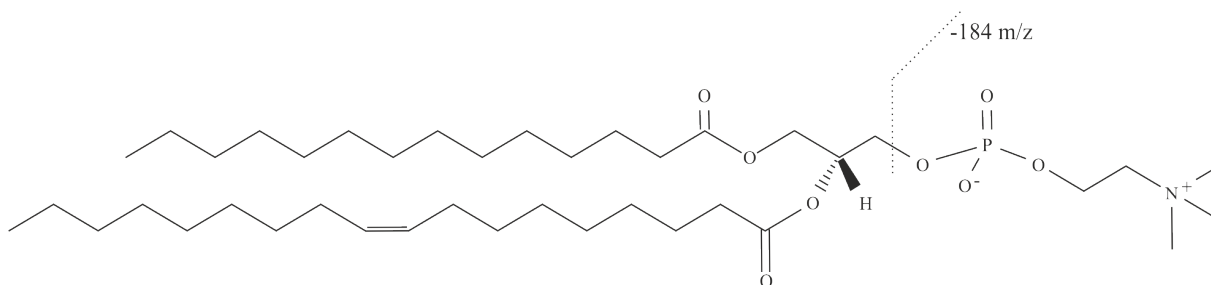


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Fragmentierungsmusters für Phosphatidylcholin. Als repräsentatives Beispiel wurde PC (16:0/18:1) herangezogen und die Abspaltung der Kopfgruppe (184 m/z) hervorgehoben. Die Strukturformel wurde verändert nach lipidmaps.org.

Die entsprechenden Q1-Q3-Übergänge sowie die Metabolit-spezifischen *Declustering*-Potenziale (DP) und Kollisionsenergien (CE) sind in Tabelle 24 aufgelistet.

Tabelle 24: Im Rahmen der Phosphatidylcholin-spezifischen MRM-Analyse verwendete Parameter. PCaa: Diacyl-Phosphatidylcholin; PCae: Phosphatidylcholin-Plasmalogen; Lyso-PC: Lyso-Phosphatidylcholin; DP: *declustering potential*; CE: *collision energy*.

PC-Spezies	Vorläufer-Ion m/z [M+H] ⁺	Produkt-Ion m/z [M+H] ⁺	DP [V]	CE [eV]
PC aa C20:0	566,2	184	94	31
PC aa C24:0	622,4	184	98	33
PC aa C26:0	650,5	184	103	35
PC aa C28:0	678,5	184	106	35

PC aa C28:1	676,5	184	106	35
PC aa C30:0	706,5	184	114	37
PC aa C30:2	702,5	184	111	37
PC aa C32:0	734,6	184	119	39
PC aa C32:1	732,6	184	118	39
PC aa C32:2	730,5	184	117	38
PC aa C32:3	728,5	184	117	38
PC aa C34:1	760,6	184	125	41
PC aa C34:2	758,6	184	123	40
PC aa C34:3	756,6	184	123	40
PC aa C34:4	754,5	184	122	40
PC aa C36:0	790,6	184	131	43
PC aa C36:1	788,6	184	131	43
PC aa C36:2	786,6	184	130	42
PC aa C36:3	784,6	184	130	42
PC aa C36:4	782,6	184	129	42
PC aa C36:5	780,6	184	128	42
PC aa C36:6	778,5	184	128	42
PC aa C38:0	818,7	184	138	45
PC aa C38:1	816,7	184	138	45
PC aa C38:3	812,6	184	136	44
PC aa C38:4	810,6	184	136	44
PC aa C38:5	808,6	184	136	44
PC aa C38:6	806,6	184	135	44
PC aa C40:0	846,7	184	145	47
PC aa C40:1	844,7	184	145	47
PC aa C40:2	842,7	184	144	47
PC aa C40:3	840,7	184	144	47
PC aa C40:4	838,6	184	144	47
PC aa C40:5	836,6	184	143	47
PC aa C40:6	834,6	184	143	46
PC aa C42:0	874,7	184	154	50
PC aa C42:1	872,7	184	153	50
PC aa C42:2	870,7	184	153	50
PC aa C42:4	866,7	184	152	50
PC aa C42:5	864,7	184	151	49
PC aa C42:6	862,6	184	150	49
PC aa C44:0	902,7	184	163	50
PC aa C48:0	958,8	184	170	50
PC ae C30:0	692,6	184	111	37
PC ae C30:1	690,5	184	109	36
PC ae C30:2	688,5	184	108	36
PC ae C32:1	718,6	184	115	38
PC ae C32:2	716,6	184	114	37
PC ae C34:0	748,6	184	122	40
PC ae C34:1	746,6	184	121	39
PC ae C34:2	744,6	184	120	39
PC ae C34:3	742,6	184	120	39
PC ae C36:0	776,7	184	128	42
PC ae C36:1	774,6	184	127	41
PC ae C36:2	772,6	184	127	41
PC ae C36:3	770,6	184	126	41
PC ae C36:4	768,6	184	126	41
PC ae C36:5	766,6	184	125	41
PC ae C38:0	804,7	184	135	44
PC ae C38:1	802,7	184	134	44
PC ae C38:2	800,7	184	133	43
PC ae C38:3	798,6	184	133	43

PC ae C38:4	796,6	184	133	43
PC ae C38:5	794,6	184	132	43
PC ae C38:6	792,6	184	132	43
PC ae C40:0	832,7	184	142	46
PC ae C40:1 / PC aa C40:8	830,7	184	141	46
PC ae C40:2	828,7	184	141	46
PC ae C40:3 / PC aa C40:10	826,7	184	140	46
PC ae C40:4	824,7	184	140	45
PC ae C40:5	822,6	184	139	45
PC ae C40:6	820,6	184	139	45
PC ae C42:0	860,8	184	150	49
PC ae C42:1	858,7	184	141	46
PC ae C42:2	856,7	184	149	48
PC ae C42:3	854,7	184	148	48
PC ae C42:4	852,7	184	148	48
PC ae C42:5	850,7	184	147	48
PC ae C44:3	882,7	184	156	51
PC ae C44:4	880,7	184	156	51
PC ae C44:5 / PC aa C44:12	878,7	184	155	51
PC ae C44:6	876,7	184	154	50
Lyso PC 06:0	356,2	184	72	31
Lyso PC 10:0	412,3	184	76	30
Lyso PC 12:0	440,4	184	78	30
Lyso PC 14:0	468,3	184	79	30
Lyso PC 16:0	496,3	184	81	31
Lyso PC 16:1	494,3	184	79	30
Lyso PC 17:0	510,3	184	82	31
Lyso PC 18:0	524,3	184	85	31
Lyso PC 18:1	522,3	184	82	31
Lyso PC 18:2	520,3	184	82	31
Lyso PC 18:3	518,4	184	82	31
Lyso PC 20:0	552,4	184	89	31
Lyso PC 20:3	546,3	184	87	31
Lyso PC 20:4	544,3	184	85	31
Lyso PC 20:5	542,4	184	84	31
Lyso PC 22:0	580,5	184	93	32
Lyso PC 22:6	568,4	184	90	32
Lyso PC 24:0	608,4	184	96	33
Lyso PC 26:0	636,5	184	101	34
Lyso PC 26:1	634,4	184	98	33
Lyso PC 28:0	664,5	184	105	35
Lyso PC 28:1	662,5	184	103	35

3.2.4.3.2 Detektion von Phosphatidylethanolaminen mittels ESI-MS/MS

In der Lipidklasse der Phosphatidylethanolamine umfasste die massenspektrometrische Analyse die Diacyl-Phosphatidylethanolamine (PEaa), die Phosphatidylethanolamin-Plasmalogene (PEae) und die Lyso-Phosphatidylethanolamine (Lyso-PE). Die spezifische Detektion mittels MRM-Methode beruhte auf der Abspaltung eines Fragmentes von 141 m/z, welches der Kopfgruppe entspricht. Dieses Fragmentierungsmuster für Phosphatidylethanolamine ist in Abbildung 9 exemplarisch an der Spezies PE (16:0/18:1) dargestellt.

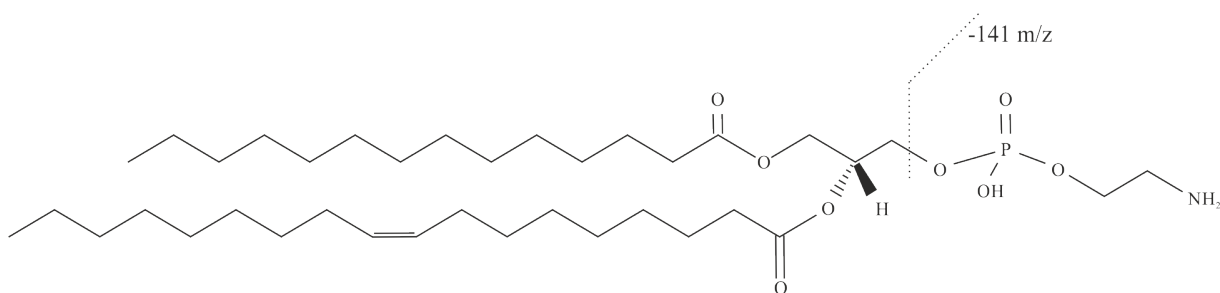


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Fragmentierungsmusters für Phosphatidylethanolamin. Als repräsentatives Beispiel wurde PE (16:0/18:1) herangezogen und die Abspaltung der Kopfgruppe (141 m/z) hervorgehoben. Die Strukturformel wurde verändert nach lipidmaps.org.

Die entsprechenden Q1-Q3-Übergänge sowie die Metabolit-spezifischen *Declustering*-Potenziale und Kollisionsenergien sind in Tabelle 25 aufgeführt.

Tabelle 25: Im Rahmen der Phosphatidylethanolamin-spezifischen MRM-Analyse verwendete Parameter. PEaa: Diacyl-Phosphatidylethanolamin; PEae: Phosphatidylethanolamin-Plasmalogen; Lyso-PE: Lyso-Phosphatidylethanolamin; DP: *declustering potential*; CE: *collision energy*.

PE-Spezies	Vorläufer-Ion m/z [M+H] ⁺	Produkt-Ion m/z [M+H] ⁺	DP [V]	CE [eV]
PE aa 32:0	692,5	551,5	64	29
PE aa 32:1	690,5	549,5	64	29
PE aa 32:2	688,5	547,5	64	29
PE aa 34:0	720,5	579,5	67	30
PE aa 34:1	718,5	577,5	66	30
PE aa 34:2	716,5	575,5	66	30
PE aa 34:3	714,5	573,5	66	30
PE aa 34:4	712,5	571,5	66	30
PE aa 36:0	748,6	607,6	69	31
PE aa 36:1	746,6	605,6	69	31
PE aa 36:2	744,6	603,6	68	31
PE aa 36:3	742,6	601,6	68	31
PE aa 36:4	740,6	599,6	68	31
PE aa 36:5	738,6	597,6	68	31
PE aa 36:6	736,6	595,6	68	31
PE aa 38:0	776,7	635,6	71	32
PE aa 38:1	774,7	633,6	71	32
PE aa 38:2	772,6	631,6	71	32
PE aa 38:3	770,6	629,6	71	32
PE aa 38:4	768,6	627,6	70	32
PE aa 38:5	766,6	625,6	70	32
PE aa 38:6	764,6	623,6	70	31
PE aa 40:0	804,6	663,6	74	33
PE aa 40:1	802,7	661,7	73	33
PE aa 40:2	800,7	659,7	73	33
PE aa 40:3	798,6	657,6	73	33
PE aa 40:4	796,7	655,6	73	33
PE aa 40:5	794,6	653,6	73	33
PE aa 40:6	792,6	651,6	73	32
PE aa 42:0	832,7	691,6	76	34
PE aa 42:1	830,7	689,6	76	34
PE aa 42:2	828,7	687,6	76	34

PE aa 42:4	824,7	683,6	75	34
PE aa 42:5	822,7	681,6	75	34
PE aa 42:6	820,7	679,6	75	33
PE ae 32:1	676,6	535,5	61	27
PE ae 32:2	674,6	533,5	61	27
PE ae 34:0	706,6	565,5	64	28
PE ae 34:1	704,7	563,6	64	28
PE ae 34:2	702,6	561,5	64	28
PE ae 34:3	700,6	559,5	64	28
PE ae 36:0	734,6	593,5	67	29
PE ae 36:1	732,6	591,5	67	29
PE ae 36:2	730,6	589,5	67	29
PE ae 36:3	728,6	587,6	66	29
PE ae 36:4	726,6	585,5	66	29
PE ae 36:5	724,7	583,6	66	29
PE ae 38:0	762,6	621,6	70	30
PE ae 38:1	760,6	619,6	70	30
PE ae 38:2	758,6	617,6	69	30
PE ae 38:3	756,6	615,6	69	30
PE ae 38:4	754,6	613,6	69	30
PE ae 38:5	752,6	611,6	69	30
PE ae 38:6	750,6	609,6	69	30
PE ae 40:0/PE aa 40:7	790,6	649,6	73	31
PE ae 40:1	788,7	647,6	73	31
PE ae 40:2	786,7	645,6	72	31
PE ae 40:3	784,6	643,6	72	31
PE ae 40:4	782,6	641,6	72	31
PE ae 40:5	780,6	639,6	72	31
PE ae 40:6	778,6	637,6	72	31
PE ae 42:0/PE aa 42:7	818,7	677,6	76	32
PE ae 42:1	816,7	675,6	76	32
PE ae 42:2	814,7	673,6	75	32
PE ae 42:3	812,7	671,6	75	32
PE ae 42:4	810,7	669,6	75	32
PE ae 42:5	808,7	667,6	75	32
PE ae 44:2	842,7	701,6	79	33
PE ae 44:3	840,7	699,6	78	33
PE ae 44:4	838,7	697,6	78	33
PE ae 44:5	836,7	695,6	78	33
PE ae 44:6	834,7	693,6	78	32
Lyso PE 16:0	454,3	313,2	54	23
Lyso PE 16:1	452,3	311,2	54	23
Lyso PE 18:0	482,3	341,3	55	24
Lyso PE 18:1	480,3	339,3	54	24
Lyso PE 18:2	478,3	337,3	54	24
Lyso PE 20:0	510,4	369,4	55	25
Lyso PE 20:3	504,4	363,2	55	25
Lyso PE 20:4	502,4	361,3	55	24
Lyso PE 22:6	526,4	385,2	56	25

3.2.4.3.3 Detektion von Sphingomyelinen mittels ESI-MS/MS

Die Sphingomyeline (SM) sind Vertreter der Sphingolipide, gehören aber gleichzeitig auch, als einziger Vertreter ihrer Klasse, zu den Phospholipiden. Ähnlich zur Detektion der Phosphatidylcholin-Spezies wurde auch hier die Kopfgruppe zur positiven Ionisierung im Rahmen der massenspektrometrischen Analyse herangezogen. Die Analyse im MRM-Modus fokussierte dabei auf das positiv geladene Sphingomyelin-Vorläufer-Ion in Q1 und die abgespaltene Kopfgruppe (184 m/z) im vierten Quadrupol (Q3). Dieses Fragmentierungsmuster für Sphingomyeline ist in Abbildung 10 exemplarisch an der Spezies SM (d18:1/16:0) dargestellt.

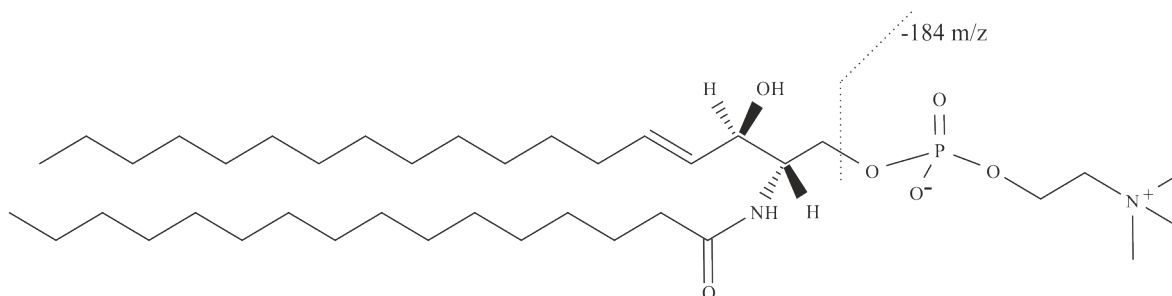


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Fragmentierungsmusters für Sphingomyeline. Als repräsentatives Beispiel wurde SM (d18:1/16:0) herangezogen und die Abspaltung der Kopfgruppe (184 m/z) hervorgehoben. Die Strukturformel wurde verändert nach lipidmaps.org.

Die Anwendung der Tandem-Massenspektrometrie ließ dabei auf Grund spezifischer Q1-Massen die Unterscheidung zwischen Phosphatidylcholinen und Sphingomyelinen zu. Die entsprechenden Q1-Q3-Übergänge sowie die Metabolit-spezifischen *Declustering*-Potenziale und Kollisionsenergien sind in Tabelle 26 aufgeführt.

Tabelle 26: Im Rahmen der Sphingomyelin-spezifischen MRM-Analyse verwendete Parameter. SM: Sphingomyelin; DP: declustering potential; CE: collision energy.

SM-Spezies	Vorläufer-Ion m/z [M+H] ⁺	Produkt-Ion m/z [M+H] ⁺	DP [V]	CE [eV]
SM C32:2 OH	689,6	184	108	36
SM C34:1	703,6	184	112	37
SM C34:2	701,6	184	111	37
SM C34:2 OH	717,6	184	114	38
SM C36:1	731,6	184	117	38
SM C36:2	729,6	184	117	38
SM C38:3	755,6	184	123	40
SM C40:2 OH	801,7	184	134	43
SM C40:3 OH	799,7	184	133	43
SM C40:4	781,6	184	129	42
SM C42:1	815,7	184	137	45
SM C42:2	813,7	184	137	45
SM C42:2 OH	829,7	184	141	46
SM C44:1	843,7	184	145	47
SM C44:2	841,7	184	144	47

3.2.4.3.4 Detektion von Triacylglyceriden mittels ESI-MS/MS

Triacylglyceride (TAG) sind wichtige Nahrungsbestandteile und stellen als Neutrallipide die Speicherform der Fettsäuren dar. Sie sind aus einem Molekül Glycerin und drei veresterten Fettsäuren aufgebaut und liegen intrazellulär in Adipozyten des Fettgewebes in Form von Lipidtropfen vor. Als essenzielle Energieträger können sie unter anderem aus ihrer im Fettgewebe gespeicherten Form mobilisiert und unter Freisetzung von Energie metabolisiert werden. In dieser Arbeit erfolgte die massenspektrometrische Detektion von TAG-Ammonium-Addukten ($[M+NH_4]^+$) im MRM-Modus, was bedeutet, dass ein TAG-Vorläufer-Ion so fragmentiert wurde, dass es eine neutrale Fettsäurekette verlor (MURPHY et al., 2007). Beispielsweise wurde das Ammonium-Addukt von TAG 18:2-18:2-18:3 ($m/z [M+NH_4]^+ 894,8$) nach Q1-Detektion in Q2 kollisionsinduziert fragmentiert, wodurch ein neutrales Fragment ($18:3 + NH_3$) mit $m/z 295$ abgespalten wurde und das resultierende Diacylglycerid (DAG) 18:2-18:2 ($m/z [M+H-H_2O]^+ 599$) in Q3 gescannt wurde (LI et al., 2014). Dieses Fragmentierungsmuster für Triacylglyceride ist in Abbildung 11 exemplarisch an der Spezies TG (18:2/18:2/18:3) dargestellt.

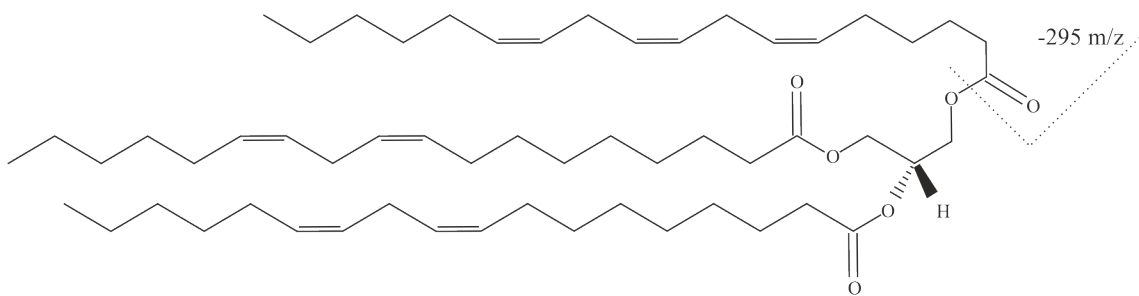


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Fragmentierungsmusters für Triacylglyceride. Als repräsentatives Beispiel wurde TG (18:2/18:2/18:3) herangezogen und die Abspaltung der Fettsäure 18:3 (295 m/z) hervorgehoben. Die Strukturformel wurde verändert nach lipidmaps.org.

In Analogie zu Li *et al.* (2014) wurden für die Detektion verschiedener TAG-Spezies eine Kollisionsenergie von +25 V sowie ein *Declustering*-Potential von +100 V festgesetzt (LI et al., 2014). Die entsprechenden Q1-Q3-Übergänge sind in Tabelle 27 aufgeführt.

Tabelle 27: Im Rahmen der Triacylglycerid-spezifischen MS-Analyse verwendete Parameter. TG: Triacylglycerid.

TG-Spezies	Vorläufer-Ion $m/z [M+H]^+$	Produkt-Ion $m/z [M+H]^+$
TG C48:0	824,8	551,8
TG C50:3	846,8	573,8
TG C50:2	848,8	575,8
TG C50:1	850,8	577,8
TG C50:0	852,8	579,8
TG C52:6	868,7	595,7
TG C52:5	870,8	597,8
TG C52:4	872,8	599,8
TG C52:3	874,8	601,8
TG C52:2	876,8	603,8
TG C52:1	878,8	605,8

TG C52:0	880,8	607,8
TG C54:9	890,7	595,7
TG C54:8	892,7	597,7
TG C54:7	894,8	599,8
TG C54:6	896,8	601,8
TG C54:5	898,8	625,8
TG C54:4	900,8	627,8
TG C54:3	902,8	629,8
TG C54:2	904,8	631,8
TG C54:1	906,9	633,9
TG C56:8	920,8	625,8
TG C56:7	922,8	627,8
TG C56:6	924,8	629,8
TG C56:5	926,8	631,8
TG C56:4	928,8	633,8
TG C56:3	930,9	635,9
TG C56:2	932,9	659,9
TG C56:1	934,9	661,9
TG C58:7	950,8	655,8
TG C58:6	952,8	657,8
TG C58:5	954,8	659,8
TG C58:4	956,9	661,9
TG C58:3	958,9	663,9
TG C58:2	960,9	659,9
TG C60:6	980,9	685,9
TG C60:5	982,9	687,9
TG C60:4	984,9	689,9
TG C60:3	986,9	687,9

3.2.4.3.5 Detektion von Carnitinen mittels ESI-MS/MS

Die Carnitine spielen eine essenzielle Rolle bei der β -Oxidation der Fettsäuren, da sie das Carnitin-*Carrier*-System stellen, durch welches Fettsäuren in die Mitochondrien, den Ort der β -Oxidation, transportiert werden. In der vorliegenden Arbeit erfolgten die massenspektrometrischen Detektionen von Carnitin, Acetylcarnitin und Acylcarnitin anhand der spezifischen Abspaltung des $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH}$ -Fragments mit einer Masse von 85,1 Da im MRM-Modus. Dieses Fragmentierungsmuster für Carnitine ist in Abbildung 12 exemplarisch an der Spezies Carnitin C18:1 dargestellt.

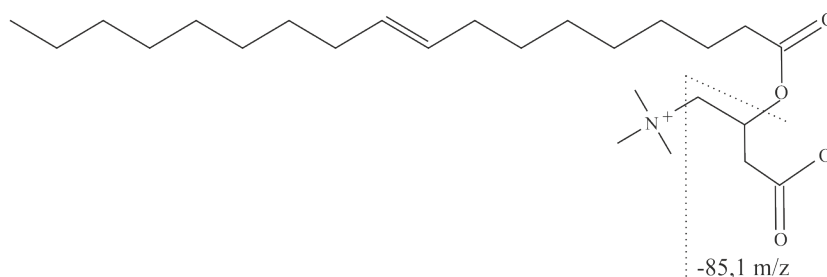


Abbildung 12: Schematische Darstellung des Fragmentierungsmusters für Carnitine. Als repräsentatives Beispiel wurde Carnitin C18:1 herangezogen und die Abspaltung des $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH}$ -Fragments hervorgehoben. Die Strukturformel wurde verändert nach lipidmaps.org.

Die entsprechenden Q1-Q3-Übergänge sowie die Metabolit-spezifischen *Declustering*-Potenziale und Kollisionsenergien sind in Tabelle 28 aufgeführt.

Tabelle 28: Im Rahmen der Carnitin-spezifischen MRM-Analyse verwendete Parameter. DP: declustering potential; CE: collision energy. Die Acylcarnitine sind als „C” beschriftet, dem sich die Kettenlänge sowie die Anzahl an Doppelbindungen, getrennt durch einen Doppelpunkt, anschließt. Das in manchen Fällen folgende „OH“ repräsentiert eine Hydroxylgruppe und die Abkürzung „DC“ steht für eine Dicarbonsäure.

Carnitin-Spezies	Vorläufer-Ion m/z [M+H] ⁺	Produkt-Ion m/z [M+H] ⁺	DP [V]	CE [eV]
C00	162,1	85,1	61	27
C02	204,1	85,1	41	27
C03	218,1	85,1	46	29
C03 OH	234,1	85,1	53	30
C03:1	216,1	85,1	49	27
C04	232,2	85,1	46	29
C04 OH	248,1	85,1	55	32
C04:1	230,1	85,1	52	29
C05	246,2	85,1	46	29
C05 M DC	290,2	85,1	63	37
C05 OH	262,2	85,1	58	33
C05:1	244,2	85,1	55	31
C05:1 DC	274,1	85,1	60	35
C06	260,2	85,1	56	27
C06 OH	276,2	85,1	61	35
C06:1	258,2	85,1	57	33
C07 DC	304,2	85,1	66	39
C08	288,2	85,1	66	33
C08:1	286,2	85,1	63	37
C09	302,2	85,1	66	39
C10	316,2	85,1	56	37
C10:1	314,2	85,1	68	40
C10:2	312,2	85,1	67	40
C12	344,3	85,1	73	44
C12 DC	374,3	85,1	86	45
C12:1	342,3	85,1	73	44
C14	372,3	85,1	86	45
C14:1	370,3	85,1	78	47
C14:1 OH	386,3	85,1	81	50
C14:2	368,3	85,1	78	47
C14:2 OH	384,3	85,1	81	49
C16	400,3	85,1	84	51
C16 OH	416,3	85,1	87	53
C16:1	398,3	85,1	84	51
C16:1 OH	414,3	85,1	87	53
C16:2	396,3	85,1	83	51
C16:2 OH	412,3	85,1	86	53
C18:0	428,4	85,1	96	63
C18:1	426,4	85,1	89	55
C18:1 OH	442,4	85,1	92	57
C18:2	424,3	85,1	89	54

3.2.5 Statistische Datenauswertung

3.2.5.1 Statistische Analyse

Die in der vorliegenden Arbeit ausgeführten statistischen Analysen erfolgten mit den Programmen IBM SPSS Statistik (Version 25) und R (R Core Team 2020; <https://www.r-project.org>) in Kooperation mit Daniel Janitschke.

Alle quantifizierten Daten repräsentieren den Mittelwert von mindestens drei unabhängigen Experimenten bzw. biologischen Proben. Zur Überprüfung der Gauß- oder Normalverteilung der Daten, welche Voraussetzung für einige angewandte interferenzstatistische Tests ist, wurden die quantitativen Methoden des Shapiro-Wilk- und des Kolmogorov-Smirnov-Tests verwendet. Die Grundlage beider Tests stellt ein Vergleich der Ergebnisse der Stichprobe der Studie mit einer normalverteilten Gruppe von Ergebnissen mit demselben Mittelwert und derselben Standardabweichung dar, wobei die Nullhypothese einer Normalverteilung gilt (GHASEMI, ZAHEDIASL, 2012). Der Shapiro-Wilk Test, der für kleinere Stichprobengrößen ($n \leq 50$) geeignet ist und eine größere statistische Leistung im Vergleich zum Kolmogorov-Smirnov-Test besitzt (VETTER, 2017), wird als Mittel zur Bewertung der Datennormalität empfohlen. In der guten wissenschaftlichen Praxis werden beide Tests auf Grund ihrer schnellen Durchführbarkeit, Objektivität und unkomplizierten Interpretation häufig kombiniert eingesetzt. Als Nachteil muss beachtet werden, dass sie im Falle kleiner Stichproben zu liberal und für größere Stichproben hingegen zu streng sein könnten, weshalb eine zusätzliche visuelle Beurteilung der Verteilung, beispielsweise mittels Histogramms oder Q-Q-Plot, erfolgen sollte. Neben der Überprüfung der Normalverteilung dient der Levene-Test der Beurteilung der Varianzhomogenität.

Die statistische Signifikanz wurde mittels zweiseitigem Student-t-Test, wenn es sich um den Vergleich der Mittelwerte zweier unabhängiger Stichproben handelte, oder einfaktorierter Varianzanalyse (engl. *analysis of variances*, ANOVA), welche die Mittelwerte mehrere Gruppen miteinander vergleicht, kombiniert mit Post-hoc-Tests, kalkuliert. Wurde die Hypothese der Varianzhomogenität verletzt, wurde die statistische Signifikanz mittels Welch-Test berechnet. Waren die Daten nicht normalverteilt, wurde der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-H-ANOVA-Test angewendet. Wurden mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen und resultierte der Kruskal-Wallis-H-Test in einem signifikanten Ergebnis, wurde der paarweise Vergleich mittels Dunn-Post-hoc-Test oder Wilcoxon-Test kombiniert mit einer Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Resultierte die ANOVA in einem signifikanten Unterschied, wurde entweder der zweiseitige Dunnett-Post-hoc-Test oder der Tukey-HSD-Test herangezogen, um statistische Differenzen zwischen Gruppen zu analysieren. Dem Welch-ANOVA-Test folgte der Games-Howell-Post-hoc-Test.

Die dargestellten Korrelationskoeffizienten wurden nach der Methode von Pearson berechnet, wenn die Daten normalverteilt vorlagen oder eine Stichprobengröße > 200 gegeben war (GHASEMI, ZAHEDIASL, 2012). Im Falle nicht-normalverteilter Daten wurde der Spearman-Korrelationskoeffizient angegeben.

3.2.5.2 Auswertung lipidanalytischer Daten

Die Analyst 1.4.2. Software (AB Sciex) wurde verwendet, um die Zählungen pro Sekunde (engl. *counts per second*, cps) für jede MRM-Paarung zu extrahieren. Nach Normierung jedes analysierten Lipides auf den Standard seiner entsprechenden Lipidklasse erfolgte die Bildung des Mittelwertes jedes Quotienten (Lipid/Standard) aus den technischen Triplikaten.

Berechnet wurden die relativen Häufigkeiten der analysierten Lipidspezies in den biologischen Proben von Interesse im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollproben. Zur Analyse und Darstellung der Verteilung einer Lipidspezies innerhalb einer Lipidklasse wurde das Signal einer Lipidspezies durch die Summe der Signale der entsprechenden Lipidklasse dividiert, beispielsweise PCaa Spezies X/Gesamt-PCaa. Die Berechnung des P-Wertes für die einzelnen Lipidparameter, welche in den Volcano Plots dargestellt sind (Kapitel 3.2.5.3), wurde mit dem zweiseitigen Student-t-Test durchgeführt. Die statistische Analyse der mittleren Lipidklasseneffekte im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle wurde mittels zweiseitigem Einstichproben-t-Test ausgeführt, während für die Beurteilung der Differenzen des mittleren Lipidklasseneffektes zwischen zwei Gewebetypen der zweiseitige Student-t-Test herangezogen wurde. Die Ermittlung der Signifikanz der Verteilung derjenigen Lipide, die eine Effektstärke größer des durchschnittlichen Standardfehlers dieser Lipidklasse hatten, wurde per Binomial-Test mit einer 50 %-igen Wahrscheinlichkeit des Auftretens erhöhter Lipide durchgeführt. Bei dem Binomial-Test handelt es sich um die Überprüfung der Häufigkeitsverteilung einer dichotomen Variablen mit zwei Ausprägungen in der Stichprobe im Vergleich zu der theoretisch erwarteten Auftretungswahrscheinlichkeit. Zur Überprüfung, ob die Verteilung der reduzierten bzw. erhöhten Lipidspezies sich zwischen den getesteten Geweben oder Versuchsbedingungen signifikant unterscheidet, wurde der Exakte Fisher Test (*fisher's exact test*) herangezogen.

3.2.5.3 Graphische Datendarstellung

Die in der vorliegenden Arbeit abgebildeten Volcano Plots wurden mit Hilfe des R-Pakets „Enhanced Volcano“ (Kevin Blighe, Sharmila Rana and Myles Lewis (2020), Version 1.6.0; <https://github.com/kevinblighe/EnhancedVolcano>) erstellt. Volcano Plots dienen zur Darstellung der relativen Änderungen in den analysierten Lipidspezies (Kapitel 3.2.4.3), wobei die relativen Änderungen (Abszisse) gegen das Signifikanzniveau (Ordinate) geblottet wurden. Die beiden vertikalen Linien markieren den durchschnittlichen Standardfehler, welcher für jede Lipidspezies individuell berechnet und angegeben wurde. Die horizontale Linie repräsentiert das Signifikanzniveau von $p = 0,05$ und somit waren alle Lipidspezies, die sich oberhalb dieser Markierung befinden, statistisch signifikant verändert. Da die Definition der Signifikanz von der verwendeten statistischen Methode und beispielsweise der Wahl der Korrektur für Fehler der ersten Art, sowie von der Probenanzahl abhängig ist und somit einen willkürlichen Aspekt hat, wurden im Rahmen dieser Arbeit alle Lipidspezies, die eine Veränderung größer des durchschnittlichen Standardfehlers aufweisen, in die Interpretation einbezogen. In diesem Kontext sollte beachtet werden, dass die Verteilung der Lipide innerhalb einer Lipidklasse mit chemischen Ähnlichkeiten, neben der Signifikanz einzelner Lipidspezies, sowohl für zelluläre als auch *in vivo* Effekte von Relevanz sein kann. Basierend auf dieser Intention wurden zur Darstellung der Ergebnisse der Lipidomanalyse Volcano Plots bevorzugt. Dies erlaubte es, die Verteilung einer Lipidspezies innerhalb einer Lipidklasse zu evaluieren. Eine ausschließliche Fokussierung auf die signifikanten Parameter hätte möglicherweise den Verlust dieser Informationen bedingt.

Die dargestellten Abbildungen wurden unter Verwendung von CorelDRAW 11 (Corel Kooperation) angefertigt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardfehler des Mittelwerts (engl. *standard error of the mean*, SEM) und die statistische Signifikanz wurde als * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$ festgesetzt.

4 Ergebnisse

4.1 Analyse des potenziellen Zusammenhangs zwischen dem Secosteroid Vitamin D und der Pathologie der Alzheimererkrankung

Neben der bekannten Funktion von Vitamin D in der Kalzium-Homöostase wurde beschrieben, dass einige Enzyme und Rezeptoren, die in die Vitamin D-Metabolisierung involviert sind, auch im Nervensystem und Gehirn exprimiert werden. Dies lässt ebenfalls eine wichtige Rolle dieses Vitamins in der Hirn-Homöostase vermuten, welche durch die Ergebnisse einer Vielzahl epidemiologischer und klinischer Studien, von denen einige einleitend vorgestellt wurden, untermauert wird. So wurde unter anderem gezeigt, dass reduzierte Vitamin D-Spiegel, von denen circa 85 % der älteren Bevölkerung in den westlichen Ländern betroffen sind (ANNWEILER et al., 2011), mit einem erhöhten Risiko für einige neurodegenerative Erkrankungen zusammenhängen (Kapitel 2.2.2 und 2.2.3).

Während eine positive Korrelation zwischen Vitamin D-Mangel und dem Alzheimerisiko in der Literatur einheitlich beschrieben wurde, sind der Mechanismus, welcher die Alzheimererkrankung und Vitamin D verbindet, sowie ein potenzieller kausaler Zusammenhang Gegenstand der aktuellen Forschung. In einer der vorliegenden Arbeit vorausgegangenen Studie der Experimentellen Neurologie wurde unter Zuhilfenahme eines Mausmodells mit einer 23 %-igen Hypovitaminose D (Kapitel 3.1.4.2) eine mechanistische Verbindung aufgezeigt (GRIMM et al., 2014), die folgend kurz skizziert wird. Bereits unter den mittels Fütterung generierten Bedingungen eines sehr moderaten und physiologischen Vitamin D-Mangels, der dem der älteren Bevölkerung sehr ähnlich ist, konnte ein Effekt auf die A β -Homöostase beschrieben werden. In Hirnproben der Hypovitaminose-Tiere wurden signifikant erhöhte Mengen an A β ₄₀- und A β ₄₂-Peptiden ausgemacht, welche durch einen signifikanten Anstieg in der Aktivität der β -Sekretase und des BACE1-Proteingehaltes bedingt wurden. Neben dem gesteigerten A β -Anabolismus wurden Beeinträchtigungen der A β -Degradation beobachtet, welche sich durch eine signifikant reduzierte Expression sowie Aktivität des A β -degradierenden Enzyms Nephilysin äußerten. Die beobachteten Effekte im Hirngewebe Vitamin D-hypovitaminoser Mäuse konnten *in vitro* durch Supplementierung von 25-Hydroxyvitamin D₃ zu murinen Neuroblastomzellen (N2a) verifiziert werden. Die Behandlung mit Calcidiol führte in den analysierten Zellen zu einer signifikanten Abnahme an A β -Peptiden, welche auf eine erhöhte Degradation zurückgeführt wurde, da sowohl die Aktivität von Nephilysin als auch die Proteinmenge des ebenfalls A β -degradierenden Enzyms IDE signifikant erhöht waren (GRIMM et al., 2014).

Die Ergebnisse dieser vorausgegangenen Studie stärkten die Assoziation zwischen der Alzheimererkrankung und Vitamin D, indem sie einen mechanistischen Zusammenhang aufzeigten. Zudem konnte suggeriert werden, dass eine Vitamin D-Supplementierung positive Effekte in der Alzheimerprävention haben könnte. Basierend darauf war das Ziel der vorliegenden Arbeit die weitere Aufklärung dieser protektiven Einflüsse von Vitamin D sowie von therapeutisch eingesetzten Derivaten hinsichtlich der Alzheimererkrankung auf molekularer Ebene.

4.1.1 Der Einfluss von Vitamin D und seinen Analoga auf die APP-Pathologie der Alzheimererkrankung

Basierend auf den beschriebenen Daten aus (GRIMM et al., 2014) und den positiven Einflüssen einer Supplementierung von 25-Hydroxyvitamin D₃ auf die molekularen Mechanismen der Alzheimer-Krankheit, war das erste Ziel dieser Arbeit die Analyse potenzieller Effekte therapeutisch eingesetzter Vitamin D₃- und D₂-Analoga auf die Alzheimerpathologie auf molekularbiologischer Ebene.

Die Ergebnisse dieser Studie sind im *International Journal of Molecular Sciences* (MDPI-Verlag, *Impact Factor* dieser Fachzeitschrift Stand November 2022: 6,208) veröffentlicht:

Grimm MOW*, Thiel A*, **Lauer AA**, Winkler J, Lehmann J, Regner L, Nelke C, Janitschke D, Benoist C, Streidenberger O, Stötzel H, Endres K, Herr C, Beisswenger C, Grimm HS, Bals R, Lammert F, Hartmann T. *Vitamin D and Its Analogues Decrease Amyloid- β (A β) Formation and Increase A β -Degradation*. *Int J Mol Sci*. 2017 Dec 19;18(12):2764. doi: 10.3390/ijms18122764. PMID: 29257109; PMCID: PMC5751363. *diese Autoren haben gleichermaßen zu dieser Publikation beigetragen

Der experimentelle Eigenanteil der Autorin der vorliegenden Arbeit belief sich im Rahmen dieses Vitamin D-Analoga-Projektes auf die Inkubation der Zellen mit den analysierten Vitamin D-Analoga für diverse Folgeexperimente, die Messung der α -Sekretase-Aktivität in Zellen, die Messung der β -Sekretase-Aktivität in Zellen sowie PNF und Hirnproben, die Generierung von PNF, die Präparation der Wildtyp-Maushirne sowie die Erstellung von Homogenaten, die Isolierung von RNS, die Genexpressionsanalysen von *BACE1* und *NCSTN*, die Messung der γ -Sekretase-Aktivität und die Messung der Neprilysinaktivität. Da diese und alle weiteren, in die vorliegende Arbeit aufgenommenen Studien im Team durchgeführt wurden und einzelne Ergebnisse nicht außerhalb des Gesamtzusammenhangs betrachtet werden können, wurden auch Ergebnisse aufgenommen, an denen die Autorin der vorliegenden Arbeit nicht direkt beteiligt war. In diesem Kontext wird hier ausdrücklich auf die detaillierte Beschreibung des experimentellen Anteils in den jeweiligen Unterschriften der folgenden Abbildungen sowie auf die entsprechenden Kooperationstabellen (beispielsweise Tabelle 29) hingewiesen.

Tabelle 29: Kooperationen im Rahmen der Vitamin D-Analoga-Studie.

Abbildung	Experimenteller Anteil / Tätigkeit	ausführende Person
Abbildung 13	LDH-Analyse	Andrea Thiel
Abbildung 14	A β -Immunpräzipitation und Western Blot-Analyse	Andrea Thiel Liesa Regner-Nelke Céline Benoist
Abbildung 15	(A) A β -Degradationsanalyse (N2a-Zellen)	Andrea Thiel
	(B) A β -Degradationsanalyse (Maushirne)	Andrea Thiel
	(C) Genexpressionsanalyse (<i>NEP</i>)	Anna A. Lauer
	(D) Aktivitätsanalyse Neprilysin	Jakob Winkler Dr. Johannes Lehmann Anna A. Lauer
Abbildung 16	α -Sekretase-Aktivität (SH-SY5Y-Zellen)	Dr. Christopher Nelke Anna A. Lauer

	(A) β -Sekretase-Aktivität (SH-SY5Y-Zellen)	Andrea Thiel Dr. Christopher Nelke Daniel Janitschke
	(A) β -Sekretase-Aktivität (gereinigte Membranen)	Dr. Johannes Lehmann Anna A. Lauer
Abbildung 17	(B) Western Blot-Analyse (sAPP β)	Andrea Thiel Dr. Heike S. Grimm
	(C) β -Sekretase-Aktivität (<i>in vivo</i>)	Andrea Thiel Anna A. Lauer
	(D) Genexpressionsanalyse (<i>BACE1</i>)	Andrea Thiel Dr. Johannes Lehmann
	(E) Western Blot-Analyse (<i>BACE1</i>)	Andrea Thiel
	(A) γ -Sekretase-Aktivität (SH-SY5Y-Zellen)	Anna A. Lauer
Abbildung 18	(B) Genexpressionsanalyse (<i>NCSTN</i>)	Andrea Thiel Dr. Johannes Lehmann Anna A. Lauer
	Studiendesign, Projektbetreuung und -Koordination	Prof. Marcus Grimm

Zur systematischen Analyse der Effekte von Vitamin D und therapeutisch verwendeten Analoga auf Alzheimer-relevante Mechanismen wurden Calcifediol (25-Hydroxyvitamin D₃), die Vitamin D₃-Analoga Maxacalcitol, Calcipotriol und Alfacalcidol sowie die Vitamin D₂-Analoga Paricalcitol und Doxercalciferol herangezogen. Die Vorstufe Calcidiol wurde auf Grund ihrer längeren Serumhalbwertszeit (circa 15 Tage) im Vergleich zur aktiven Vitamin D₃-Form Calcitriol (1,25-Dihydroxyvitamin D₃; circa vier bis sechs Stunden) (JONES, 2008) gewählt. Die in Ethanol gelösten Vitamin D-Analoga wurden in einer Konzentration von 100 nM auf den Zellen inkubiert (Kapitel 3.2.2.4), wobei sich an der physiologischen Serumkonzentration von 75 nM (KENNEL et al., 2010; VIETH, 2011) orientiert wurde. Zudem erlaubte die Inkubation von 100 nM eine Vergleichbarkeit mit der Literatur, in welcher diese Konzentration häufig für Zellkulturexperimente eingesetzt wurde (PIERUCCI et al., 2017; PIOTROWSKA et al., 2016; WU-WONG et al., 2010) und im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle keine signifikanten Änderungen in der Zellviabilität bedingte (Abbildung 13). Als zelluläres System wurde die humane Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y verwendet, welche ein häufiges Zellkulturmodell für die Erforschung von Prozessen, die bei neurodegenerativen Erkrankungen eine Rolle spielen, ist (AGHOLME et al., 2010; SLANZI et al., 2020; XICOY et al., 2017). Als Vorbehalt ist hier zu erwähnen, dass in SH-SY5Y-Zellen, obwohl sie neuronale Eigenschaften aufweisen, grundsätzliche Unterschiede im Vergleich zu Neuronen existieren. Aus diesem Grund wurden die Hauptergebnisse *ex vivo* mit Hilfe von WT- und Vitamin D-Mangel-Maushirnhomogenaten validiert.

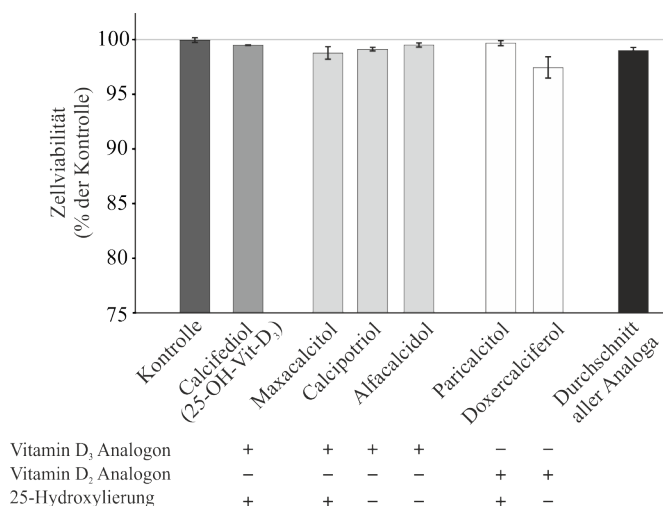


Abbildung 13: Einflüsse von Calcifediol und seinen Analoga auf die Zellviabilität. Nach 24-stündiger Inkubation von SH-SY5Y-WT-Zellen mit Calcifediol oder den analysierten Vitamin D₃- (Maxacalcitol, Calcipotriol, Alfacalcidol) und Vitamin D₂- (Paricalcitol, Doxercalciferol) Analoga oder der Lösungsmittelkontrolle wurde die Zytotoxizität mittels LDH-Analyse bestimmt (n = 3). Die Kontrollbedingungen wurden auf 100 % gesetzt und als Linie im Säulendiagramm dargestellt. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Die Durchführung der LDH-Zellviabilitätsanalyse erfolgte durch Andrea Thiel. Abbildung verändert nach (GRIMM et al., 2017b).

4.1.1.1 Der Effekt von Vitamin D und seinen Analoga auf die A β -Spiegel

Ähnlich zu den Erkenntnissen aus Grimm *et al.* besitzen neben Vitamin D auch die analysierten Analoga anti-amyloidogene Eigenschaften, was sich in reduzierten A β -Mengen äußerte (GRIMM et al., 2014). Zur Analyse der sezernierten A β -Spiegel wurden humane Neuroblastomzellen herangezogen, welche APP⁶⁹⁵, die hauptsächliche APP-Isoform in Neuronen (HUNG et al., 1992), stabil überexprimieren (SH-SY5Y APP⁶⁹⁵). Das entsprechende Expressionsniveau von APP⁶⁹⁵ in SH-SY5Y-WT-Zellen verglichen mit den SH-SY5Y-APP⁶⁹⁵-Zellen ist in Abbildung 14 A dargestellt und signifikant um den Faktor 12,98 ($\pm 1,27$) erhöht. Hierbei ist zu beachten, dass bei einer derart starken Überexpression die α - und die β -Sekretase nicht mehr um APP als Substrat konkurrieren.

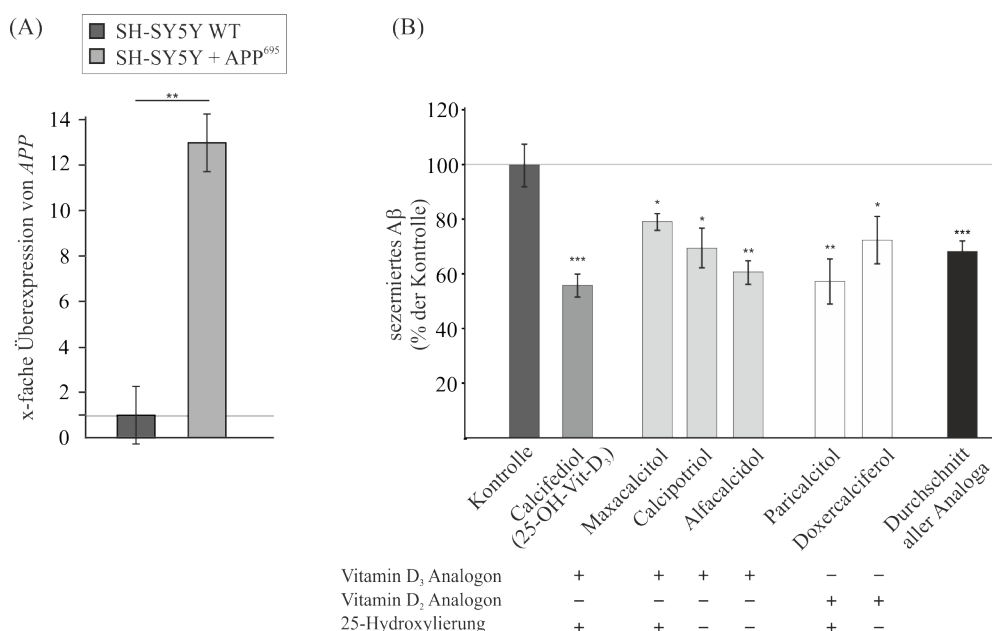


Abbildung 14: Einflüsse von Calcifediol und seinen Analoga auf die A β -Spiegel. (A) Validierung der APP⁶⁹⁵ Überexpression in SH-SY5Y-Zellen. 12,98-fache Überexpression von APP⁶⁹⁵ in transfizierten SH-SY5Y-Zellen verglichen mit SH-SY5Y-WT-Zellen. Abbildung verändert nach (LAUER et al., 2020). (B) Nach Inkubation von SH-SY5Y-APP⁶⁹⁵-Zellen mit Calcifediol, Analoga oder Lösungsmittelkontrolle in einer Konzentration von

100 nM wurde das sezernierte A β im konditionierten Medium mittels Immunpräzipitation und Western Blot-Analyse quantifiziert (n = 3). Die Kontrollbedingungen wurden auf 100 % gesetzt und als Linie im Säulendiagramm dargestellt. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Sterne stellen die statistische Signifikanz, die mittels ungepaartem Student-t-Test berechnet wurde, dar, wobei *p \leq 0,05, **p \leq 0,01 und ***p \leq 0,001 gelten. Die Durchführung der A β -Analyse erfolgte durch Andrea Thiel, Liesa Regner-Nelke und Céline Benoist. Abbildung verändert nach (GRIMM et al., 2017b).

In Anwesenheit von Calcifediol wurde eine signifikante Reduzierung der A β -Spiegel auf $55,1 \pm 4,2$ % (p \leq 0,001) im Vergleich zu SH-SY5Y-APP⁶⁹⁵-Zellen, die mit der Lösungsmittelkontrolle Ethanol behandelt wurden, detektiert (Abbildung 14 B). Auch die Vitamin D₃-Analoga Maxacalcitol, Calcipotriol und Alfacalcidol bedingten eine signifikante Verringerung der A β -Menge auf $78,2 \pm 3,1$ % (p = 0,031; Maxacalcitol), $68,2 \pm 7,2$ % (p = 0,017; Calcipotriol) und $60,3 \pm 4,3$ % (p = 0,002; Alfacalcidol). Die Bestimmung des A β -Gehaltes in Vitamin D₂-Analoga-behandelten SH-SY5Y-APP⁶⁹⁵-Zellen resultierte übereinstimmend in signifikant reduzierten Mengen an A β auf $56,3 \pm 8,2$ % (p = 0,005; Paricalcitol) beziehungsweise auf $70,9 \pm 8,6$ % (p = 0,037; Doxercalciferol). Im Durchschnitt reduzierten die analysierten Vitamin D₃- und Vitamin D₂-Analoga die sezernierten Mengen an A β im konditionierten Medium inkubierter SH-SY5Y-APP⁶⁹⁵-Zellen auf $66,8 \pm 3,9$ % (p \leq 0,001) (Abbildung 14 B), wobei keine signifikanten Unterschiede in der Effektstärke zwischen den analysierten Vitamin-Analoga mittels ANOVA-Analyse ausgemacht wurden (p = 0,189).

4.1.1.2 Der Effekt von Vitamin D und seinen Analoga auf den A β -Katabolismus

Neben den reduzierten Spiegeln an sezerniertem A β in Anwesenheit von Calcifediol und seinen Analoga wurde eine Steigerung der A β -Degradation beobachtet. Diese hinsichtlich der Alzheimerpathologie positiven Einflüsse konnten sowohl *in vitro* (Neuroblastomzellen) als auch *in vivo* (Hirnproben Vitamin D-Mangel-Mäuse) detektiert werden (Abbildung 15).

Die Analyse der Einflüsse der Vitamin D-Analoga auf den A β -Katabolismus erfolgte mit Hilfe muriner Neuroblastomzellen (N2a), welche mit den Vitamin D-Analoga unter Anwesenheit von humanen synthetischen A β -Peptiden inkubiert wurden. Die anschließende Western Blot-Analyse unter Verwendung eines humanspezifischen A β -Antikörpers erlaubte die Detektion des verbliebenen nicht-degradierten A β unter Ausschluss der Detektion von endogenen murinen A β -Peptiden sowie unter Ausschluss eines Einflusses der Syntheserate (siehe Kapitel 3.2.3.9).

Im Vergleich zu Zellen, die mit der Lösungsmittelkontrolle behandelt wurden, wurde in Calcifediol-inkubierten N2a-Zellen eine signifikant auf $119,6 \pm 4,5$ % (p = 0,034) erhöhte A β -Degradation detektiert. Auch die Vitamin D₃-Analoga Maxacalcitol, Calcipotriol und Alfacalcidol bedingten einen signifikant gesteigerten Abbau der A β -Peptide auf $164,5 \pm 6,3$ % (p = 0,009; Maxacalcitol), $202,1 \pm 4,2$ % (p = 0,002; Calcipotriol) beziehungsweise $123,5 \pm 3,5$ % (p = 0,046; Alfacalcidol). In Übereinstimmung mit den Vitamin D₃-Analoga konnte durch Behandlung der N2a-Zellen mit den beiden Vitamin D₂-Analoga Paricalcitol ($168,7 \pm 2,6$ % (p = 0,002)) und Doxercalciferol ($158,2 \pm 2,8$ % (p = 0,003)) eine signifikante Zunahme der A β -Degradation beobachtet werden. Im Durchschnitt steigerten die analysierten Vitamin D-Analoga die Degradation von A β signifikant auf $156,1 \pm 3,2$ % (p \leq 0,001) (Abbildung 15 A).

Mittels ANOVA-Analyse, welche in einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,001$ resultierte, und anschließendem Post-Hoc-Testverfahren wurden signifikante Unterschiede der Effektstärken zwischen den einzelnen Analoga ausgemacht, die in Tabelle 30 zusammengefasst sind. Verdeutlicht wird, dass die Analoga, mit Ausnahme von Alfacalcidol, die A β -Degradation im Vergleich zu Calcifediol mit signifikant größeren Effektstärken steigerten. Innerhalb der analysierten Vitamin D₃-Analoga vermittelten Maxacalcitol und Calcipotriol im Vergleich zu Alfacalcidol signifikant stärker ausgeprägte Steigerungen der A β -Degradation. Auch die Behandlung der N2a-Zellen mit dem Vitamin D₂-Analog Paricalcitol resultierte in einer signifikant gesteigerten Degradation von A β im Vergleich zu dem Alfacalcidol-vermittelten Effekt (Tabelle 30).

Tabelle 30: Ergebnisse der Tukey Post-Hoc-Analyse der A β -Degradationsdaten auf N2a-Zellen. Statistische Signifikanz wurde als $p \leq 0,05$ definiert und die entsprechenden Signifikanzniveaus wurden in der Tabelle hervorgehoben.

	Maxacalcitol	Calcipotriol	Alfacalcidol	Paricalcitol	Doxercalciferol
Calcifediol	0,013	0,000	0,996	0,008	0,028
Maxacalcitol	/	0,456	0,046	1,000	0,998
Calcipotriol	/	/	0,002	0,597	0,269
Alfacalcidol	/	/	/	0,030	0,092
Paricalcitol	/	/	/	/	0,984

Um weiterführend zu analysieren, ob die Vitamin D-Analoga das Potential haben, den A β -Katabolismus auch in Vitamin D-Mangel-Maushirnproben zu steigern, wurden im Rahmen eines *ex vivo* Experiments Homogenate der hypovitaminosen Maushirne mit den Vitamin D-Analoga in Anwesenheit von synthetischen humanen A β -Peptiden inkubiert und das verbliebene A β immunologisch detektiert. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Zellkulturexperimente resultierten die Behandlungen mit Maxacalcitol ($128,3 \pm 1,3$ % ($p = 0,001$)), Calcipotriol ($123,8 \pm 6,2$ % ($p = 0,041$)), Alfacalcidol ($120,0 \pm 4,5$ % ($p = 0,027$)) und Paricalcitol ($112,2 \pm 3,1$ % ($p = 0,043$)) in einer signifikant gesteigerten A β -Degradation. Die Vorstufe des aktiven Vitamin D₃, Calcifediol, und das Vitamin D₂-Analog Doxercalciferol hatten unter diesen experimentellen Bedingungen keinen Einfluss auf den A β -Katabolismus. Im Durchschnitt steigerten die Vitamin D-Analoga die A β -Degradation in Hirnhomogenaten hypovitaminoser Mäuse auf $119,2 \pm 3,2$ % ($p \leq 0,001$) (Abbildung 15 B), wobei keine signifikanten Unterschiede in der Effektstärke zwischen den analysierten Vitamin-Analoga mittels ANOVA-Analyse detektiert wurden ($p = 0,171$).

Auf mechanistischer Ebene konnte diese erhöhte Degradation von A β -Peptiden auf die Beeinflussung von Neprilysin, einem der hauptsächlichen A β -abbauenden Enzyme, zurückgeführt werden. Wie in Abbildung 15 C ersichtlich, resultierte die Behandlung von humanen Neuroblastomzellen (SH-SY5Y WT) mit Maxacalcitol, Alfacalcidol und Paricalcitol in einer signifikanten Zunahme der Expression des für das Protein Neprilysin kodierenden Gens *NEP* (Maxacalcitol: $119,1 \pm 7,3$ % ($p = 0,026$); Alfacalcidol: $113,8 \pm 5,0$ % ($p = 0,021$); Paricalcitol: $111,6 \pm 3,0$ % ($p = 0,003$)). Der durchschnittliche Effekt der Vitamin D-Analoga auf die *NEP*-Expression belief sich auf eine signifikante Erhöhung auf $110,7 \pm 2,9$ % ($p = 0,007$). Zwischen den analysierten Vitamin D-Analoga wurden mittels ANOVA-Analyse keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der gesteigerten *NEP*-Expression detektiert ($p = 0,110$).

Neben der *NEP*-Expression wurde auch die Aktivität des Enzyms Neprilysin durch das Vitamin D₃-Analog Alfacalcidol und das Vitamin D₂-Analog Paricalcitol, welche jeweils die Genexpression steigerten, beeinflusst (Alfacalcidol: $165,2 \pm 16,5$ % ($p = 0,029$); Paricalcitol: $201,8 \pm 35,3$ % ($p = 0,029$)). Die Behandlungen mit den weiteren Vitamin D-Analoga resultierten jeweils übereinstimmend in nicht signifikant erhöhten NEP-Aktivitäten, was die signifikante durchschnittliche Erhöhung auf $159,6 \pm 12,0$ % ($p = 0,010$) bedingte (Abbildung 15 D). Die ANOVA-Analyse zur Detektion signifikanter Unterschiede in den Effektstärken zwischen den einzelnen Vitamin D-Analoga resultierte in einem Signifikanzniveau von $p = 0,256$, was belegt, dass die analysierten Vitamin D₂- und D₃-Analoga die Aktivität von Neprilysin in ähnlicher Weise steigern.

Um beurteilen zu können, ob sich die Vitamin D-Analoga-vermittelten steigernden Effekte auf die A β -Degradation und das daran beteiligte Enzym Neprilysin ähneln oder unterscheiden, wurden die jeweiligen Korrelationen berechnet. Es resultierte, dass die Effekte auf die A β -Degradation, die in N2a-Zellen detektiert wurden, tendenziell mit denen, die in Vitamin D-Mangel-Maushirnen ermittelt wurden, mit einem Pearson-Korrelationskoeffizienten von $r = 0,518$ korrelierten, wobei das Signifikanzniveau nicht erreicht wurde ($p = 0,292$). Außerdem korrelierte die *NEP*-Expression tendenziell mit einem Pearson-Korrelationskoeffizienten von $r = 0,521$ mit der in Vitamin D-Mangel-Maushirnen analysierten gesteigerten A β -Degradation ($p = 0,289$).

Im Vergleich zu den reduzierten A β -Spiegeln in SH-SY5Y-APP⁶⁹⁵-Zellen nach Inkubation mit den analysierten Vitamin D-Analoga verhielten sich die Effekte auf die A β -Degradation ähnlich, was sich beispielsweise an der tendenziellen Korrelation zwischen den A β -Spiegeln und der A β -Degradation in murinen Vitamin D-Hypovitaminose-Hirnproben mit einem Pearson-Korrelationskoeffizienten von $r = 0,725$ zeigte ($p = 0,103$). Ein ähnlicher, jedoch nicht signifikant ausgeprägter Zusammenhang wurde auch für die reduzierten A β -Spiegel und die gesteigerte A β -Degradation in N2a-Zellen detektiert ($r = 0,479$ mit $p = 0,336$). Neben diesen Ähnlichkeiten wurden speziell im Hinblick auf die *NEP*-Genexpression auch signifikante Unterschiede zwischen den Effektstärken der analysierten Vitamin D-Analoga detektiert. So unterschied sich der reduzierende Effekt von Calcifediol bezüglich der A β -Spiegel auf $55,1$ % signifikant von der durch die Erhöhung der *NEP*-Transkription vermittelten Effektstärke auf $97,6$ %, ($p \leq 0,001$). Ebenso verhielt es sich für die beiden Vitamin D₃-Analoga Calcipotriol (A β -Spiegel auf $68,2$ % gegenüber Transkriptions-vermittelter Effektstärke auf $98,9$ %, $p = 0,009$) und Alfacalcidol (A β -Spiegel auf $60,3$ % gegenüber Transkriptions-vermittelter Effektstärke auf $88,8$ %, $p = 0,001$) sowie das Vitamin D₂-Analog Paricalcitol (A β -Spiegel auf $56,3$ % gegenüber Transkriptions-vermittelter Effektstärke auf $90,0$ %, $p = 0,013$). Diese Ergebnisse deuteten an, dass die Analoga Calcifediol, Calcipotriol, Alfacalcidol und Paricalcitol ihre A β -reduzierende Wirkung nicht über eine Steigerung der *NEP*-Genexpression vermitteln. Diese Vermutung wurde dadurch gestärkt, dass zwischen den reduzierenden Effekten auf die A β -Spiegel und den durch die Erhöhung der Neprilysin-Aktivität vermittelten Effektstärken keine signifikanten Unterschiede detektiert wurden (Calcifediol $p = 0,062$; Maxacalcitol $p = 0,846$; Calcipotriol $p = 0,344$; Alfacalcidol $p = 0,590$; Paricalcitol $p = 0,515$; Doxercalciferol $p = 0,583$).

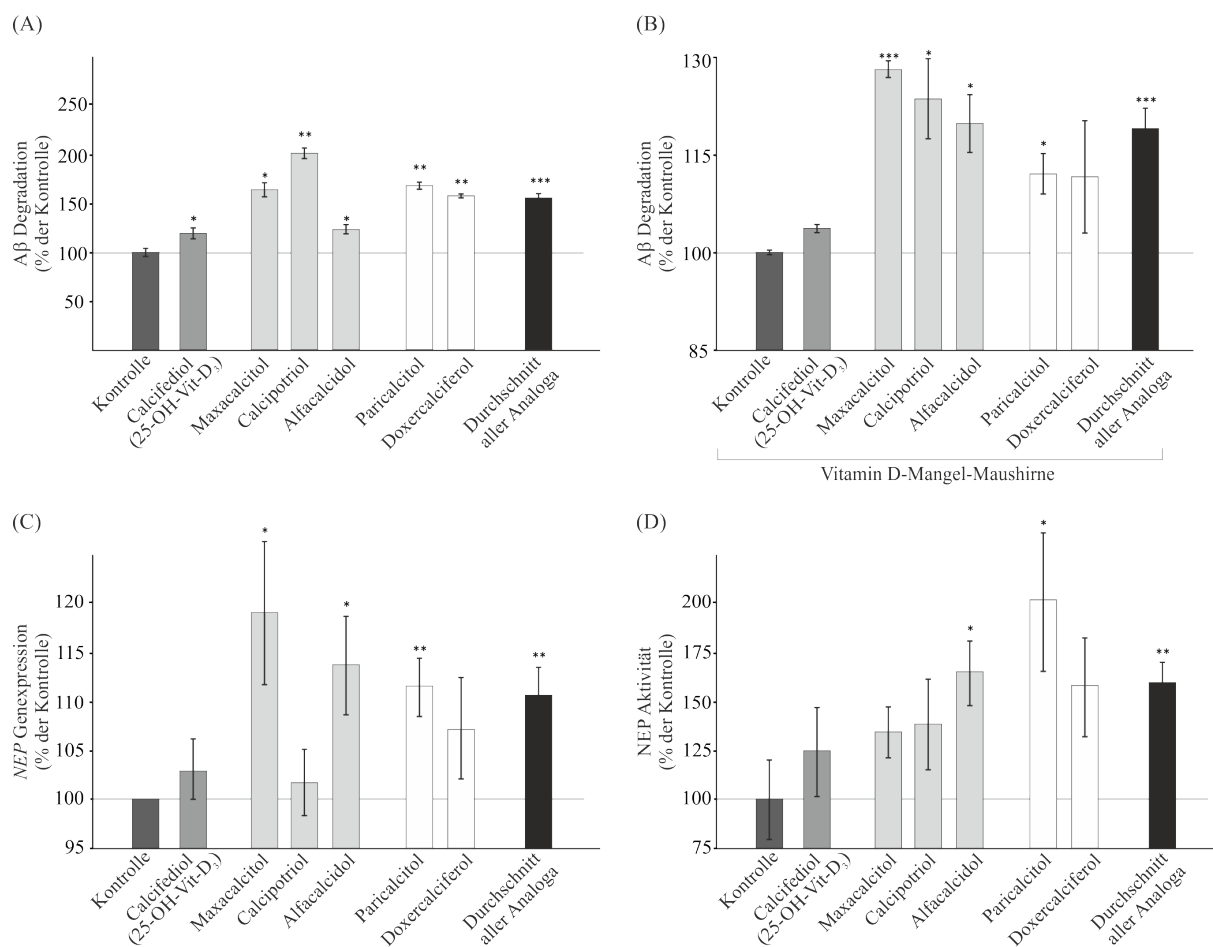


Abbildung 15: Einflüsse von Calcifediol und seinen Analoga auf den Aβ-Katabolismus. (A) Aβ-Degradation in murinen wildtypischen Neuroblastomzellen (N2a) nach Inkubation mit 100 nM Calcifediol oder Analogon im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (n = 3). (B) Aβ-Degradation in Vitamin D-Mangel-Maushirnen (n = 5). (C) Genexpressionsanalyse der NEP-Expression in inkubierten SH-SY5Y-WT-Zellen (n = 3). (D) Neprilysin-Aktivität in N2a-Zellen (n = 8). Die Kontrollbedingungen wurden jeweils auf 100 % gesetzt und als Linie in den Säulendiagrammen dargestellt. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Sterne stellen die statistische Signifikanz, die mittels ungepaartem Student-t-Test berechnet wurde, dar, wobei *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01 und ***p ≤ 0,001 gelten. Die Durchführung der Aβ-Degradationsanalyse erfolgte in Kooperation mit Andrea Thiel, Jakob Winkler und Dr. Johannes Lehmann. Abbildung verändert nach (GRIMM et al., 2017b).

4.1.1.3 Der Effekt von Vitamin D und seinen Analoga auf den Aβ-Anabolismus

Neben dem beschriebenen gesteigerten Katabolismus von Aβ in Anwesenheit der Vitamin D-Analoga könnte die in Kapitel 4.1.1.1 beobachtete Reduzierung des Aβ-Spiegels auch durch einen inhibierten Aβ-Anabolismus bedingt werden. Aus diesem Grund wurde sich folgend auf einen potenziellen Einfluss der Vitamin D-Analoga auf die APP-Prozessierung und die daran beteiligten Sekretasen konzentriert. Ein potenzieller Mechanismus, der innerhalb der APP-Prozessierung zu verringerten Aβ-Konzentrationen führen könnte, ist eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen nicht-amyloidogener und amyloidogener Prozessierung hin zur nicht-amyloidogenen Variante.

Eine Behandlung von SH-SY5Y-WT-Zellen mit den Vitamin D-Analoga resultierte lediglich im Fall von Calcifediol und dem Vitamin D₂-Analogon Paricalcitol in einer signifikant erhöhten α -Sekretase-Aktivität (Calcifediol: $114,5 \pm 4,5$ % ($p = 0,015$); Paricalcitol: $113,9 \pm 4,7$ % ($p = 0,023$); Abbildung 16). Dies lässt vermuten, dass dieser Mechanismus zumindest einen Teil des Wirkungsspektrums der analysierten Vitamin D-Analoga ausmacht.

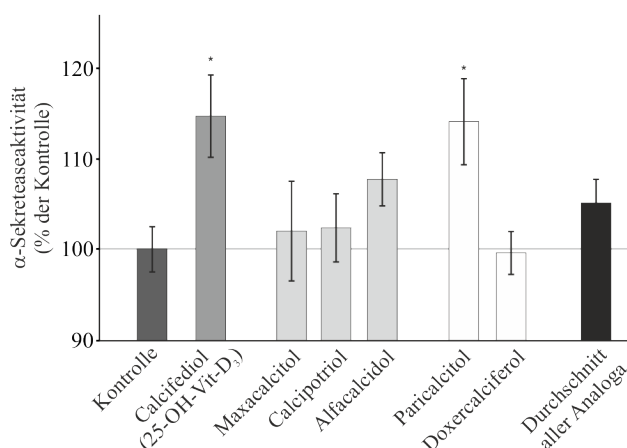


Abbildung 16: Einfluss von Calcifediol und seinen Analoga auf die Aktivität der α -Sekretase. Analyse der α -Sekretase-Aktivität in SH-SY5Y-WT-Zellen ($n = 7$). Die Kontrollbedingungen wurden jeweils auf 100 % gesetzt und als Linie in den Säulendiagrammen dargestellt. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Sterne stellen die statistische Signifikanz, die mittels ungepaartem Student-t-Test berechnet wurde, dar, wobei $*p \leq 0,05$ gilt. Die Durchführung der Bestimmung der α -Sekretase-Aktivität erfolgte in Kooperation mit Dr. Christopher Nelke. Abbildung verändert nach (GRIMM et al., 2017b).

Hinsichtlich des Effektstärkenvergleiches zwischen den Analoga in ihrer Wirkung auf die Aktivität der α -Sekretase erreichte die ANOVA-Analyse knapp das Signifikanzniveau ($p = 0,050$), der folgende Tukey Post-Hoc-Test detektierte jedoch keine signifikanten Unterschiede in den einzelnen Gruppenvergleichen, wie Tabelle 31 zu entnehmen ist.

Tabelle 31: Ergebnisse der Tukey Post-Hoc-Analyse der α -Sekretase-Aktivität in SH-SY5Y-WT-Zellen. Statistische Signifikanz wurde als $p \leq 0,05$ definiert und die entsprechenden Signifikanzniveaus wurden in der Tabelle hervorgehoben.

	Maxacalcitol	Calcipotriol	Alfacalcidol	Paricalcitol	Doxercalciferol
Calcifediol	0,273	0,302	0,836	1,000	0,126
Maxacalcitol	/	1,000	0,921	0,324	0,998
Calcipotriol	/	/	0,939	0,356	0,997
Alfacalcidol	/	/	/	0,882	0,731
Paricalcitol	/	/	/	/	0,156

Das Pendant zur α -Sekretase im nicht-amyloidogenen Prozessierungsweg stellt die β -Sekretase während der amyloidogenen APP-Spaltung dar. Daher wurde im folgenden Schritt mit Hilfe gereinigter Membranen von SH-SY5Y-WT-Zellen analysiert, ob die Vitamin D-Analoga einen direkten Effekt auf die Aktivität der β -Sekretase haben. Alle Vitamin D-Analoga, mit der Ausnahme von Calcifediol, welches keinen signifikanten Effekt vermittelte, waren in der Lage, die Aktivität der β -Sekretase auch außerhalb einer intakten Zellumgebung leicht, jedoch signifikant zu inhibieren: Maxacalcitol $91,7 \pm 2,3$ % ($p = 0,016$), Calcipotriol $94,7 \pm 1,0$ % ($p = 0,023$), Alfacalcidol $94,1 \pm 1,3$ % ($p = 0,018$), Paricalcitol $93,2 \pm 1,6$ % ($p = 0,013$) und Doxercalciferol $90,7 \pm 1,0$ % ($p \leq 0,001$) (Abbildung 17 A).

Die ANOVA-Analyse zur Detektion potenzieller Unterschiede zwischen den Vitamin D-Analoga hinsichtlich ihrer inhibierenden Wirkung auf die β -Sekretase-Aktivität in Membranen resultierte in einem Signifikanzniveau von $p = 0,161$, welches die Interpretation zulässt, dass die Analoga sich in dieser Wirkungsweise nicht statistisch signifikant voneinander unterscheiden. Diese Resultate hinsichtlich der β -Sekretase konnten in Vitamin D-Analoga-behandelten SH-SY5Y-WT-Zellen verifiziert werden, wobei die Effekte in ihrer Stärke, mit Ausnahme von Calcipotriol, signifikant ausgeprägter ausfielen (Calcifediol $p = 0,025$; Maxacalcitol $p = 0,007$; Calcipotriol $p = 0,122$; Alfalcidol $p = 0,018$; Paricalcitol $p = 0,018$; Doxercalciferol $p = 0,006$). So resultierte die Inkubation mit Calcifediol im Vergleich zur Kontrolle in einer auf $74,4 \pm 6,3 \%$ ($p = 0,009$) reduzierten β -Sekretase-Aktivität. Die Vitamin D₃-Analoga Maxacalcitol, Calcipotriol und Alfalcidol bedingten einheitlich eine Verringerung der Aktivität der β -Sekretase, wobei der Effekt für Calcipotriol keine statistische Signifikanz erreichte (Maxacalcitol: $69,2 \pm 5,0 \%$ ($p = 0,001$), Calcipotriol $88,8 \pm 3,1 \%$ ($p = 0,060$), Alfalcidol: $67,5 \pm 7,1 \%$ ($p = 0,004$)). Auch für die Vitamin D₂-Analoga wurde ein signifikanter inhibierender Effekt auf die β -Sekretase-Aktivität in SH-SY5Y-Zellen beobachtet: Paricalcitol reduzierte die Aktivität der β -Sekretase auf $61,9 \pm 8,4 \%$ ($p = 0,003$) und Doxercalciferol auf $77,3 \pm 2,9 \%$ ($p = 0,002$) (Abbildung 17 A). Ähnlich zu den beobachteten einheitlichen Effekten der Vitamin D-Analoga auf die β -Sekretase in Membranen, wurden auch in Zellen keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Effektstärken der einzelnen Analoga detektiert (ANOVA $p = 0,051$). Ein Vergleich der durchschnittlichen Effektstärken der Vitamin D-Analoga in gereinigten Membranen ($92,5 \pm 0,8 \%$ ($p = 0,004$)) mit denen in Zellen ($72,9 \pm 4,7 \%$ ($p \leq 0,001$)) verdeutlichte, dass es neben den direkten Einflüssen der analysierten Vitamin D-Analoga auf die Aktivität der β -Sekretase weitere indirekte Mechanismen, die beispielsweise auf die Genexpression oder Proteinstabilität abzielen könnten, geben muss, über welche Vitamin D und seine Analoga ihre Wirkung vermitteln.

Um die FRET-basierte Methode der β -Sekretase-Aktivitätsbestimmung zu überprüfen, wurde der Gehalt an löslichem β -sezerniertem APP (sAPP β) im konditionierten Medium von mit Calcifediol inkubierten SH-SY5Y-Zellen mittels Western Blot analysiert. Wie in Abbildung 17 B dargestellt, resultierte eine Reduzierung der sAPP β -Menge auf $76,9 \pm 1,8 \%$ ($p = 0,002$), welche vergleichbar zur auf $74,4 \%$ verringerten β -Sekretase-Aktivität ist ($p = 0,718$), die mittels FRET-basierter Analyse unter gleichen Inkubationsbedingungen in Zellen detektiert wurde.

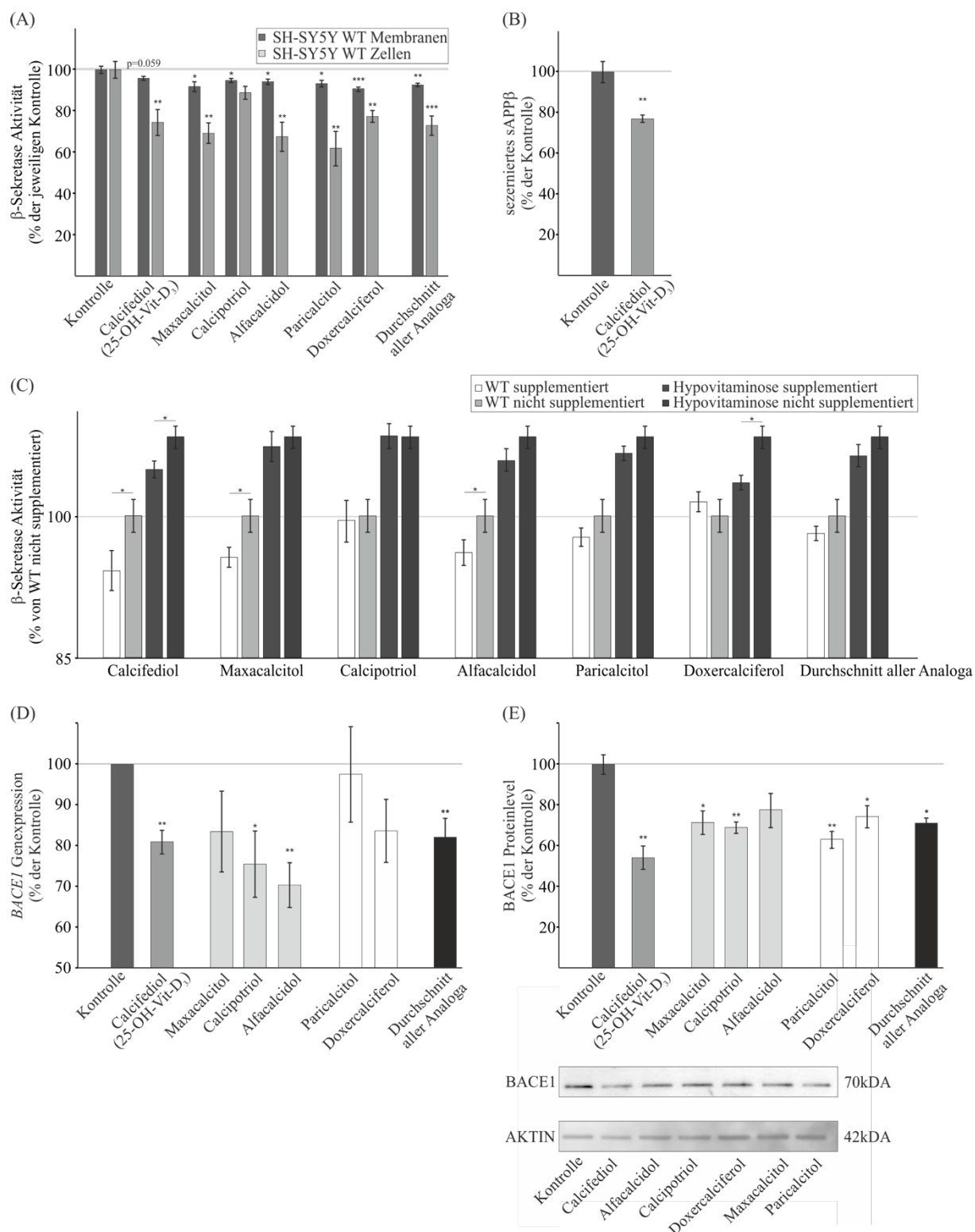


Abbildung 17: Einflüsse von Calcifediol und seinen Analoga auf den A β -Anabolismus. (A) Analyse der β -Sekretase-Aktivität in isolierten Membranen von SH-SY5Y-WT-Zellen (n = 7) und in metabolisch aktiven SH-SY5Y-WT-Zellen (n = 5). (B) Validierung der FRET-basierten β -Sekretase-Aktivitätsanalyse durch Bestimmung der sAPP β -Menge aus konditioniertem Medium Calcifediol-behandelter SH-SY5Y-WT-Zellen mittels Western Blot-Analyse. (C) β -Sekretase-Aktivität in drei WT-Maushirn- und fünf Vitamin D-Mangel-Maushirn-Homogenaten (n = 3). (D) Genexpressionsanalyse von *BACE1* in SH-SY5Y-WT-Zellen mittels qRT-PCR (n = 3). (E) Analyse des BACE1-Proteingehaltes in Zelllysaten von SH-SY5Y-Zellen mittels Western Blot-Methode (n = 3). Die Kontrollbedingungen wurden jeweils auf 100 % gesetzt und als Linie in den Säulendiagrammen dargestellt. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Sterne stellen die statistische

Signifikanz, die mittels ungepaartem Student-t-Test berechnet wurde, dar, wobei * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$ gelten. Die Durchführung der A β -Anabolismus-Analysen erfolgte in Kooperation mit Andrea Thiel, Dr. Christopher Nelke, Dr. Johannes Lehmann, Dr. Heike S. Grimm und Daniel Janitschke. Abbildung verändert nach (GRIMM et al., 2017b).

Das Potenzial der Vitamin D-Analoga, die A β -Konzentration über Beeinflussung der β -Sekretase-Aktivität zu reduzieren, wurde weiterführend *ex vivo* in Hirnproben wildtypischer und Vitamin D-Hypovitaminose-Mäuse (23 % Mangel in Serum 25-Hydroxyvitamin D₃; Kapitel 3.1.4.2) in An- oder Abwesenheit der Vitamin D-Analoga analysiert. Ein Vergleich der Aktivität der β -Sekretase in Abwesenheit der Additive zwischen wildtypischen und hypovitaminosen murinen Hirnproben verifiziert die bereits in der vorangegangenen Publikation beschriebene signifikant erhöhte β -Sekretase-Aktivität in Vitamin D-Mangel-Maushirnen im Vergleich zu wildtypischem Gewebe (Abbildung 17 C; auf die Einzeichnung der Signifikanzsterne wurde auf Grund der besseren Übersichtlichkeit verzichtet; aus allen Paarungen resultierte $p \leq 0,001$; siehe Tabelle 32). In Proben Vitamin D-Hypovitaminose-Maushirne bedingte die Anwesenheit der Analoga Calcifediol, Maxacalcitol, Alfalcidol, Paricalcitol und Doxercalciferol eine inhibierte Aktivität der β -Sekretase verglichen mit unbehandelten hypovitaminosen Hirnhomogenaten. Dabei erreichten die Effekte von Calcifediol ($p = 0,026$) und Doxercalciferol ($p = 0,040$) das Signifikanzniveau. Interessanterweise wurde die reduzierte Sekretase-Aktivität als Folge der Inkubation mit Vitamin D-Analoga (Calcifediol, Maxacalcitol, Alfalcidol und Paricalcitol) auch in Hirnproben von Nicht-Hypovitaminose-Mäusen beobachtet. Die Effekte von Calcifediol ($p = 0,028$), Alfalcidol ($p = 0,050$) und Maxacalcitol ($p = 0,015$) waren statistisch signifikant (Abbildung 17 C). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass sowohl Individuen mit einer Vitamin D-Hypovitaminose als auch Menschen mit adäquatem Vitamin D-Spiegel von einer Supplementierung von Calcifediol oder anderer Analoga profitieren könnten. Diese auf dem Evidenzniveau der Zellkultur gewonnenen Erkenntnisse sollten in weiterführenden Studien evaluiert werden.

Tabelle 32: Statistische Analyse der Effekte der Vitamin D-Analoga auf die β -Sekretase in murinem Hirngewebe. Die Effektstärken der einzelnen Vitamin D-Analoga hinsichtlich ihrer inhibierenden Wirkung auf die β -Sekretase-Aktivität in supplementierten und nicht-supplementierten WT-Maushirnen sowie in supplementierten und nicht-supplementierten Vitamin D-Mangel-Maushirnen wurden mittels Student-t-Test verglichen. Statistische Signifikanz wurde als $p \leq 0,05$ definiert und die entsprechenden Signifikanzniveaus wurden in der Tabelle hervorgehoben. Tabelle verändert nach (GRIMM et al., 2017b).

Vitamin D-Analog	WT+ / WT-	WT+ / Mangel+	WT+ / Mangel+	WT- / Mangel+	WT- / Mangel-	Mangel+ / Mangel-
Calcifediol	0,028	0,000	0,000	0,005	0,000	0,026
Alfalcidol	0,050	0,000	0,000	0,003	0,000	0,144
Calcipotriol	0,858	0,002	0,002	0,000	0,000	0,964
Doxercalciferol	0,573	0,499	0,014	0,145	0,000	0,040
Maxacalcitol	0,015	0,000	0,000	0,001	0,000	0,606
Paricalcitol	0,179	0,000	0,000	0,000	0,000	0,223

Die in Abbildung 17 A dargestellten stärkeren Effekte der Vitamin D-Analoga auf die Aktivität der β -Sekretase in SH-SY5Y-Zellen verglichen mit den direkten Effekten auf isolierte Membranen ließen bereits weitere indirekte Einflüsse dieser Vitamin D-Analoga auf die β -Sekretase vermuten.

Um zu analysieren, ob die Vitamin D-Analoga die β -Sekretase-Aktivität durch Beeinflussung der Expression von *BACE1* vermitteln, wurden in behandelten SH-SY5Y-Zellen Genexpressionsanalysen von *BACE1* durchgeführt und der BACE1-Proteingehalt mittels Western Blot-Analyse bestimmt. Mit Ausnahme von Paricalcitol wurde für alle Vitamin D-Analoga ein inhibierender Effekt auf die *BACE1*-Expression mittels qRT-PCR-Analyse detektiert, wobei Calcifediol ($80,8 \pm 2,9 \%$; $p = 0,003$), Calcipotriol ($75,4 \pm 8,1 \%$; $p = 0,040$) und Alfalcidol ($70,3 \pm 5,4 \%$; $p = 0,006$) das Signifikanzniveau erreichten. Im Durchschnitt inhibierten die analysierten Analoga die *BACE1*-Expression signifikant auf $82,1 \pm 4,6 \%$ ($p = 0,005$) (Abbildung 17 D). Interessanterweise resultierte die Addition der Effektstärken von Calcifediol auf die Aktivität der β -Sekretase in postnukleären Fraktionen ($4,2 \%$) und auf die Genexpression von *BACE1* (19%) in einer um $23,2 \%$ reduzierenden Wirkung, was mit der Reduzierung der sAPP β -Spiegel auf $76,9 \%$ einhergeht.

In Übereinstimmung mit den erhaltenen Ergebnissen der Transkriptionsanalyse resultierte die Inkubation von SH-SY5Y-WT-Zellen mit den Vitamin D-Analoga Calcifediol ($54,1 \pm 5,7 \%$; $p = 0,004$), Maxacalcitol ($71,4 \pm 5,8 \%$; $p = 0,020$), Calcipotriol ($68,9 \pm 2,8 \%$; $p = 0,009$), Paricalcitol ($63,2 \pm 4,2 \%$; $p = 0,005$) und Doxercalciferol ($74,3 \pm 5,4 \%$; $p = 0,025$) in einem signifikant reduzierten BACE1-Proteingehalt. Dies spiegelte sich auch in der signifikanten durchschnittlichen Reduzierung auf $71,1 \pm 2,5 \%$ ($p = 0,011$) wider (Abbildung 17 E).

Sowohl bei der amyloidogenen als auch bei der nicht-amyloidogenen APP-Prozessierung spielt die γ -Sekretase eine entscheidende Rolle, deren Spaltung des β -CTF oder α -CTF in der jeweiligen Entstehung von AICD und A β (β -CTF) oder p3 (α -CTF) resultiert. Da der indirekte Effekt der Vitamin D-Analoga auf die β -Sekretase in Zellen ausgeprägter ausfiel als der direkte Effekt in isolierten Membranen, wurden zur Analyse eines potenziellen Einflusses der Analoga auf die Aktivität der γ -Sekretase ebenfalls metabolisch aktive SH-SY5Y-WT-Zellen herangezogen. Die Inkubationen mit Calcifediol, Maxacalcitol, Alfalcidol, Paricalcitol und Doxercalciferol resultierten in einer signifikanten Inhibierung der γ -Sekretase-Aktivität (Calcifediol: $85,3 \pm 2,5 \%$ ($p \leq 0,001$), Maxacalcitol: $91,3 \pm 3,0 \%$ ($p = 0,039$), Alfalcidol: $74,7 \pm 3,3 \%$ ($p \leq 0,001$), Paricalcitol: $80,6 \pm 4,0 \%$ ($p = 0,001$), Doxercalciferol: $80,2 \pm 4,3 \%$ ($p = 0,002$); Abbildung 18 A). Im Durchschnitt lag der Effekt auf die Aktivität der γ -Sekretase bei $86,1 \pm 3,4 \%$ ($p = 0,003$). Die ANOVA-Analyse zur Detektion von Unterschieden in den Effektstärken zwischen den Vitamin D-Analoga resultierte in einem Signifikanzniveau von $p = 0,014$, weshalb sich eine Post-Hoc-Analyse anschloss (Tabelle 33). Diese detektierte einen signifikanten Unterschied in der γ -Sekretase-Aktivität-reduzierenden Wirkung zwischen Calcipotriol und Alfalcidol ($p = 0,022$).

Tabelle 33: Ergebnisse der Tukey Post-Hoc-Analyse der γ -Sekretase-Aktivität in SH-SY5Y-WT-Zellen. Statistische Signifikanz wurde als $p \leq 0,05$ definiert und die entsprechenden Signifikanzniveaus wurden in der Tabelle hervorgehoben.

	Maxacalcitol	Calcipotriol	Alfalcidol	Paricalcitol	Doxercalciferol
Calcifediol	0,829	0,455	0,856	1,000	1,000
Maxacalcitol	/	0,934	0,102	0,641	0,671
Calcipotriol	/	/	0,022	0,275	0,298
Alfalcidol	/	/	/	0,946	0,936
Paricalcitol	/	/	/	/	1,000

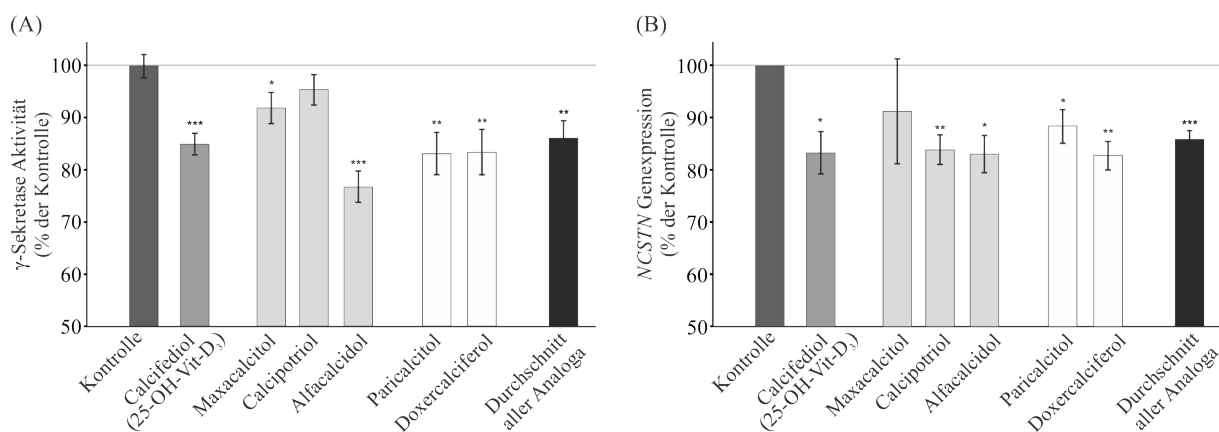


Abbildung 18: Einflüsse von Calcifediol und seinen Analoga auf die γ -Sekretase. (A) Analyse der γ -Sekretase-Aktivität in SH-SY5Y-WT-Zellen ($n \geq 5$). (B) Bestimmung der mRNA-Spiegel der γ -Sekretasekomponente Nicastrin (*NCSTN*) mittels qRT-PCR-Analyse ($n = 3$). Die Kontrollbedingungen wurden jeweils auf 100 % gesetzt und als Linie in den Säulendiagrammen dargestellt. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Sterne stellen die statistische Signifikanz, die mittels ungepaartem Student-t-Test berechnet wurde, dar, wobei $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$ und $***p \leq 0,001$ gelten. Die Durchführung der γ -Sekretase-Analysen erfolgte in Kooperation mit Andrea Thiel und Dr. Johannes Lehmann. Abbildung verändert nach (GRIMM et al., 2017b).

Vergleichbar mit der durchschnittlichen Reduzierung der γ -Sekretase-Aktivität auf 86,1 %, verringerten die analysierten Vitamin D-Analoga die Genexpression der γ -Sekretasekomponente Nicastrin (*NCSTN*) im Mittel auf $85,9 \pm 1,7$ % ($p \leq 0,001$). Isoliert betrachtet resultierten jeweils die Behandlungen mit Calcifediol ($83,3 \pm 4,1$ % ($p = 0,015$)), Calcipotriol ($83,9 \pm 2,8$ % ($p = 0,005$)), Alfacalcidol ($83,1 \pm 3,6$ % ($p = 0,009$)), Paricalcitol ($88,5 \pm 3,2$ % ($p = 0,023$)) und Doxercalciferol ($82,8 \pm 2,7$ % ($p = 0,003$)) in signifikant reduzierter *NCSTN*-mRNA-Menge (Abbildung 18 B). Mittels ANOVA-Analyse wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den analysierten Vitamin D-Analoga detektiert ($p = 0,785$). Ein Vergleich, der durch die Vitamin D-Analoga vermittelten Effektstärken auf die γ -Sekretase-Aktivität mit der auf die *NCSTN*-Expression zeigte mit Ausnahme von Calcipotriol ($p = 0,023$) keine signifikanten Unterschiede (Calcifediol $p = 0,733$; Maxacalcitol $p = 0,955$; Alfacalcidol $p = 0,238$; Paricalcitol $p = 0,343$; Doxercalciferol $p = 0,914$).

4.1.2 Der Einfluss von Vitamin D auf die Expression von Genen, die mit der Alzheimerpathologie assoziiert sind

In den beiden vorausgegangenen Studien (GRIMM et al., 2014; GRIMM et al., 2017b) wurden neben direkten Effekten von Vitamin D oder seinen Analoga, welche mit Hilfe isolierter Membranen analysiert wurden, auch indirekte Einflüsse, die über eine Beeinflussung der Genexpression und des Proteingehaltes vermittelt wurden, beschrieben. Die transkriptionsregulatorische Wirkung von Vitamin D kann auf die Bindung an den Vitamin D-Rezeptor (VDR) zurückgeführt werden. Über diesen Liganden-aktivierten Transkriptionsfaktor, der auch im Gehirn exprimiert wird, kann Vitamin D die Expression einer Vielzahl von Genen regulieren.

Da nur wenig darüber bekannt ist, ob diejenigen Gene, die unter der Regulierung des VDR stehen, mit der Alzheimererkrankung assoziiert sind, wurde in diesem Forschungsprojekt die Transkription von mehr als 115 ausgewählten Alzheimer-relevanten Genen *in vivo* unter Vitamin D-Mangelbedingungen analysiert. Die Auswahl der Gene beruhte auf der Beteiligung an zellulären Prozessen, wie APP-Prozessierung, APP-Degradation, oxidativem Stress, Neuroinflammation, Lipid- und Energiemetabolismus, G-Protein vermittelter Signalweiterleitung, Neurogenese und transkriptioneller Regulierung, welche in der Alzheimerpathologie beeinträchtigt sind. Zudem wurden diese Gene teilweise in weiteren *Genomics* Studien in Assoziation mit der Alzheimererkrankung untersucht (beispielsweise (JANITSCHKE et al., 2020)).

Die Ergebnisse dieser Studie sind in *The Journal of Nutritional Biochemistry* (ELSEVIER-Verlag, *Impact Factor* dieser Fachzeitschrift Stand November 2022: 6,117) veröffentlicht:

Lauer AA*, Grimm MOW*, Grösgen S, Thiel A, Lehmann J, Winkler J, Janitschke D, Herr C, Beisswenger C, Bals R, Grimm HS, Hartmann T. *Profiling of Alzheimer's disease related genes in mild to moderate vitamin D hypovitaminosis*. J Nutr Biochem. 2019 May; 67:123-137. doi: 10.1016/j.jnutbio.2019.01.015. Epub 2019 Feb 11. PMID: 30889441. *diese Autoren haben gleichermaßen zu dieser Publikation beigetragen

Der experimentelle Eigenanteil der Autorin der vorliegenden Arbeit belief sich im Rahmen des Vitamin D-*Genomics*-Projektes auf die Durchführung der Genexpressionsanalysen. Eine detaillierte Beschreibung dieses experimentellen Anteils ist den jeweiligen Unterschriften der folgenden Abbildungen sowie der entsprechenden Kooperationstabelle (Tabelle 34) zu entnehmen.

Tabelle 34: Kooperationen im Rahmen der Vitamin D-Genexpressionsstudie.

Abbildung	Experimenteller Anteil / Tätigkeit	ausführende Person
Tabellen 35-36	Design der verwendeten Primer	Dr. Sven Grösgen Anna A. Lauer
	Selektion der analysierten Gene und deren Verbindung zur Alzheimererkrankung	Andrea Thiel Jakob Winkler Daniel Janitschke Anna A. Lauer
	Analyse der Genexpression in muriner Kohorte I und Kohorte II	Dr. Sven Grösgen Andrea Thiel Dr. Johannes Lehmann Anna A. Lauer

Abbildung 20	Analyse der Genexpression unter Verwendung von vier <i>housekeeping</i> Genen	Anna A. Lauer
Abbildung 19	Studiendesign, Projektbetreuung und -Koordination	Prof. Marcus Grimm

Die Analyse der Expression 117 ausgewählter Gene in murinen hypovitaminosen Hirnproben (Kapitel 3.1.4.2) erfolgte mittels qRT-PCR-Analyse (Kapitel 3.2.1.6). Innerhalb der analysierten Gene dienten *Nep* (Neprilysin, Membran-Metallo-Endopeptidase, MME) und *Park7* (*Parkinson disease (autosomal recessive, early onset) 7*), von denen bereits bekannt war, dass ihre Expression sowohl von der Alzheimerpathologie als auch von einer Hypovitaminose D beeinflusst wird (Kapitel 5.1.3.1 und 5.1.3.2), als Positivkontrollen. Das Studiendesign, welches in Abbildung 19 dargestellt ist, umfasste zunächst die Analyse der Transkription der 117 ausgewählten Gene in einer ersten Mausekohorte, welche sich aus vier wildtypischen und vier Vitamin D-Mangel-Tieren zusammensetzte. Die führenden Zielgene wurden objektiv anhand eines Signifikanzwertes $p \leq 0,1$ ausgewählt. Die Expression der aus dieser Auswahl resultierenden 25 Gene wurde anschließend in einer zweiten Mausekohorte, welche aus drei Kontroll- und drei Vitamin D-Mangel-Tieren bestand, analysiert. Diejenigen elf Gene, deren Expression auch in der zweiten Vitamin D-Mangel-Mausekohorte verglichen zu den Mäusen mit suffizientem Vitamin D-Status mit einem Signifikanzwert $p \leq 0,1$ verändert waren, wurden anschließend gegen drei weitere *housekeeping* Gene (ATP-Synthase Untereinheit Beta, *Atp5b*; Myosinphosphatase Rho interagierendes Protein, *Mrip1* und RNS-Polymerase II Untereinheit F, *Polr2f*) evaluiert. Dies resultierte in der signifikanten ($p \leq 0,05$) Änderung der Transkription von acht Alzheimer-relevanten Genen unter Vitamin D-Mangelbedingungen in murinen Hirnproben.

Es wurde sich für dieses Studiendesign und gegen die gepoolte Analyse beider Mausekohorten entschieden, da es sich bei dieser getrennten Analyse der beiden Kohorten statistisch gesehen um eine stringenter und konservativere Art der Expressionsanalyse handelt. In einem gepoolten Ansatz besteht bei Annahme einer 5 %-igen Irrtumswahrscheinlichkeit die Möglichkeit von circa sechs falsch positiv veränderten Genen, während diese Anzahl bei der getrennten Analyse auf Grund der geringeren Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,25 % lediglich 0,3 falsch positiv veränderte Gene beträgt. Basierend darauf wurde sich bei der Auswahl der führenden Zielgene für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 10 % ($p \leq 0,1$) entschieden, um für beide Kohorten bei 117 analysierten Genen von einer Anzahl an falsch positiven Genen von $< 1,2$ ausgehen zu können.

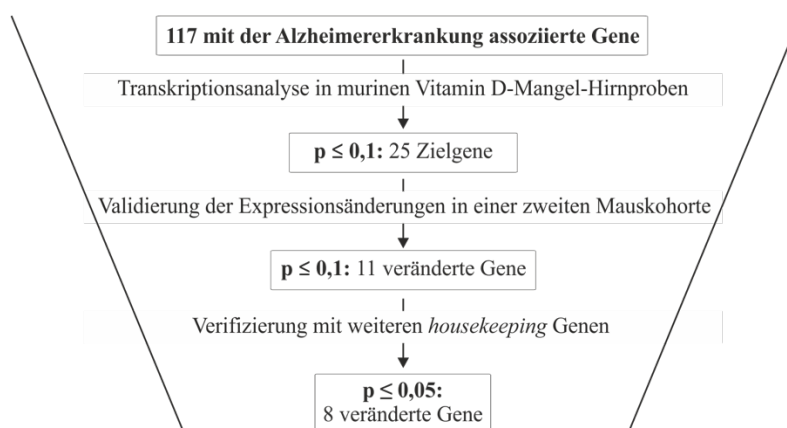


Abbildung 19: Schematische Darstellung des Studiendesigns zur Analyse des Einflusses einer Hypovitaminose D auf die Expression von Genen, die in Alzheimer-relevante Stoffwechselwege involviert sind, in murinen Hirnproben. Abbildung verändert nach (GRIMM et al., 2019).

Die Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse dieser 117 Gene in einer ersten Mauskoorte bestehend aus vier Vitamin D-Mangel-Mäusen verglichen mit vier WT-Mäusen sind in Tabelle 35 aufgelistet.

Tabelle 35: Expressionsänderungen der 117 ausgewählten Alzheimer-relevanten Genen unter milder bis moderater Hypovitaminose D (n = 4). Tabelle verändert nach (GRIMM et al., 2019).

Gen	% der Kontrolle	Standardfehler	p Wert
<i>Pkp4</i>	77,95	1,25	0,000
<i>Mpp4</i>	52,79	5,06	0,000
<i>Plat</i>	63,75	4,28	0,000
<i>Apbal</i>	65,91	4,59	0,000
<i>Ppp1r15b</i>	69,67	5,87	0,001
<i>Nep</i>	67,08	8,07	0,007
<i>Prkcd</i>	65,99	8,40	0,007
<i>Aph1c</i>	70,55	7,76	0,009
<i>Acat3</i>	144,78	12,90	0,013
<i>Casp4</i>	162,99	18,36	0,014
<i>Gap43</i>	89,39	3,42	0,021
<i>Apbb2</i>	74,42	8,55	0,024
<i>Ep300</i>	66,96	11,21	0,026
<i>Gnb5</i>	63,32	12,79	0,029
<i>Psmb5</i>	161,47	21,96	0,031
<i>Gnb4</i>	65,24	14,30	0,051
<i>Gnao1</i>	82,36	7,41	0,055
<i>Snca</i>	140,27	18,53	0,073
<i>Acat1</i>	195,21	44,09	0,074
<i>Nqo1</i>	80,66	9,09	0,077
<i>Park7</i>	74,73	11,99	0,080
<i>Prkce</i>	72,35	13,13	0,080
<i>Gpx5</i>	166,18	33,29	0,094
<i>Abca1</i>	157,51	29,09	0,095
<i>Insr</i>	67,25	16,77	0,099
<i>Prkaa2</i>	79,18	11,68	0,125
<i>Sncb</i>	82,63	10,24	0,141
<i>Map2</i>	93,73	4,04	0,171
<i>Cdkl1</i>	93,72	4,06	0,173
<i>Ece2</i>	86,08	9,02	0,174
<i>Xpa</i>	70,31	19,40	0,177
<i>Lpl</i>	119,20	12,59	0,178
<i>Ctsg</i>	333,69	159,88	0,194
<i>Gpx6</i>	139,95	28,36	0,209
<i>Ins</i>	210,65	78,88	0,210
<i>Acat2</i>	159,74	42,99	0,214
<i>Bche</i>	146,34	33,47	0,215
<i>Prkca</i>	81,63	13,29	0,216
<i>Apbb1</i>	87,10	9,38	0,218
<i>Serpina3a</i>	260,19	121,19	0,234
<i>Clu</i>	86,13	10,53	0,236
<i>Mmp2</i>	146,13	36,96	0,258
<i>Aph1b</i>	92,73	5,84	0,260
<i>Cdk5</i>	113,68	11,63	0,284
<i>Ctsb</i>	146,67	40,77	0,296
<i>Epx</i>	111,53	10,53	0,316
<i>Hdac1</i>	151,76	47,93	0,322
<i>Ide</i>	153,98	50,94	0,330
<i>Ecel</i>	78,59	20,34	0,333
<i>Prdx1</i>	84,55	15,34	0,353
<i>Bace2</i>	126,88	27,15	0,360
<i>Gpx7</i>	132,70	33,09	0,361

ausgewählte
Kandidaten-
Gene für die
Analyse in
einer zweiten
murinen
Kohorte

<i>Ern1</i>	115,60	15,79	0,362
<i>Idh1</i>	143,13	43,99	0,365
<i>Ucp3</i>	490,65	412,05	0,380
<i>Gsk3b</i>	170,56	75,52	0,386
<i>Apba3</i>	84,97	16,40	0,395
<i>Plg</i>	222,90	134,94	0,398
<i>Adam9</i>	89,38	11,79	0,403
<i>Plau</i>	78,38	24,54	0,412
<i>Lrp6</i>	107,60	8,78	0,420
<i>Mpo</i>	157,64	70,46	0,445
<i>Chat</i>	146,56	59,33	0,462
<i>Txnip</i>	135,23	48,89	0,498
<i>Prkc1</i>	119,69	27,66	0,503
<i>Prkcq</i>	127,20	39,09	0,513
<i>Mapt</i>	102,27	3,39	0,528
<i>Il1a</i>	120,84	31,28	0,530
<i>Gpx1</i>	86,52	21,48	0,554
<i>Prkcg</i>	85,51	23,42	0,559
<i>Adam17</i>	113,92	22,74	0,563
<i>Bdnf</i>	111,42	18,80	0,566
<i>Lrp1</i>	96,86	5,24	0,570
<i>Cat</i>	109,43	15,82	0,573
<i>Psen2</i>	112,84	22,02	0,581
<i>Hmgcr</i>	138,22	67,83	0,593
<i>Prdx2</i>	108,25	15,37	0,611
<i>Erc6</i>	107,48	14,62	0,627
<i>Appbp1</i>	105,83	11,53	0,631
<i>Ctsl</i>	95,03	9,95	0,635
<i>Prkcb1</i>	91,20	18,67	0,654
<i>Uqcrc2</i>	122,45	48,07	0,657
<i>Ncstn</i>	115,11	32,38	0,657
<i>Ubqln1</i>	107,95	17,20	0,660
<i>Ache</i>	95,31	10,29	0,664
<i>Tpo</i>	129,25	65,43	0,671
<i>Prkaa1</i>	109,64	22,06	0,678
<i>Uqcrc1</i>	107,28	17,45	0,691
<i>Apoa1</i>	124,69	60,01	0,695
<i>Cdc2</i>	92,96	17,12	0,695
<i>ApoE</i>	93,91	15,42	0,706
<i>Hadh2</i>	115,69	40,94	0,715
<i>App</i>	112,38	32,59	0,717
<i>Psenen2</i>	108,82	24,80	0,734
<i>Mmp9</i>	93,62	18,02	0,736
<i>Aass</i>	107,73	22,24	0,740
<i>Bace1</i>	96,45	10,48	0,746
<i>Duox1</i>	112,77	38,29	0,750
<i>Gab1</i>	94,45	16,76	0,752
<i>Gpx2</i>	115,72	50,49	0,766
<i>Als2</i>	112,12	39,76	0,771
<i>Prdx6</i>	104,81	17,60	0,794
<i>Ace</i>	109,54	36,98	0,805
<i>Txnrd2</i>	94,19	22,84	0,808
<i>Aph1a</i>	103,96	15,65	0,809
<i>Prkcz</i>	114,45	59,68	0,817
<i>A2m</i>	106,50	39,10	0,874
<i>Gnb2</i>	106,41	41,28	0,882
<i>Gsk3a</i>	97,53	16,92	0,889
<i>Psen1</i>	92,27	54,56	0,892
<i>Gpx3</i>	97,02	28,02	0,919
<i>Sod1</i>	101,63	16,64	0,925

<i>Gnb1</i>	101,74	26,65	0,950
<i>Prnp</i>	101,35	30,06	0,966
<i>Nudt15</i>	101,09	30,20	0,972
<i>Casp3</i>	99,58	15,47	0,979
<i>Ercc2</i>	99,77	10,05	0,982

Die Expression der Gene *Pkp4*, *Mpp4*, *Plat*, *Apbal*, *Ppp1r15b*, *Prkcd*, *Aph1c*, *Acat3*, *Casp4*, *Gap43*, *Apbb2*, *Ep300*, *Gnb5*, *Psmb5*, *Gnb4*, *Gnao1*, *Snca*, *Acat1*, *Nqo1*, *Prkce*, *Gpx5*, *Abcal* und *Insr* sowie der beiden als Positivkontrollen agierenden Gene *Nep* und *Park7* waren in den Proben hypovitaminoser Maushirne im Vergleich zu denen wildtypischer Mäuse mit einem Signifikanzniveau $p \leq 0,1$ verändert. Die Transkriptionsänderungen dieser 25 Gene wurden in einer zweiten Mauskoorte validiert, deren Ergebnisse in Tabelle 36 aufgeführt sind.

Tabelle 36: Kombinierte Analyse beider Mauskoorten (n = 4 + n = 3) der 25 vielversprechendsten Alzheimer-relevanten Gene, welche basierend auf den Ergebnissen aus der ersten Mauskoorte ausgewählt wurden. Tabelle verändert nach (GRIMM et al., 2019).

Gen	% der Kontrolle	Standardfehler	p Wert	
<i>Nep</i>	77,91	6,80	0,0069	} ausgewählte Gene für die weitere Analyse mit drei zusätzlichen <i>housekeeping</i> Genen
<i>Acat1</i>	274,22	63,29	0,0175	
<i>Psmb5</i>	164,04	24,53	0,0228	
<i>Casp4</i>	154,69	21,03	0,0232	
<i>Plat</i>	75,05	8,23	0,0290	
<i>Snca</i>	154,86	24,24	0,0430	
<i>Ep300</i>	76,46	11,19	0,0572	
<i>Park7</i>	80,66	9,34	0,0607	
<i>Gnb5</i>	78,94	10,20	0,0613	
<i>Apbal</i>	81,24	10,29	0,0933	
<i>Abcal</i>	343,84	134,99	0,0960	
<i>Gpx5</i>	159,41	33,65	0,1029	
<i>Gnb4</i>	79,26	11,97	0,1089	
<i>Acat3</i>	127,88	17,11	0,1293	
<i>Apbb2</i>	87,94	10,09	0,2551	
<i>Gap43</i>	116,17	18,41	0,3968	
<i>Nqo1</i>	125,61	29,18	0,3973	
<i>Insr</i>	87,18	15,57	0,4262	
<i>Prkcd</i>	88,15	18,16	0,5263	
<i>Aph1c</i>	86,41	20,90	0,5278	
<i>Mpp4</i>	86,28	24,49	0,5857	
<i>Prkce</i>	94,20	15,97	0,7226	
<i>Ppp1r15b</i>	108,62	30,55	0,7827	
<i>Pkp4</i>	96,93	12,01	0,8029	
<i>Gnao1</i>	96,67	14,48	0,8221	

Aus der kombinierten Analyse beider Mauskohorten resultierten elf Gene, deren Expression mit einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,1$ unter hypovitaminosen Bedingungen im Vergleich zu Bedingungen ausreichender Vitamin D-Versorgung verändert war. Die Transkription der beiden als Positivkontrolle agierenden Gene *Nep* und *Park7* wurde durch den Vitamin D-Mangel reduziert (*Nep*: $77,9 \pm 6,8 \%$ ($p = 0,007$); *Park7*: $80,7 \pm 9,3 \%$ ($p = 0,061$)). Ähnlich verhielt es sich mit der Expression der Gene *Plat* ($75,1 \pm 8,2 \%$; $p = 0,029$), *Ep300* ($76,5 \pm 11,2 \%$; $p = 0,057$), *Park7* ($80,7 \pm 9,3 \%$; $p = 0,061$), *Gnb5* ($78,9 \pm 10,2 \%$; $p = 0,061$) und *Apbal* ($81,2 \pm 10,3 \%$; $p = 0,093$). Die mRNA-Menge der Gene *Acat1* ($274,2 \pm 63,3 \%$; $p = 0,018$), *Psm5* ($164,0 \pm 24,5 \%$; $p = 0,023$), *Casp4* ($154,7 \pm 21,0 \%$; $p = 0,023$), *Snca* ($154,9 \pm 24,2 \%$; $p = 0,043$) und *Abcal* ($343,8 \pm 135,0 \%$; $p = 0,096$) war, bedingt durch den Mangel an Vitamin D, erhöht.

Um die erhaltenen Daten weiter zu stärken, wurde eine qRT-PCR-Analyse dieser Gene normalisiert auf die drei zusätzlichen *housekeeping* Gene *Atp5b*, *Mprp* und *Polr2f* durchgeführt. Die Auswertung inklusive der Normierung auf den Durchschnitt der insgesamt vier *housekeeping* Gene resultierte in den vier signifikant ($p \leq 0,05$) reduzierten Genen *Plat* ($70,4 \pm 2,9 \%$; $p \leq 0,001$), *Gnb5* ($77,4 \pm 3,4 \%$; $p \leq 0,001$), *Nep* ($83,7 \pm 4,5 \%$; $p = 0,011$) und *Park7* ($88,1 \pm 4,2 \%$; $p = 0,029$) sowie den vier signifikant erhöhten Genen *Psm5* ($173,9 \pm 12,0 \%$; $p \leq 0,001$), *Casp4* ($194,8 \pm 16,1 \%$; $p = 0,001$), *Snca* ($160,2 \pm 10,4 \%$; $p = 0,001$) und *Acat1* ($214,1 \pm 23,1 \%$; $p = 0,003$) (Abbildung 20).

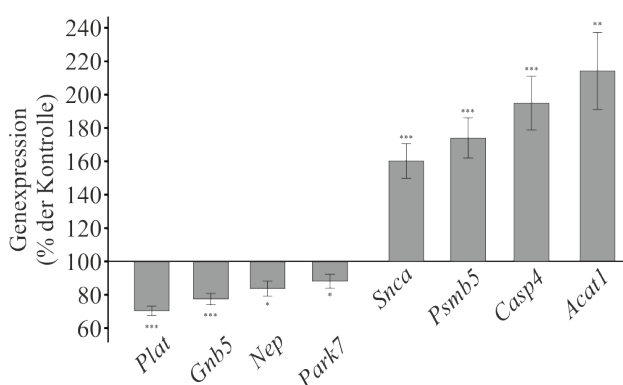


Abbildung 20: Expression derjenigen Gene, die in der kombinierten Analyse beider Hypovitaminose D-Mauskohorten ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,1$ aufwiesen, normiert gegen die vier *housekeeping* Gene *Actb*, *Atp5b*, *Mprp* und *Polr2f* ($n = 7$). Die Kontrollbedingung (suffizienter Vitamin D-Status) wurde auf 100 % gesetzt und als Abszisse im Säulendiagramm dargestellt. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Sterne stellen die statistische Signifikanz, die mittels ungepaartem Student-t-Test berechnet wurde, dar, wobei $*p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$ und $***p \leq 0,001$ gelten. Die Durchführung der Genexpressionsanalysen erfolgte in Kooperation mit Dr. Sven Grösgen, Dr. Johannes Lehmann und Andrea Thiel. Abbildung verändert nach (GRIMM et al., 2019).**

An dieser Stelle soll nochmals darauf hingewiesen werden, dass sich diese Transkriptionsänderungen bereits unter Bedingungen einer milden bis moderaten Vitamin D-Hypovitaminose detektieren ließen. Beispielsweise resultierte ein circa 23 %-iger Vitamin D-Mangel im Hirn von Mäusen in einer auf 214,11 % gesteigerten *Acat1* Expression. Dies würde bedeuten, dass bei angenommener Effektlinearität bereits eine Reduzierung von 25(OH) Vitamin D₃ um 1 % eine hypothetische Zunahme der *Acat1*-Transkription um circa 9 % bedingen würde.

4.1.3 Der Einfluss einer Vitamin D-Hypovitaminose auf die Lipidhomöostase

Die Veränderungen der Expression Lipidmetabolismus-verbundener Gene wie beispielsweise *Acat1* und *Abc1*, welche im vorherigen Kapitel 4.1.2 mit Hilfe von hypovitaminosem *in vivo* Material detektiert wurden, stehen im Einklang mit klinischen Studien, die einen Vitamin D-Mangel mit einer Dyslipidämie in Verbindung bringen (DIBABA, 2019; KIM, JEONG, 2019).

Basierend darauf war das Ziel dieses Forschungsabschnittes in der Analyse des Einflusses einer Vitamin D-Hypovitaminose auf die Alzheimerpathologie, spezieller Veränderungen in der Lipidhomöostase, definiert. Während einige Studien bereits Effekte von Vitamin D auf Lipide in Geweben wie Niere oder Darm beschrieben haben, ist aktuell wenig über den Einfluss dieses Secosteroids auf den Lipidmetabolismus im Gehirn bekannt. Aus diesem Grund wurden Maushirne mit einem milden Vitamin D-Mangel von 23 % (Kapitel 3.1.4.2) mittels gezieltem *Shotgun Lipidomics*-Ansatz, welcher neben Phospholipiden auch (Acyl- und Acetyl-) Carnitine sowie TAG inkludierte, analysiert. Bei diesen Lipidspezies handelt es sich um die am häufigsten vorkommenden Vertreter in SH-SY5Y-Zellen (JAKUBEC et al., 2019) sowie um Lipide, von welchen bekannt ist, dass sie im Rahmen der Alzheimererkrankung verändert sind, oder Lipide, von denen beschrieben wurde, dass sie die Progression der Erkrankung modulieren. Die detektierten Veränderungen im Lipidprofil der Maushirne wurden mit humanen Neuroblastomzellen (SH-SY5Y-WT) verglichen. Diese wurden unter Serum-reduzierten Bedingungen (1 % FCS) kultiviert und für 48 Stunden entweder mit der Lösungsmittelkontrolle Ethanol (Vitamin D-Mangelbedingungen) oder in Anwesenheit von 100 nM der 1,25-dihydroxylierten Form von Vitamin D₃, Calcitriol (Vitamin D-*Rescue*-Bedingungen) inkubiert.

Die Ergebnisse dieser Studie sind in *Biomolecules* (MPDI-Verlag, *Impact Factor* dieser Fachzeitschrift Stand November 2022: 6,064) veröffentlicht:

Lauer AA, Griebisch LV, Pilz SM, Janitschke D, Theiss EL, Reichrath J, Herr C, Beisswenger C, Bals R, Valencak TG, Portius D, Grimm HS, Hartmann T, Grimm MOW. *Impact of Vitamin D3 Deficiency on Phosphatidylcholine-/Ethanolamine, Plasmalogen-, Lyso-Phosphatidylcholine-/Ethanolamine, Carnitine- and Triacyl Glyceride-Homeostasis in Neuroblastoma Cells and Murine Brain*. *Biomolecules*. 2021 Nov 15;11(11):1699. doi: 10.3390/biom11111699. PMID: 34827697; PMCID: PMC8615687.

Der experimentelle Eigenanteil der Autorin der vorliegenden Arbeit belief sich im Rahmen des Vitamin D-*Lipidomics*-Projektes auf die Inkubation der Zellen mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (Calcitriol), die lipidanalytischen Analysen inklusive der Etablierung der Detektion ausgewählter Triacylglycerid-Spezies, die Verifizierung der suffizienten Calcitriol-Aufnahme und die Analyse des Sauerstoffverbrauchs. Eine detaillierte Beschreibung dieses experimentellen Anteils ist den jeweiligen Unterschriften der folgenden Abbildungen sowie der entsprechenden Kooperationstabelle (Tabelle 37) zu entnehmen.

Tabelle 37: Kooperationen im Rahmen der Calcitriol-Lipidomics-Analyse.

Abbildung	Experimenteller Anteil / Tätigkeit	ausführende Person
Abbildung 21	Analyse der Zellviabilität mittels LDH-Zytotoxizitätsanalyse	Lea V. Griebisch
	Genexpressionsanalyse (<i>IL-34</i>)	Anna A. Lauer
Abbildungen 22-26	Inkubation von SH-SY5Y-Zellen mit 1,25-Dihydroxyvitamin D ₃	Lea V. Griebisch Sabrina M. Pilz Elena L. Theiss Anna A. Lauer
	Massenspektrometrische Lipidanalyse der Phospholipid-, Carnitin- und TAG-Spiegel in inkubierten SH-SY5Y-Zellen	Daniel Janitschke Anna A. Lauer
	Massenspektrometrische Lipidanalyse der Phospholipid-, Carnitin- und TAG-Spiegel in murinen Hirnproben	Anna A. Lauer
	Analyse des Sauerstoffverbrauches	Anna A. Lauer
	Studiendesign, Projektbetreuung und -Koordination	Prof. Marcus Grimm

Unter den gewählten Inkubationsbedingungen wurde kein Einfluss von Calcitriol auf die Viabilität der Neuroblastomzellen festgestellt, wie das in Abbildung 21 dargestellte Ergebnis der Zytotoxizitätsanalyse verdeutlicht. Zudem wurde eine zelluläre Aufnahme von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ durch die erhöhte Expression des Gens *IL-34*, von welchem bekannt ist, dass seine Transkription in SH-SY5Y-Zellen, die mit der aktiven Form von Vitamin D inkubiert wurden, gesteigert ist (ZHANG et al., 2017a), verifiziert (Abbildung 21). Gleichzeitig wurde neben der Aufnahme dieser aktiven Form von Vitamin D auch die Ausübung dessen biologischer, transkriptionsregulatorischer Funktion in den hier herangezogenen humanen Neuroblastomzellen (SH-SY5Y-Zellen) unter den gewählten experimentellen Bedingungen sichergestellt.

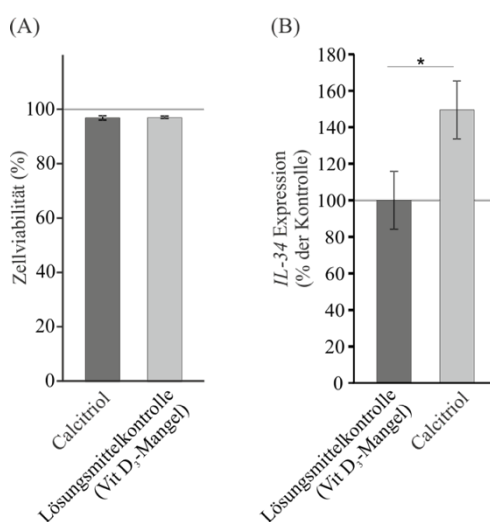


Abbildung 21: Einflüsse der Calcitriolbehandlung auf die Zellviabilität und Validierung der suffizienten Calcitriolaufnahme. (A) Analyse der Zellviabilität nach Inkubation von SH-SY5Y-WT Zellen mit 100 nM 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (Calcitriol) für 48 Stunden mit Hilfe der Zytotoxizität-Detektionsanalyse (n = 8). (B) Genexpression von *IL-34* in SH-SY5Y-Zellen, die für 48 Stunden mit 100 nM 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (Calcitriol) behandelt wurden (n = 5). Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Sterne stellen die statistische Signifikanz, die mittels ungepaartem Student-t-Test berechnet wurde, dar, wobei *p ≤ 0,05 gilt. Die Durchführung der Zellviabilitätsanalyse erfolgte in Kooperation mit Lea V. Griebisch. Abbildung verändert nach (LAUER et al., 2021a).

Sowohl in der Zellkultur als auch *in vivo* resultierten verringerte Vitamin D-Spiegel in veränderten Lipidmengen, auf die im Folgenden detailliert eingegangen wird. Dabei wird sich auf Kopfgruppe, Ester- oder Etherbindung, Sättigung und Kettenlänge als Parameter für chemische Ähnlichkeiten zwischen den Lipidspezies fokussiert.

4.1.3.1 Der Effekt eines Vitamin D-Mangels auf Phospholipide

Phosphatidylcholine (PC; 1,2-Diacyl-*sn*-glycero-3-Phosphocholin), welche auch unter dem Trivialnamen Lecithine bekannt sind, repräsentieren bis zu 10 % der Trockenmasse des humanen Gehirns und bis zu 35 % der Gesamt-Phospholipide und sind eine essenzielle Komponente der Membrandoppelschicht (SASTRY, 1985). PC können in der Diacylform (PCaa) oder der Alkyl-Acyl-Form (PCae), welche auch als Plasmalogen bekannt ist, vorkommen.

In SH-SY5Y-WT-Zellen bedingte ein Mangel an Calcitriol einen signifikanten Anstieg der ungewichteten Effektstärke der analysierten PCaa-Spezies auf $105,1 \pm 0,7$ % ($p \leq 0,001$), welcher unabhängig der Verteilung der einzelnen PCaa-Spezies innerhalb der Klasse der PCaa-Lipide war. Die Darstellung im Volcano Plot (Kapitel 3.2.5.3) ermöglicht eine schnelle Gruppenanalyse und verdeutlicht in Abbildung 22 A, dass die komplette PCaa-Lipidklasse in hypovitaminosen Zellen ausnahmslos erhöht war. Interessanterweise konnte eine ähnliche Tendenz von gesteigerten PCaa-Spezies auch in den Vitamin D-Mangel-Maushirnproben beobachtet werden, wobei die signifikante Erhöhung auf $102,9 \pm 0,3$ % ($p \leq 0,001$) etwas schwächer verglichen zu den Ergebnissen des Zellkulturansatzes ausfiel (Abbildung 22 C). Die PCaa-Spezies mit einer Kettenlänge > 40 Kohlenstoffatomen (C42:X und C48:X) waren sowohl in den Zellen als auch in den murinen Proben mit einer Effektstärke größer des mittleren Standardfehlers erhöht. In SH-SY5Y-Zellen bedingte der Vitamin D-Mangel einen Anstieg an PCaa-Spezies, die gesättigte Fettsäuren gebunden haben, was sich darin äußerte, dass sechs der acht erhöhten Spezies gesättigte Fettsäuren enthielten (C20:0, C24:0, C26:0, C28:0, C42:0 und C48:0). In den murinen Proben waren neben den vorhin genannten PCaa-Spezies C42:1 und C48:0 auch die beiden Spezies C34:2 und C34:3 bedingt durch den Mangel an Calcitriol erhöht. Bei C34:2 handelt es sich laut Literatur um eine der am häufigsten vertretenen Phospholipidspezies in SH-SY5Y-Zellen, welche sich mit einer hohen Wahrscheinlichkeit aus den Fettsäuren 16:1 und 18:1 zusammensetzt (JAKUBEC et al., 2019). Auch unter den experimentellen Bedingungen in der vorliegenden Arbeit stellte die Spezies PCaa C34:2 mit circa 26 % die Spezies mit der höchsten relativen Häufigkeit innerhalb der in die Analysen inkludierten PCaa-Spezies dar.

Neben den PC gelten Phosphatidylethanolamine (PE; 1,2-Diacyl-*sn*-glycero-3-Phosphoethanolamin) als zweithäufigster Vertreter der Phospholipide und repräsentieren häufig eine der Hauptkomponenten biologischer Membranen. Ähnlich zu den PC-Spezies können auch PE-Spezies in einer Diacyl- (PEaa), Alkyl-Acyl- (PEae / PE-Plasmalogene) oder Lyso-PE Form vorkommen. Unter den in dieser Arbeit gewählten Hypovitaminose D-Bedingungen wurden in SH-SY5Y-Zellen fast alle PEaa-Spezies mit einer Effektstärke größer dem mittleren SEM erhöht vorgefunden (Abbildung 22 B). Der Anstieg der Gesamt-PEaa in den Vitamin D-Mangel-SH-SY5Y-Zellen auf $123,2 \pm 0,8$ % war dabei signifikant ($p \leq 0,001$) und ähnlich der signifikanten Erhöhung auf $107,1 \pm 0,8$ % ($p \leq 0,001$), welche im murinen *in vivo* Material detektiert wurde. Hier war jedoch nur eine PEaa-Spezies mit einer Effektstärke größer dem mittleren SEM erhöht, was auf die geringere Anzahl verfügbarer muriner Hirnproben zurückgeführt werden könnte (Abbildung 22 D). Bei dieser Spezies handelte es sich um PEaa C40:0, welche auch in den SH-SY5Y-Zellen unter Calcitriol-Mangelbedingungen mit einer Effektstärke größer des mittleren Standardfehlers erhöht war.

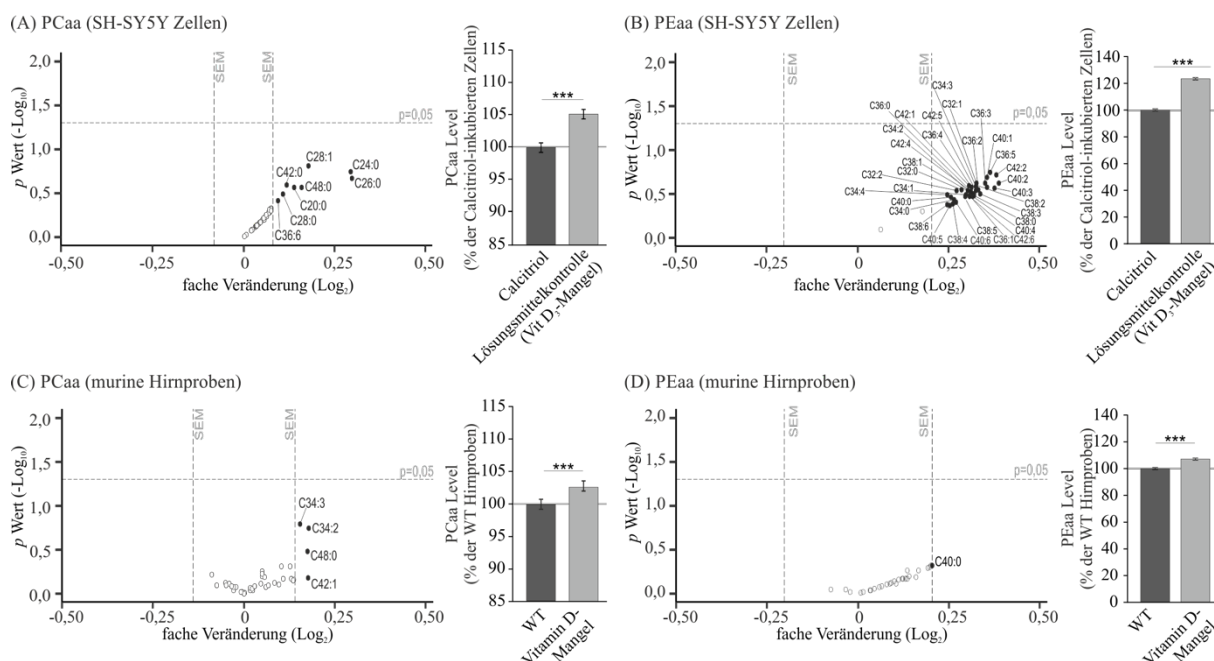


Abbildung 22: Effekte eines Vitamin D-Mangels auf Phosphatidylcholin- und -Ethanolaminspezies. (A) Die Spiegel an PCaa in SH-SY5Y-WT-Zellen, die für 48 Stunden mit der Lösungsmittelkontrolle Ethanol inkubiert wurden, im Vergleich zu denjenigen Spiegeln in Zellen, die mit 100 nM 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelt wurden ($n \geq 20$). Der detaillierte Aufbau der Volcano Plots ist 3.2.5.3 zu entnehmen. Die ausgefüllten Kreise repräsentieren Lipidspezies mit einer Effektstärke größer des durchschnittlichen SEM dieser Lipidklasse und ohne Erreichung des Signifikanzniveaus, welches auf $p \leq 0,05$ gesetzt wurde. Die unausgefüllten Kreise symbolisieren Lipidspezies mit einer Effektstärke innerhalb des durchschnittlichen SEM. Die Säulendiagramme rechts der Volcano Plots zeigen die relativen Veränderungen aller gemessenen Lipidspezies dieser Lipidklasse und vergleichen Calcitriol-behandelte mit Lösungsmittelkontrolle-inkubierten SH-SY5Y-Zellen. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Sterne stellen die statistische Signifikanz, die mittels ungepaartem Student-t-Test berechnet wurde, dar, wobei $***p \leq 0,001$ gilt. (B) Die Spiegel an PEaa in SH-SY5Y-WT-Zellen mit suffizientem Vitamin D-Status im Vergleich zu dem Gehalt in hypovitaminosen Zellen ($n \geq 20$). (C) PCaa-Spiegel in Hirnproben wildtypischer Mäuse im Vergleich zu Mäusen mit milder bis moderater Vitamin D-Hypovitaminose ($n \geq 5$). (D) PEaa-Spiegel in Hirnproben wildtypischer Mäuse im Vergleich zu Mäusen mit milder bis moderater Vitamin D-Hypovitaminose ($n \geq 5$). Die Inkubation der SH-SY5Y-WT-Zellen erfolgte in Kooperation mit Lea V. Griebisch, Sabrina M. Pilz und Elena L. Theiss, während die massenspektrometrische Lipidanalytik und Auswertung in Zusammenarbeit mit Daniel Janitschke stattfand. Abbildung verändert nach (LAUER et al., 2021a).

Plasmalogene (PCae: 1-alkyl, 2-acyl-*sn*-glycero-3-Phosphocholin; PEae: 1-alkyl, 2-acyl-*sn*-glycero-3-Phosphoethanolamin), die bis zu 22 % der Gesamtphospholipide im menschlichen Gehirn ausmachen, sind Membran-Glycerophospholipide, die eine Vinylether-Bindung an der *sn*1-Position enthalten (BRAVERMAN, MOSER, 2012).

In der vorliegenden Arbeit wurde detektiert, dass die Gesamtmenge der analysierten PCae-Spezies in Calcitriol-Mangel-Neuroblastomzellen leicht, jedoch signifikant in ihrer ungewichteten Effektstärke auf $101,3 \pm 0,5$ % ($p = 0,008$) erhöht war, wenn 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-inkubierte SH-SY5Y-WT-Zellen mit Lösungsmittelkontrolle-behandelten Zellen verglichen wurden (Abbildung 23 A). Hinsichtlich der PE-Plasmalogene tendierten 35 der 37 analysierten PEae-Spezies zu einer Erhöhung, was sich in einer signifikanten Gesamtzunahme auf $122,4 \pm 0,7$ % ($p \leq 0,001$) äußerte (Abbildung 23 B).

Einhergehend mit den Resultaten der zellkulturbasierten Experimente, waren die Spiegel an PC- und PE-Plasmalogenen in Hirnproben von Mäusen mit milder Hypovitaminose ebenfalls signifikant gesteigert (PCae: $103,1 \pm 0,8 \%$ ($p = 0,001$); PEae: $107,5 \pm 1,1 \%$ ($p \leq 0,001$); Abbildung 23 C-D). Bei Betrachtung der einzelnen PCae-Spezies wurde deutlich, dass zwei der drei im Hirngewebe von Hypovitaminose D-Mäusen veränderten Spezies auch in SH-SY5Y-Zellen unter Calcitriol-Mangel erhöht vorlagen. Hierbei handelt es sich um PCae C42:0 und C44:5. Neben PCae C42:0 ist in SH-SY5Y-Zellen C36:0 als weitere Spezies mit gebundenen gesättigten Fettsäuren erhöht. Im Unterschied zu den PCaa-Spezies, bei welchen hauptsächlich diejenigen Spezies mit gesättigten Fettsäuren bedingt durch den Mangel an Calcitriol gesteigert waren (Abbildung 22), handelte es sich bei den PC-Plasmalogenen überwiegend um Spezies, die einfach oder mehrfach ungesättigte Fettsäuren gebunden haben (C30:2, C38:1, C42:1, C42:3, C42:5, C44:3, C44:4, C44:5). Einhergehend mit den beobachteten Veränderungen der PC-Plasmalogene sind auch im Fall der PE-Plasmalogene sowohl in SH-SY5Y-Zellen als auch in den murinen Hirnproben mehrheitlich Spezies erhöht, die eine Fettsäure gebunden haben, welche mindestens eine Doppelbindung trägt. So zählen zu den in beiden Probenotypen einheitlich erhöhten PEae-Spezies die mehrfach ungesättigten Spezies C36:4, C40:2, C44:3 und C44:5 sowie die gesättigte Spezies C40:0. Ähnlich zu den PEaa-Spezies resultierte ein Mangel an Calcitriol in SH-SY5Y-Zellen in einer generellen Erhöhung der Spiegel an PE-Plasmalogenen, was sich dadurch äußerte, dass mit Ausnahme von zwei Spezies alle in diese Studie inkludierten PEae-Spezies mit einer Effektstärke größer des mittleren Standardfehlers gesteigert waren (Abbildung 23).

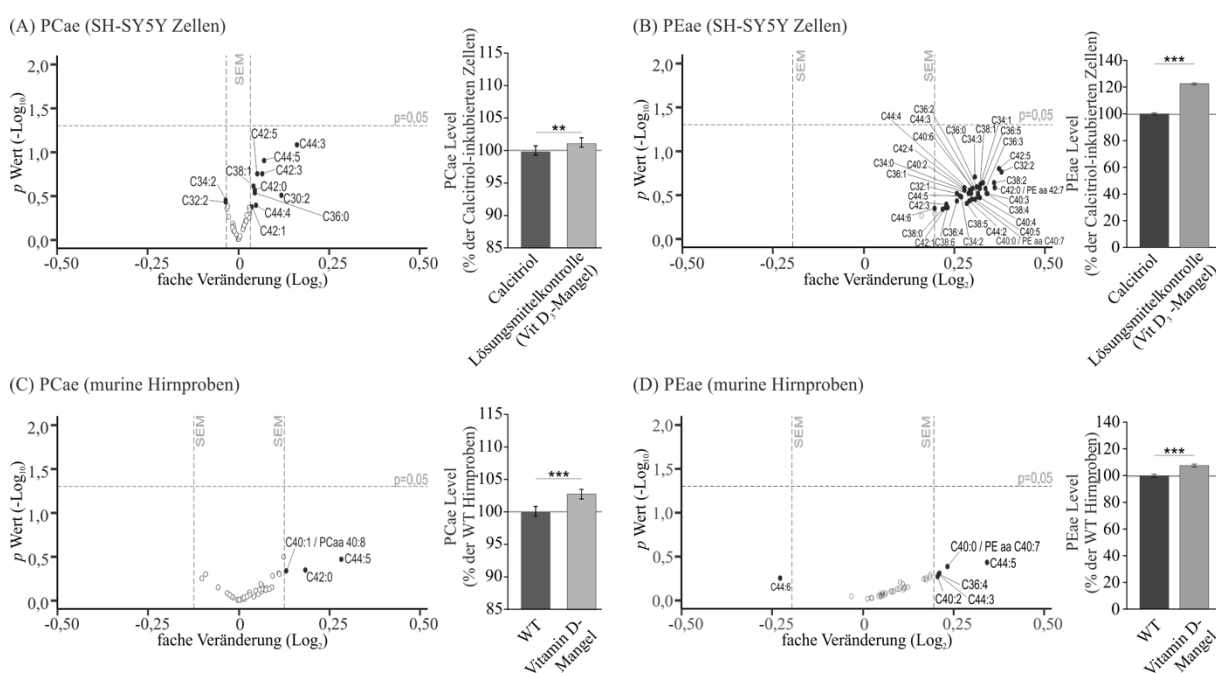


Abbildung 23: Effekte eines Vitamin D-Mangels auf PC- und PE-Plasmalogenspezies. (A) Die Spiegel an PC-Plasmalogenen (PCae) in SH-SY5Y-WT-Zellen, die für 48 Stunden mit der Lösungsmittelkontrolle Ethanol inkubiert wurden, im Vergleich zu denjenigen Spiegeln in Zellen, die mit 100 nM 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelt wurden ($n \geq 20$). Der detaillierte Aufbau der Volcano Plots ist 3.2.5.3 zu entnehmen. Die ausgefüllten Kreise repräsentieren Lipidspezies mit einer Effektstärke größer des durchschnittlichen SEM dieser Lipidklasse und ohne Erreichung des Signifikanzniveaus, welches auf $p \leq 0,05$ gesetzt wurde. Die unausgefüllten Kreise symbolisieren Lipidspezies mit einer Effektstärke innerhalb des durchschnittlichen SEM. Die Säulendiagramme rechts der Volcano Plots zeigen die relativen Veränderungen aller gemessenen Lipidspezies dieser Lipidklasse und vergleichen Calcitriol-behandelte mit Lösungsmittelkontrolle-inkubierten SH-SY5Y-WT-Zellen.

Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Sterne stellen die statistische Signifikanz, die mittels ungepaartem Student-t-Test berechnet wurde, dar, wobei $**p \leq 0,01$ und $***p \leq 0,001$ gelten. **(B)** Die Spiegel an PE-Plasmalogenen (PEae) in SH-SY5Y-Zellen mit suffizientem Vitamin D-Status im Vergleich zu dem Gehalt in hypovitaminosen Zellen ($n \geq 20$). **(C)** PCae-Spiegel in Hirnproben wildtypischer Mäuse im Vergleich zu Mäusen mit milder bis moderater Vitamin D-Hypovitaminose ($n \geq 5$). **(D)** PEae-Spiegel in Hirnproben wildtypischer Mäuse im Vergleich zu Mäusen mit milder bis moderater Vitamin D-Hypovitaminose ($n \geq 5$). Die Inkubation der SH-SY5Y-WT-Zellen erfolgte in Kooperation mit Lea V. Griebisch, Sabrina M. Pilz und Elena L. Theiss, während die massenspektrometrische Lipidanalytik und Auswertung in Zusammenarbeit mit Daniel Janitschke stattfand. Abbildung verändert nach (LAUER et al., 2021a).

Lyso-Phosphatidylcholine (Lyso-PC: 1- oder 2-acyl-*sn*-glycero-3-Phosphocholin) werden durch die katabole Aktivität der Phospholipase A₂ (PLA₂) von Phosphatidylcholinen abgeleitet und sind im Nervensystem vertreten (SASTRY, 1985).

In dieser Arbeit waren auf Grund eines Calcitriol-Mangels in SH-SY5Y-WT-Zellen neun der zehn Lyso-PC-Spezies, die eine Effektstärke größer des mittleren SEM aufwiesen, erhöht. Im Durchschnitt waren die Lyso-PC-Spiegel signifikant auf $106,7 \pm 2,3$ % ($p = 0,006$) gesteigert. Auffällig war, dass es sich bei den gesteigerten Lyso-PC-Spezies überwiegend um Spezies, die eine gesättigte Fettsäure gebunden haben (C10:0, C12:0, C20:0, C22:0, C24:0, C26:0, C28:0), handelte. Zudem trugen acht von zehn erhöhten Lyso-PC-Spezies eine Fettsäure der Kettenlänge C20 oder länger (C20:X, C22:X, C24:X, C26:X, C28:X). In den *in vivo* Proben Vitamin D-Mangel-Maushirne konnte ein ähnlicher, jedoch geringer ausgeprägter signifikanter Effekt einer Hypovitaminose D auf die Lyso-PC-Spiegel ausgemacht werden ($102,8 \pm 0,9$ % ($p = 0,003$); Abbildung 24 A und C). Die neun detektierten Lyso-PE-Spezies waren in Calcitriol-Mangel-SH-SY5Y-WT-Zellen alle stärker als der mittlere SEM erhöht, was in einer signifikanten Steigerung der Lyso-PE-Spiegel auf $120,4 \pm 1,9$ % ($p \leq 0,001$) resultierte. Allerdings konnte dieser Vitamin D-Mangel-bedingte Effekt nicht in den murinen Hirnproben validiert werden (Abbildung 24 B und D). Bei den in SH-SY5Y-Zellen unter Calcitriol-Mangelbedingungen erhöhten Lyso-PE-Spezies handelt es sich Spezies, die eine Fettsäure mit Kettenlängen zwischen 16 und 22 Kohlenstoffatomen gebunden haben (C16:X, C18:X, C20:X, C22:X). Zudem hatten im Vergleich zu den Lyso-PC-Spezies innerhalb der Lyso-PE-Spezies lediglich drei der neun gesteigerten Spezies eine gesättigte Fettsäure gebunden (Abbildung 24).

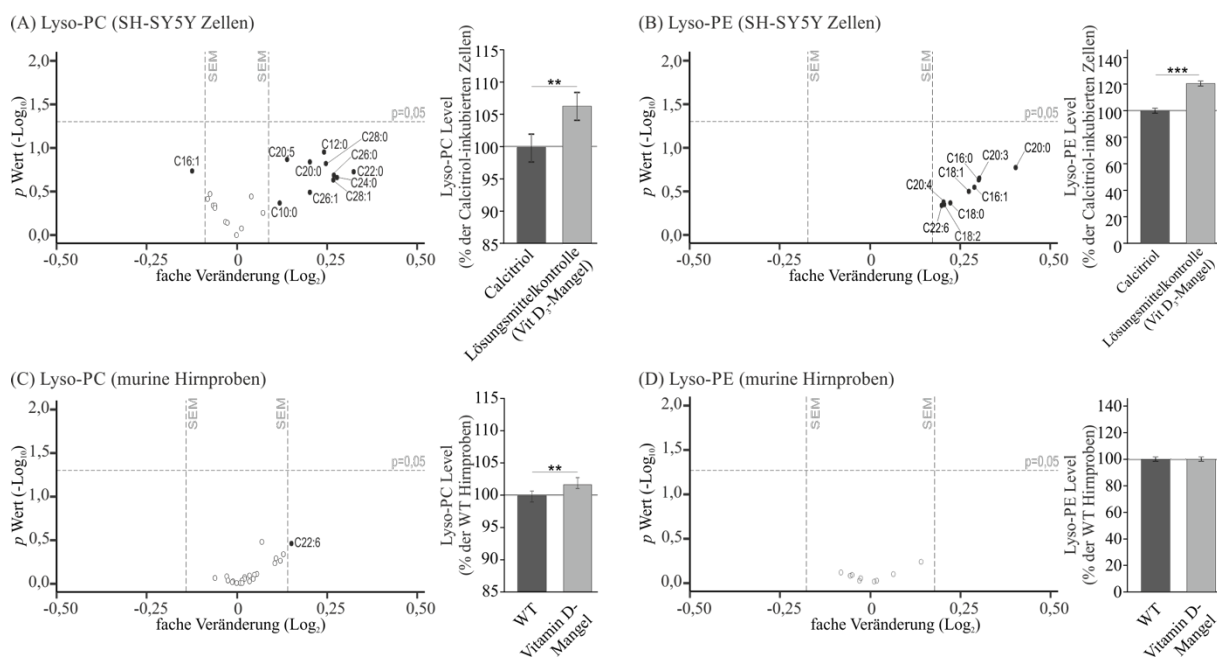


Abbildung 24: Effekte eines Vitamin D-Mangels auf Lyso-PC- und Lyso-PE-Spiegel. (A) Die Spiegel an Lyso-Phosphatidylcholinen (Lyso-PC) in SH-SY5Y-WT-Zellen, die für 48 Stunden mit der Lösungsmittelkontrolle Ethanol inkubiert wurden, im Vergleich zu denjenigen Spiegeln in Zellen, die mit 100 nM 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelt wurden ($n \geq 20$). Der detaillierte Aufbau der Volcano Plots ist 3.2.5.3 zu entnehmen. Die ausgefüllten Kreise repräsentieren Lipidspezies mit einer Effektstärke größer des durchschnittlichen SEM dieser Lipidklasse und ohne Erreichung des Signifikanzniveaus, welches auf $p \leq 0,05$ gesetzt wurde. Die unausgefüllten Kreise symbolisieren Lipidspezies mit einer Effektstärke innerhalb des durchschnittlichen SEM. Die Säulendiagramme rechts der Volcano Plots zeigen die relativen Veränderungen aller gemessenen Lipidspezies dieser Lipidklasse und vergleichen Calcitriol-behandelte mit Lösungsmittelkontrolle-inkubierten SH-SY5Y-WT-Zellen. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Sterne stellen die statistische Signifikanz, die mittels ungepaartem Student-t-Test berechnet wurde, dar, wobei $**p \leq 0,01$ und $***p \leq 0,001$ gelten. (B) Die Spiegel an Lyso-Phosphatidylethanolaminen (Lyso-PE) in SH-SY5Y-Zellen mit suffizientem Vitamin D-Status im Vergleich zu dem Gehalt in hypovitaminosen Zellen ($n \geq 20$). (C) Lyso-PC-Spiegel in Hirnproben wildtypischer Mäuse im Vergleich zu Mäusen mit milder bis moderater Vitamin D-Hypovitaminose ($n \geq 5$). (D) Lyso-PE-Spiegel in Hirnproben wildtypischer Mäuse im Vergleich zu Mäusen mit milder bis moderater Vitamin D-Hypovitaminose ($n \geq 5$). Die Inkubation der SH-SY5Y-WT-Zellen erfolgte in Kooperation mit Lea V. Griebisch, Sabrina M. Pilz und Elena L. Theiss, während die massenspektrometrische Lipidanalytik und Auswertung in Zusammenarbeit mit Daniel Janitschke stattfand. Abbildung verändert nach (LAUER et al., 2021a).

Diese detektierte Erhöhung der Lyso-PC-Spiegel könnte in einer gesteigerten Aktivität der Phospholipase A₂ (PLA₂) begründet sein und lässt vermuten, dass die beobachtete Erhöhung der PCaa/ae und PEaa/ae-Spezies unter Vitamin D-Mangelbedingungen (Abbildung 23) auf einen Effekt im Anabolismus zurückzuführen ist. Ein reduzierter Katabolismus als mögliche Ursache würde sich hingegen in einer verringerten PLA₂-Aktivität und folglich verminderten Lyso-PC-Spiegeln äußern, was nicht zutrifft.

Neben der Analyse der Daten als relative Veränderungen zwischen Vitamin D-Behandlung und Kontroll- bzw. Mangelbedingung wurden die Änderungen auch in mol% verglichen. Diese Daten resultierten aus der Division des Effekts einer Lipidspezies durch den Effekt der entsprechenden Lipidklasse, was eine detailliertere Betrachtung der Lipidklassen-unabhängigen Veränderungen ermöglichte. Diese prozessierten Daten wurden hinsichtlich der Kettenlänge und Sättigung der an das Lipidrückgrat gebundenen Fettsäuren interpretiert.

Eine detaillierte Analyse der zellkulturbasierten PCaa-Daten wies Unterschiede im Verhältnis derjenigen PCaa-Spezies, welche gesättigte Fettsäuren (*saturated fatty acids*, SFA), einfach-ungesättigte Fettsäuren (*monounsaturated fatty acids*, MUFA) und mehrfach-ungesättigte Fettsäuren (*polyunsaturated fatty acids*, PUFA) enthalten, auf. Die SFA/MUFA- und SFA/PUFA-Verhältnisse waren auf Grund erhöhter Spiegel an PCaa-Spezies mit SFA (von 14,6 auf 14,8 mol% ($p = 0,012$)) und leicht reduzierter Menge an MUFA- und PUFA-enthaltenen Spezies (MUFA von 45,5 auf 45,3 mol% ($p = 0,095$); PUFA von 39,9 auf 39,8 mol% ($p = 0,038$)) signifikant gesteigert (SFA/MUFA: $102,1 \pm 0,6 \%$ ($p = 0,006$); SFA/PUFA: $102,0 \pm 0,7 \%$ ($p = 0,033$)). Gleichzeitig wurden reduzierte Spiegel an PCaa-Spezies, welche mittelkettige Fettsäuren (C32:X - C36:X) gebunden haben, beobachtet (Abbildung 25 A). Vergleichbar mit diesen Effekten auf die PCaa-Spezies, waren auch in den PC-Plasmalogenen die SFA/MUFA- und SFA/PUFA-Verhältnisse erhöht, wobei ersteres Verhältnis statistische Signifikanz erreichte (SFA/MUFA: $101,3 \pm 0,5 \%$ ($p = 0,043$); SFA/PUFA: $101,0 \pm 0,9 \%$ ($p = 0,454$); Abbildung 25 B). Diese Veränderungen in den Sättigungsverhältnissen könnten durch tendenziell gesteigerte SFA-enthaltende und reduzierte MUFA-enthaltende PCae-Spezies erklärt werden: SFA von 12,5 auf 12,6 mol% ($p = 0,286$) und MUFA von 31,9 auf 31,7 mol% ($p = 0,046$). Hinsichtlich der Kettenlänge der Fettsäuren, die die analysierten PCae-Spezies gebunden hatten, wurde beobachtet, dass diejenigen Spezies, die mittelkettige Fettsäuren (C32:X - C36:X) enthalten, durch die milde Hypovitaminose D₃ signifikant von 61,2 auf 60,9 mol% verringert waren (Abbildung 25 B). Ähnliche Effekte hinsichtlich der Sättigung der detektierten PCae-Spezies konnten auch in den Hirnproben von Mäusen mit milder Hypovitaminose D₃ beobachtet werden, wobei diese keine statistische Signifikanz erreichten, was auf die geringere Stichprobenanzahl zurückgeführt werden könnte.

Unter den gewählten experimentellen Bedingungen war zudem der Sättigungsgrad der analysierten Lyso-PC-Spezies durch den Calcitriol-Mangel in SH-SY5Y-WT-Zellen beeinflusst. Das SFA/MUFA-Verhältnis war signifikant auf $107,4 \pm 2,8 \%$ ($p = 0,046$) erhöht und das SFA/PUFA-Verhältnis tendierte ebenfalls zu einer Erhöhung ($106,2 \pm 2,7 \%$ ($p = 0,092$)), während das MUFA/PUFA-Verhältnis unverändert blieb. Dies könnte durch gesteigerte SFA und reduzierte MUFA-Spiegel erklärt werden (SFA von 42,6 auf 44,3 mol% ($p = 0,058$) und MUFA von 49,4 auf 48,0 mol% ($p = 0,056$)). Zudem tendierten die PUFA-Spiegel zu einer Abnahme von 7,9 auf 7,8 mol% ($p = 0,323$), wobei X:2-Fettsäuren signifikant von 2,5 auf 2,4 mol% ($p = 0,020$) reduziert waren. Einhergehend mit diesen Beobachtungen waren diejenigen Lyso-PC-Spezies, die mittelkettige Fettsäuren (C16:X - C20:X) enthielten, in SH-SY5Y-WT-Zellen, die mit der Lösungsmittelkontrolle inkubiert wurden, tendenziell von 78,8 auf 76,4 mol% ($p = 0,078$) verringert (Abbildung 25 C).

Hinsichtlich der Alzheimerpathologie lassen diese Ergebnisse vermuten, dass ein Mangel an aktivem Vitamin D die Lipidhomöostase negativ beeinflusst, da die Spezies, die gesättigte Fettsäuren gebunden haben, ansteigen. Dies könnte dazu führen, dass vermehrt *Lipid Rafts* in der Membran auftreten und die amyloidogene APP-Prozessierung, die in diesen speziellen Mikrodomänen der Membran abläuft, begünstigt wird. Dieser potenzielle Zusammenhang wird in Kapitel 5.1.4.1 detaillierter diskutiert. Zwar sind die einzelnen Effekte in ihrer Stärke nicht besonders ausgeprägt, jedoch ziehen sich die pathologischen molekularen Mechanismen, die zur Entstehung und Progression des Morbus Alzheimer führen, auch über mehrere Jahre hin.

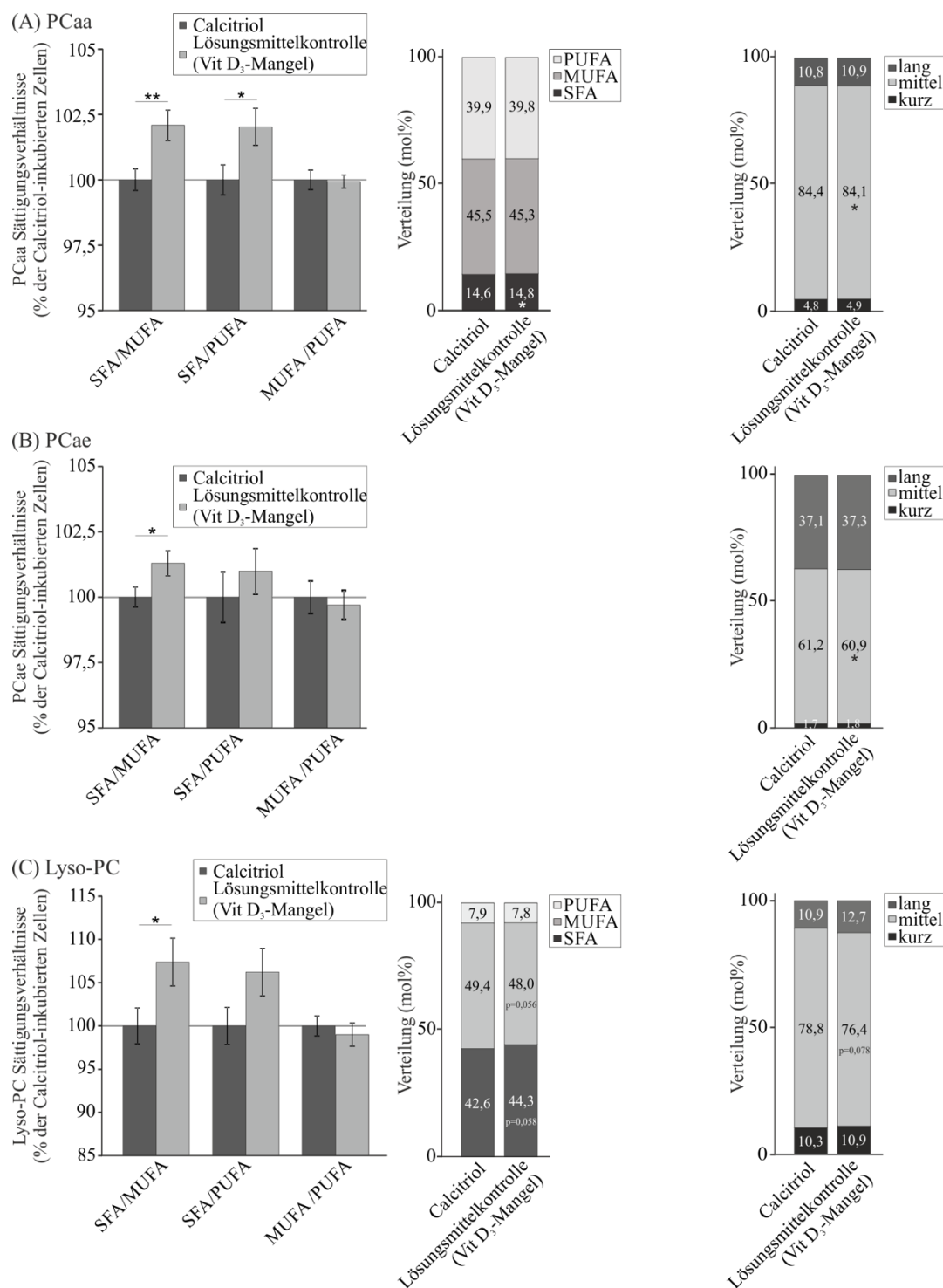


Abbildung 25: Einfluss eines Vitamin D-Mangels auf die Fettsäurekomposition. Detaillierte Analyse des Sättigungsgrades sowie der Kettenlänge von in PCaa- (A), PCae- (B) und Lyso-PC-Spezies (C) gebundenen Fettsäuren in Calcitriol- bzw. Lösungsmittel-inkubierten SH-SY5Y-WT-Zellen ($n \geq 20$). Die Säulendiagramme repräsentieren zum einen den Sättigungsgrad der in oben genannten Lipidspezies enthaltenen Fettsäuren und zum anderen die Verteilung von Sättigung und Kettenlänge in mol%. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. Sterne stellen die statistische Signifikanz, die mittels ungepaartem Student-t-Test berechnet wurde, dar, wobei $*p \leq 0,05$ und $**p \leq 0,01$ gelten. Die Inkubation der SH-SY5Y-WT-Zellen erfolgte in Kooperation mit Lea V. Griebisch, Sabrina M. Pilz und Elena L. Theiss, während die massenspektrometrische Lipidanalytik und Auswertung in Zusammenarbeit mit Daniel Janitschke stattfand. Abbildung verändert nach (LAUER et al., 2021a).

4.1.3.2 Der Effekt eines Vitamin D-Mangels auf TAG- und Carnitin-Spezies

Triacylglyceride (TAG), welche zur Gruppe der Neutrallipide gehören, sind wichtige Indikatoren für den zellulären Energiemetabolismus, da sie durch die Formierung von Lipidtropfen zur Speicherung von Energie beitragen. Außerdem werden die Fettsäuren, die den TAG entstammen, in den Mitochondrien zur Energieproduktion metabolisiert. Unter den in dieser Arbeit vorliegenden Calcitriol-Mangelbedingungen tendierten alle 14 analysierten TAG-Spezies zu einer Reduzierung im Vergleich zu SH-SY5Y-WT-Zellen, die suffizient mit Vitamin D versorgt waren. Im Durchschnitt waren die TAG-Spiegel signifikant auf $95,7 \pm 0,8 \%$ ($p \leq 0,001$) reduziert (Abbildung 26 A). Dieser auf zellulärer Ebene veränderte Gehalt an TAG konnte *in vivo* unter den analysierten milden Vitamin D-Hypovitaminose-Bedingungen nicht validiert werden (Abbildung 26 B), deutete jedoch eine Beeinflussung des zellulären Energiemetabolismus durch den Vitamin D-Mangel an.

Um die molekularen Mechanismen, durch welche Vitamin D die zelluläre Energiehomöostase beeinflusst, detaillierter aufklären zu können, wurden weiterführend die Spiegel an Carnitinen analysiert. Carnitine spielen eine wichtige Rolle im Transport von Fettsäuren vom Zytosol über die innere Mitochondrienmembran in die Mitochondrien, wo die β -Oxidation, der an Carnitine esterifizierten Fettsäuren, stattfindet. Mittels massenspektrometrischer Analyse wurden die Mengen an freiem L-Carnitin (C0), Acetyl-Carnitin (C2) und Acylcarnitinen (CX mit $X > 3$) in Vitamin D-Mangel-SH-SY5Y-WT-Zellen im Vergleich zu Zellen mit suffizientem Vitamin D-Status detektiert. Wie in Abbildung 26 C deutlich wird, konnten keine signifikanten Unterschiede in den C0-, C2- oder CX($X > 3$)-Spiegeln detektiert werden. Lediglich die Verhältnisse C18/C2 und $(C16+C18)/C2$, die Rückschlüsse auf den Umsatz von Fettsäuren in der β -Oxidation zulassen, resultierten unter milden hypovitaminosen Bedingungen in einer tendenziellen Erhöhung. Übereinstimmend damit wird anhand des Volcano Plots deutlich, dass die Acylcarnitin-Spezies C18:0 und C18:1 in SH-SY5Y-WT-Zellen bedingt durch den Calcitriolmangel signifikant erhöht wurden.

Basierend auf den reduzierten TAG-Spiegeln sowie den beobachteten Veränderungen innerhalb der analysierten Carnitin-Spezies, wurde weiterführend analysiert, ob Vitamin D durch Beeinflussung der Atmungsketten Auswirkungen auf die mitochondriale Funktion hat. Hierzu wurde der Sauerstoffverbrauch Calcitriol-inkubierter Zellen im Vergleich zu Zellen, die mit der Lösungsmittelkontrolle Ethanol inkubiert wurden, analysiert. Wie aus Abbildung 26 D hervorgeht, verringerte der Vitamin D-Mangel den Verbrauch an Sauerstoff unter den experimentellen Bedingungen signifikant ($63,32 \pm 5,71 \%$, $p = 0,003$). Potenzielle Gründe für die Unterschiede in den Effektstärken werden in Kapitel 5.1.4.2 detailliert diskutiert.

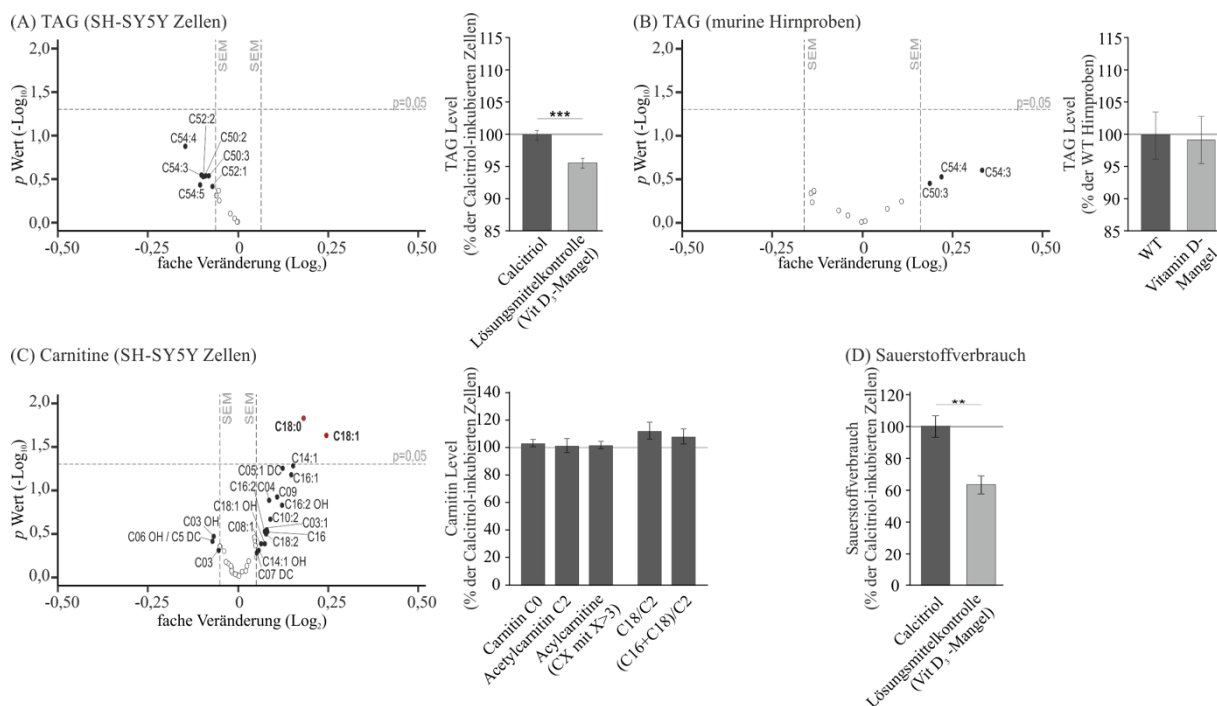


Abbildung 26: Einfluss eines Vitamin D-Mangels auf TAG- und Carnitin-Spezies. (A) Die Spiegel an Triacylglyceriden (TAG) in SH-SY5Y-WT-Zellen, die für 48 Stunden mit der Lösungsmittelkontrolle Ethanol inkubiert wurden, im Vergleich zu denjenigen Spiegeln in Zellen, die mit 100 nM 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ behandelt wurden ($n \geq 20$). Der detaillierte Aufbau der Volcano Plots ist 3.2.5.3 zu entnehmen. Die schwarz ausgefüllten Kreise repräsentieren Lipidspezies mit einer Effektstärke größer des durchschnittlichen SEM dieser Lipidklasse und ohne Erreichung des Signifikanzniveaus, welches auf $p \leq 0,05$ gesetzt wurde. Die unausgefüllten Kreise symbolisieren Lipidspezies mit einer Effektstärke innerhalb des durchschnittlichen SEM. Die Säulendiagramme rechts der Volcano Plots zeigen die relativen Veränderungen aller gemessenen Lipidspezies dieser Lipidklasse und vergleichen Calcitriol-behandelte mit Lösungsmittelkontrolle-inkubierten SH-SY5Y-Zellen. (B) TAG-Spiegel in Hirnproben wildtypischer Mäuse im Vergleich zu Mäusen mit milder bis moderater Vitamin D-Hypovitaminose ($n \geq 5$). (C) Die Spiegel an Carnitinen in SH-SY5Y-Zellen mit suffizientem Vitamin D-Status im Vergleich zu dem Gehalt in hypovitaminosen Zellen ($n \geq 20$). Im Volcano Plot sind diejenigen Lipidspezies, die durch rot ausgefüllte Kreise dargestellt sind, signifikant mit einer Effektstärke größer des durchschnittlichen SEM dieser Lipidklasse erhöht. Die Inkubation der SH-SY5Y-WT-Zellen erfolgte in Kooperation mit Lea V. Griebisch, Sabrina M. Pilz und Elena L. Theiss, während die massenspektrometrische Lipidanalytik und Auswertung in Zusammenarbeit mit Daniel Janitschke stattfand. (D) Sauerstoffverbrauch in SH-SY5Y-Zellen mit suffizientem Vitamin D-Status im Vergleich zu dem in hypovitaminosen Zellen ($n = 5$). Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Sterne stellen die statistische Signifikanz, die mittels ungepaartem Student-t-Test berechnet wurde, dar, wobei $**p \leq 0,01$ und $***p \leq 0,001$ gelten. Abbildung verändert nach (LAUER et al., 2021a).

4.2 Der Einfluss des Vitamin A-Derivates Acitretin auf Hirn- und Leber-Lipidhomöostase von transgenen Alzheimer-Mäusen

Neben einem Effekt des fettlöslichen Vitamins D₃ auf den Alzheimer-assoziierten Lipidmetabolismus, welcher in der vorliegenden Arbeit im vorausgehenden Kapitel gezeigt werden konnte, wurden auch für andere Vitamine, wie beispielsweise das ebenfalls fettlösliche Vitamin E, Einflüsse auf Lipide wie beispielsweise Cholesterin gezeigt, welche mit der Entstehung und Progression der Alzheimererkrankung in Verbindung stehen (GRIMM et al., 2016d).

Basierend auf diesen Erkenntnissen sollte in dieser Arbeit das fettlösliche Vitamin A hinsichtlich potenzieller Zusammenhänge mit der Lipidhomöostase analysiert werden. Da im Rahmen der Vitamin D-Studien ebenfalls positive Effekte der pharmazeutisch eingesetzten Analoga hinsichtlich der Alzheimerpathologie beobachtet wurden, wurde sich in dieser Arbeit auf das aromatische synthetische Vitamin A-Derivat Acitretin, welches zur Therapie entzündungsbedingter Hauterkrankungen eingesetzt wird, konzentriert. Es wurde der Einfluss einer Acitretinbehandlung auf die Lipidkomposition von Leber und Gehirn in Alzheimer-Modellmäusen mittleren Alters mittels semi-quantitativer *Shotgun* Massenspektrometrie analysiert. Dabei wurde sich auf Lipide, von denen bekannt ist, dass sie durch die Alzheimerpathologie oder die Prozessierung von APP beeinflusst werden oder dass sie in Serumproben von Acitretin-behandelten Patienten verändert sind, konzentriert.

Die Ergebnisse dieser Studie sind in *Scientific Reports* (Nature Research-Verlag, Impact Factor dieser Fachzeitschrift Stand November 2022: 4,996) veröffentlicht:

Lauer AA*, Janitschke D*, Dos Santos Guilherme M*, Nguyen VTT, Bachmann CM, Qiao S, Schrul B, Boehm U, Grimm HS, Hartmann T, Endres K*, Grimm MOW*. *Shotgun lipidomics of liver and brain tissue of Alzheimer's disease model mice treated with acitretin*. Sci Rep. 2021 Jul 27;11(1):15301. doi: 10.1038/s41598-021-94706-3. PMID: 34315969; PMCID: PMC8316403. *diese Autoren haben gleichermaßen zu dieser Publikation beigetragen

Der experimentelle Anteil der Autorin der vorliegenden Arbeit umfasste in dieser Studie die massenspektrometrische Lipidanalyse der Sphingomyeline, Carnitine, Phosphatidylcholine und deren Plasmalogene, Lyso-Phosphatidylcholine inklusive Etablierung der Detektion ausgewählter Triacylglycerid-Spezies. Die detaillierte Beschreibung dieses experimentellen Anteils ist den jeweiligen Unterschriften der folgenden Abbildungen sowie der entsprechenden Kooperationstabelle (Tabelle 38) zu entnehmen.

Tabelle 38: Kooperationen im Rahmen der Acitretin-Lipidomics-Analyse.

Abbildung	Experimenteller Anteil / Tätigkeit	ausführende Person
	Behandlung der 5xFAD-Mäuse mit Acitretin	Malena dos Santos Guilherme Vu Thu Thuy Nguyen
Abbildungen 28-32	Massenspektrometrische Lipidanalyse der Phospholipid-, Carnitin- und TAG-Spiegel in Hirn- und Leberproben der Acitretin-behandelten 5xFAD-Mäuse	Daniel Janitschke Cornel M. Bachmann Anna A. Lauer
	Ölrot-O-Färbung der Leberproben von 5xFAD-Mäusen	Prof. Bianca Schrul Sen Qiao
Abbildung 27	Studiendesign, Projektbetreuung und -Koordination	Prof. Marcus Grimm PD Dr. Kristina Endres

Zur Analyse eines möglichen Einflusses von Acitretin auf die Alzheimer-relevante Lipidhomöostase wurde 30 Wochen alten 5xFAD-Mäusen eine tägliche Dosis von 10 mg Acitretin pro Kilogramm Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Diese Dosis richtete sich nach der maximalen Dosierung im Menschen (50 mg/Tag) und entspricht den experimentellen Bedingungen, unter denen bereits gezeigt werden konnte, dass Acitretin Verhaltens- oder Kognitionsdefizite in Alzheimer-Mausmodellen verbessern kann. Die nachfolgende semi-quantitative massenspektrometrische Lipidanalyse inkludierte 750 Parameter, darunter Phospholipide (Sphingomyeline (SM), Phosphatidylcholine (PCaa), Phosphatidylcholin-Plasmalogene (PCae), Lyso-Phosphatidylcholine (Lyso-PC)), Neutral-Lipide (Triacylglyceride (TAG)) sowie Carnitine (Acyl- und Acetyl-Carnitine), die Bestandteile des Carnitin-Carrier-Systems sind, welches für den Transport von Fettsäuren vom Zytosol in die Mitochondrien, wo die Fettsäuren in der β -Oxidation metabolisiert werden, verantwortlich ist. Dabei wurden die Daten der Acitretin-behandelten transgenen Mäuse (n = 5) denen der kontrollbehandelten Tiere (n = 5) gegenübergestellt. Eine schematische Übersicht des Studiendesigns ist Abbildung 27 zu entnehmen.

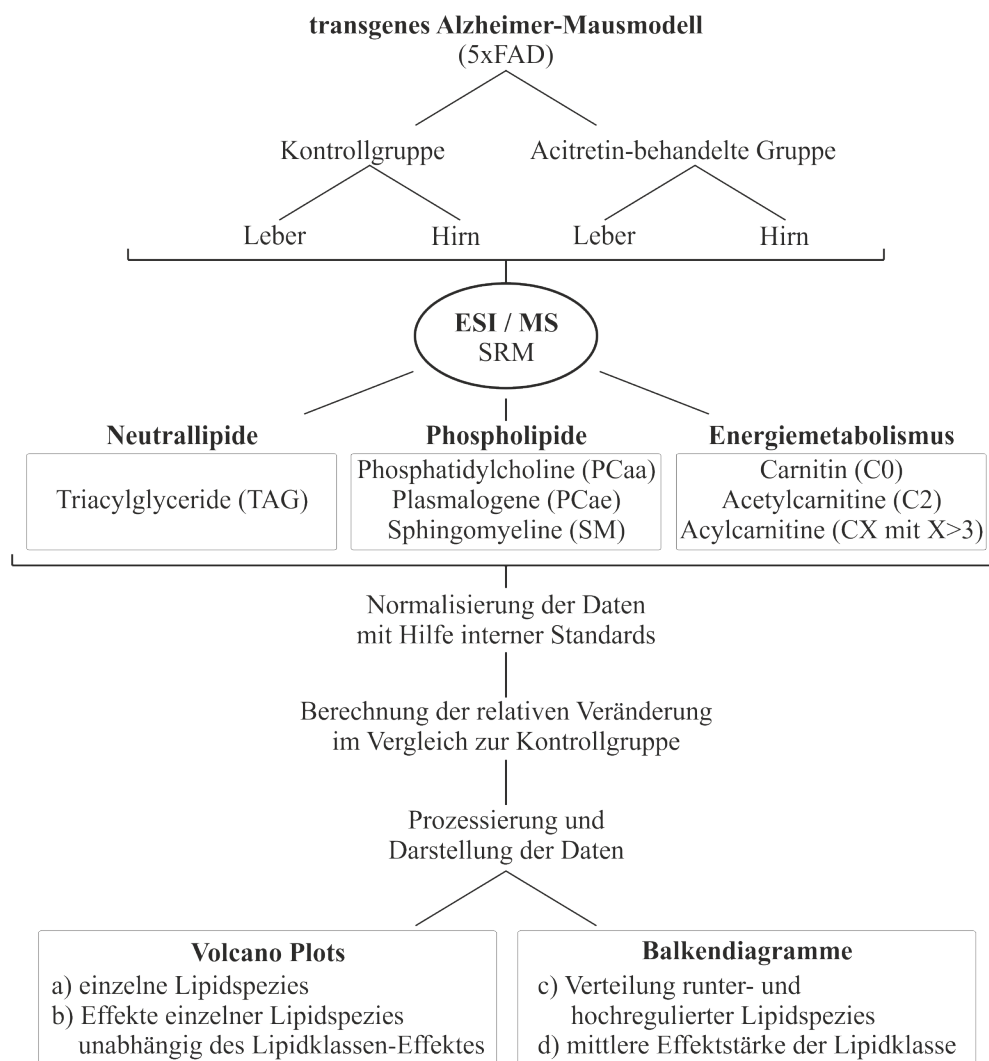


Abbildung 27: Schematische Darstellung des Studiendesigns zur Analyse des Einflusses des Vitamin A-Derivates Acitretin auf die Lipidhomöostase im Leber- und Hirngewebe von transgenen Alzheimer-Modellmäusen (5xFAD). ESI: Elektronen-Spray-Ionisation; MS: Massenspektrometrie; SRM: *single reaction monitoring*. Abbildung verändert nach (LAUER et al., 2021b).

Zusammenfassend konnte unter den in dieser Arbeit verwendeten experimentellen Bedingungen, im Einklang mit der Literatur, eine Acitretin-vermittelte Zunahme der TAG in der Leber, begleitet von erhöhten PCaa-, PCae-, und Acyl-Carnitin-Spiegeln beobachtet werden, während die SM-Spezies reduziert waren. Neben den Veränderungen der Lipidhomöostase in der Leber wurde auch der Lipidmetabolismus im Gehirn in Abhängigkeit von Acitretin analysiert. Im Hirngewebe waren die in der Leber beobachteten Effekte ähnlich beziehungsweise teilweise verstärkt oder aber auch umgekehrt. Während für SM und PCae ähnliche Veränderungen detektiert wurden, zeigten PCaa, TAG und Acyl-Carnitine zum Teil signifikant inverse Effekte im Vergleich zu den Leberproben. In den folgenden Abschnitten soll detailliert auf die detektierten Acitretin-vermittelten Veränderungen der einzelnen Lipidspezies eingegangen werden.

4.2.1 Analyse der Triacylglyceride im Leber- und Hirngewebe von Acitretin-behandelten transgenen Alzheimer-Mäusen

In der massenspektrometrischen Analyse wurde deutlich, dass in den Leberproben der mit Acitretin behandelten Mäuse im Vergleich zu unbehandelten Mäusen 36 der 39 analysierten TAG-Spezies erhöht waren (Abbildung 28 A). Auch wenn keine einzelnen TAG-Spezies signifikant erhöht waren, so sollte der Effekt in der Verteilung dieser Lipide mit chemischen Ähnlichkeiten, welcher sich in einer signifikanten Zunahme der mittleren Effektstärke ($114,6 \pm 2,9 \%$; $p \leq 0,001$) äußert, in der Gruppenanalyse Beachtung finden und nicht durch Fokussierung auf signifikante Parameter verloren gehen. Die Ergebnisse dieses *Lipidomics*-Ansatzes wurden mit einer zweiten Methode, der Ölrot-O-Färbung, verifiziert. In Übereinstimmung mit der Acitretin-bedingten Zunahme an TAG resultierte die Ölrot-O-Färbung von Leberschnitten Acitretin-behandelter Mäuse in einer verstärkten Färbung von Lipidtropfen, dem intrazellulären Speicherort von TAG (Abbildung 28 H). Nach Normalisierung der einzelnen TAG-Spezies auf den durchschnittlichen TAG-Lipidklasseneffekt, um mildernde oder verstärkende Einflüsse der gebundenen Fettsäuren abschätzen zu können, wurde deutlich, dass es sich bei den durch Acitretin-Behandlung reduzierten TAG-Spezies im Lebergewebe um Spezies handelt, die mehrfach-ungesättigte Fettsäuren (*polyunsaturated fatty acids*, PUFA) enthalten (Abbildung 28 C).

Im Hirngewebe von 5xFAD-Mäusen bedingte die Behandlung mit Acitretin eine Reduzierung von 28 der 39 analysierten TAG-Spezies (Abbildung 28 B), was sich in einer signifikant verringerten mittleren Effektstärke ($89,2 \pm 2,0 \%$; $p \leq 0,001$) äußerte, die im Gegensatz zu den in den Leberproben beobachteten Veränderungen steht (Abbildung 28 F). Auch die nähere Betrachtung der in den beiden Geweben reduzierten oder erhöhten TAG-Spezies zeigte, dass die Schnittmenge der in Leber und Hirn gleichermaßen veränderten Neutrallipidspezies gering ist (Abbildung 28 G). Einhergehend mit den Veränderungen im Lebergewebe wurde auch in den Hirnproben der Acitretin-behandelten Mäuse eine Reduzierung der PUFA-enhaltenden TAG detektiert (Abbildung 28 D). Daher ist von einem Acitretin-bedingten Mangel an Docosahexaensäure (*docosahexaenoic acid*, DHA; C22:6) und Eicosapentaensäure (*eicosapentaenoic acid*, EPA; C20:5) auszugehen und die Supplementierung dieser beiden Fettsäuren für Patienten, die mit Acitretin behandelt werden, zu empfehlen. Die sowohl für DHA als auch für EPA vermutete wichtige Rolle in der Alzheimerpathologie wurde bereits einleitend beschrieben und wird auch in der Diskussion (Kapitel 5.2) wieder aufgegriffen werden.

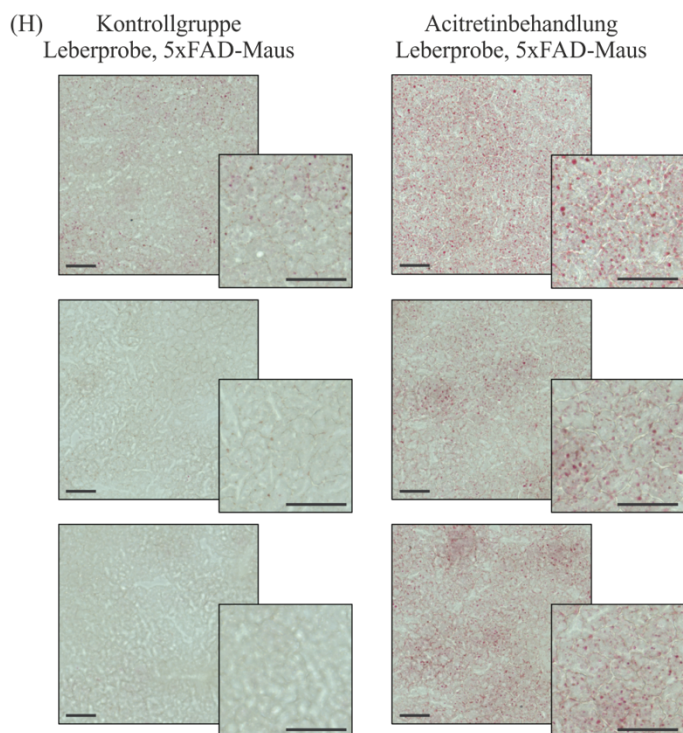
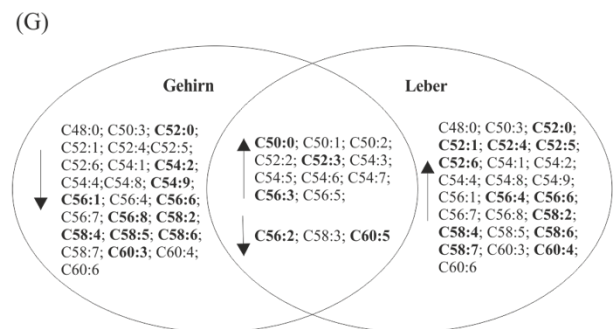
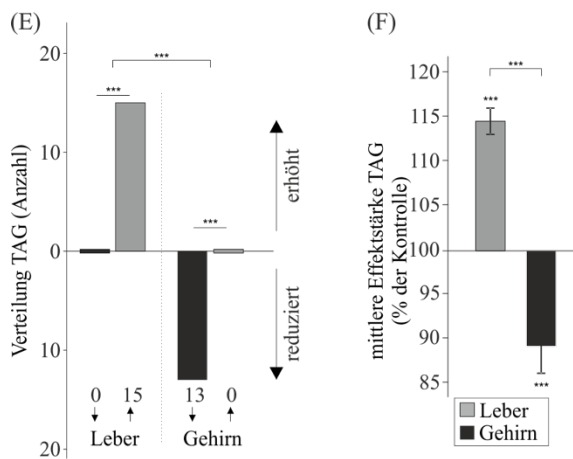
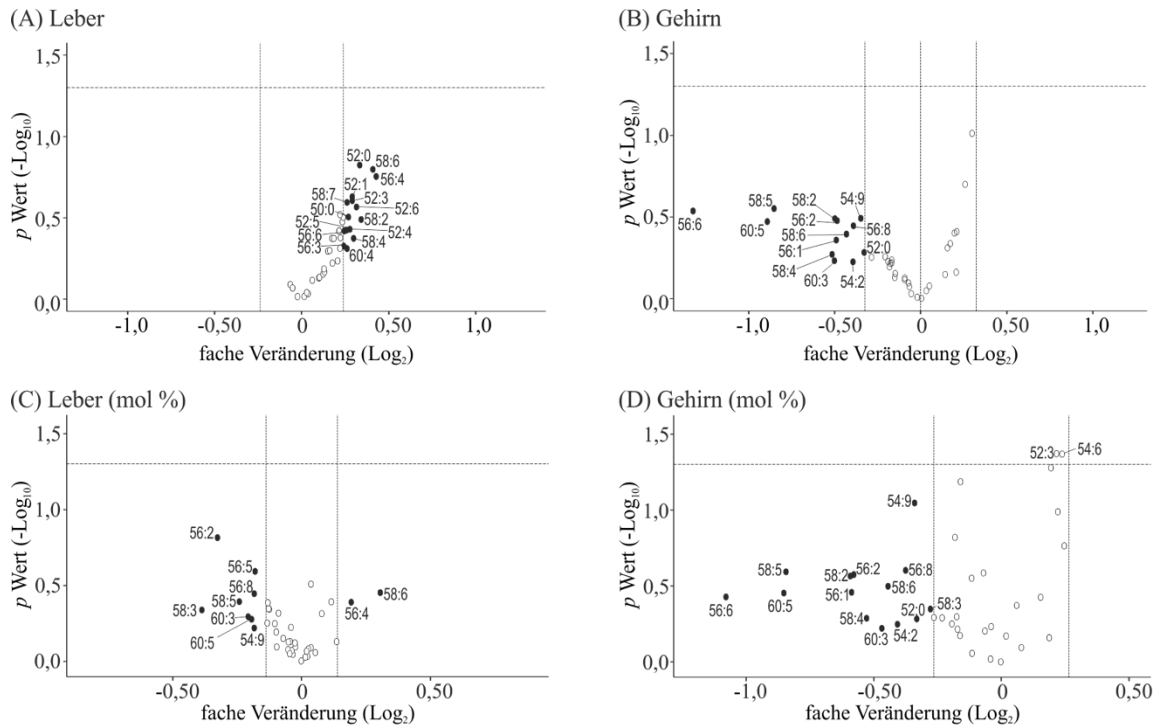


Abbildung 28: Acitretin-vermittelte Änderungen der TAG-Spiegel in Leber- und Hirngewebe von 5xFAD-Mäusen. Die relativen Veränderungen einzelner TAG-Spezies in murinem Leber- und Hirngewebe nach Behandlung mit Acitretin sind in den oberen Volcano Plots (**A**: Leber, **B**: Gehirn) dargestellt. Die unteren Volcano Plots repräsentieren die Effekte einzelner Lipidspezies unabhängig des Lipidklasseneffektes (**C**: Leber, **D**: Gehirn). Der detaillierte Aufbau der Volcano Plots ist 3.2.5.3 zu entnehmen. (**E**) Verteilung der TAG-Spezies dargestellt als Anzahl der erhöhten oder reduzierten Lipide in Leber- und Hirngewebe in einem Säulendiagramm. Die statistische Signifikanz der beobachteten Verschiebungen hin zu reduzierten oder gesteigerten Spezies im Leber- oder Hirngewebe wurde mittels Binomialtest berechnet, während für die Analyse signifikanter Unterschiede in der TAG-Verteilung zwischen Leber- und Hirngewebe der Exakte Fisher Test verwendet wurde. (**F**) Mittlere Effektstärke der analysierten TAG in Leber- und Hirngewebe nach Behandlung mit Acitretin ($n = 5$). Die Berechnung der statistischen Signifikanz der mittleren Effektstärke in Leber- und Hirngewebe im Vergleich zu Kontrolltieren wurde mittels Einstichproben-t-Test ausgeführt, während die Unterschiede der mittleren Effektstärken zwischen den beiden analysierten Geweben mit Hilfe des Student-t-Test beurteilt wurden. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Sterne stellen die statistische Signifikanz dar, wobei $***p \leq 0,001$ gilt. (**G**) Das Venn-Diagramm zeigt sowohl exklusiv veränderte als auch überlappende TAG-Spezies in Leber- und Hirngewebe. Spezies mit einer Effektstärke größer des durchschnittlichen SEM sind hervorgehoben. (**H**) Ölrot O-Färbung von Lipidtropfen im Lebergewebe von Kontroll-behandelten (links) und Acitretin-behandelten (rechts) Mäusen. Es sind repräsentative $1 \mu\text{m}$ -Z-Schnitte sechs unabhängiger Proben von sechs Tieren ($n=3$ Kontroll- und $n=3$ Acitretin-behandelte Mäuse) dargestellt, Maßstab = $50 \mu\text{m}$. Die Behandlung der Mäuse mit Acitretin erfolgte durch Malena dos Santos Guilherme und Vu Thu Thuy Nguyen. Die Färbung der Lipidtropfen wurde von Prof. Bianca Schrul und Sen Qiao durchgeführt. Die massenspektrometrische Lipidanalytik sowie Auswertung erfolgten in Kooperation mit Daniel Janitschke und Cornel M. Bachmann. Abbildung verändert nach (LAUER et al., 2021b).

4.2.2 Acitretin-induzierte Veränderungen der Phospholipide im Leber- und Hirngewebe von transgenen Alzheimer-Mäusen

Auf Grund dessen, dass die TAG-Spiegel mit der Bildung von Lipidtropfen, welche von einer Phospholipid-Monoschicht umgeben sind, korrelieren und dass die Synthese von Phosphatidylcholin mit der Expansion von Lipidtropfen in Zusammenhang steht (KRAHMER et al., 2011; WILFLING et al., 2013), könnte angenommen werden, dass die Acitretin-bedingten Veränderungen in den TAG-Spezies auch einen Einfluss auf die Gesamt-PCaa-Menge haben. Übereinstimmend mit der Literatur wurde unter den in dieser Studie angewandten experimentellen Bedingungen eine Erhöhung von 40 der 43 analysierten PCaa-Spezies in Acitretin-behandelten Leberproben detektiert. Die mittlere Effektstärke war dabei signifikant auf $133,9 \pm 4,9 \%$ ($p \leq 0,001$) gesteigert. Zudem zeigte sich eine Erhöhung dreier PCaa-Spezies, welche die ω -6 PUFA-Arachidonsäure (C20:4) enthalten, was hinsichtlich Acitretin-induzierter inflammatorischer Prozesse eine Rolle spielen könnte (Abbildung 29).

Ähnlich zu den im Hirngewebe beobachteten kontroversen Effekten auf TAG im Vergleich zum Lebergewebe, zeigten alle 43 im Gehirn von Acitretin-behandelten 5xFAD-Mäusen analysierten PCaa-Spezies eine reduzierte Tendenz und die mittlere Effektstärke war signifikant auf $76,4 \pm 1,6 \%$ ($p \leq 0,001$) verringert (Abbildung 29). Zusammenfassend wurde deutlich, dass im Lebergewebe sowohl die TAG- als auch die PCaa-Spiegel auf Grund der Behandlung mit Acitretin erhöht waren, während im Hirngewebe die Spiegel an TAG und PCaa Acitretin-bedingt reduziert waren.

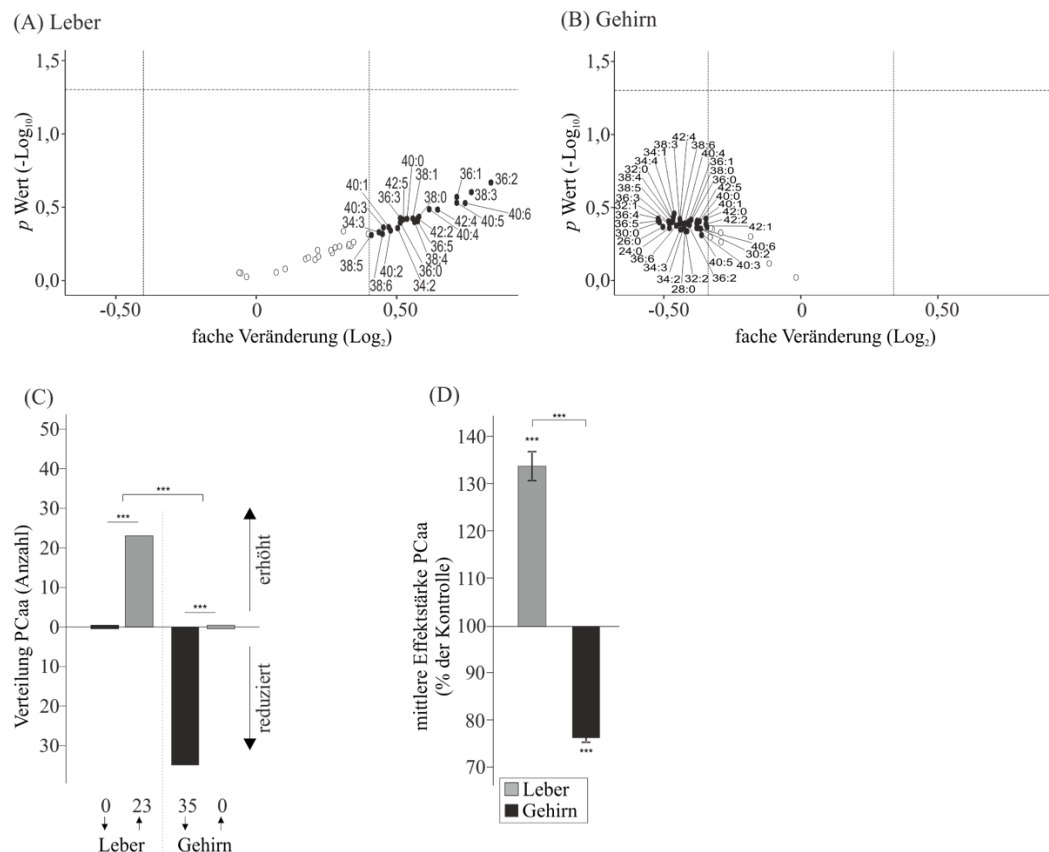


Abbildung 29: Veränderte Phosphatidylcholin-(PCaa-) Spiegel in murinem 5xFAD-Leber- und Hirngewebe nach Behandlung mit Acitretin. Die relativen Veränderungen einzelner PCaa-Spezies in murinem Leber- und Hirngewebe nach Behandlung mit Acitretin sind in den Volcano Plots (A: Leber, B: Gehirn) dargestellt. Der detaillierte Aufbau der Volcano Plots ist 3.2.5.3 zu entnehmen. (C) Verteilung der PCaa-Spezies dargestellt als Anzahl der erhöhten oder reduzierten Lipide in Leber- und Hirngewebe in einem Säulendiagramm. Die statistische Signifikanz der beobachteten Verschiebungen hin zu reduzierten oder gesteigerten Spezies im Leber- oder Hirngewebe wurde mittels Binomialtest berechnet, während für die Analyse signifikanter Unterschiede in der PCaa-Verteilung zwischen Leber- und Hirngewebe der Exakte Fisher Test verwendet wurde. (D) Mittlere Effektstärke der analysierten PCaa in Leber- und Hirngewebe nach Behandlung mit Acitretin (n = 5). Die Berechnung der statistischen Signifikanz der mittleren Effektstärke in Leber- und Hirngewebe im Vergleich zu Kontrolltieren wurde mittels Einstichproben-t-Test ausgeführt, während die Unterschiede der mittleren Effektstärken zwischen den beiden analysierten Geweben mit Hilfe des Student-t-Test beurteilt wurden. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Sterne stellen die statistische Signifikanz dar, wobei $***p \leq 0,001$ gilt. Die Behandlung der Mäuse mit Acitretin erfolgte durch Malena dos Santos Guilherme und Vu Thu Thuy Nguyen. Die massenspektrometrische Lipidanalytik sowie Auswertung erfolgten in Kooperation mit Daniel Janitschke und Cornel M. Bachmann. Abbildung verändert nach (LAUER et al., 2021b).

Neben den PCaa-Spezies konnte auch für die PC-Plasmalogene eine Acitretin-bedingte signifikante Verschiebung hin zu erhöhten Spezies im Lebergewebe beobachtet werden. 30 der 39 in die Analyse inkludierten PCae-Spezies zeigten eine Erhöhung, was in einer signifikanten Zunahme der mittleren Effektstärke nach Acitretinbehandlung resultierte ($105,2 \pm 1,3$ % mit $p \leq 0,001$; Abbildung 30 D).

Dieser Acitretin-induzierte Trend in den Plasmalogen-Spiegeln könnte einen positiven Aspekt in der potenziellen therapeutischen Anwendung dieses Retinoids im Zusammenhang mit der Alzheimererkrankung andeuten und als Ansatzpunkt für weitere Studien dienen, da in Alzheimerpatienten reduzierte Konzentrationen an Plasmalogenen berichtet wurden (SENANAYAKE, GOODENOWE, 2019). Bezüglich der PC-Plasmalogene resultierten aus der Analyse des Hirngewebes Acitretin-behandelter Tiere signifikant erhöhte Gesamt-PCae-Spiegel ($110,9 \pm 0,8 \%$ mit $p \leq 0,001$), wobei hier die mittlere Effektstärke im Vergleich zu derjenigen im Lebergewebe signifikant stärker ausgeprägt war ($p \leq 0,001$; Abbildung 30 D). Interessanterweise waren die PC-Plasmalogen-Spiegel nach Behandlung mit Acitretin im Hirngewebe signifikant erhöht, was der Acitretin-bedingten signifikanten Reduzierung der PCaa-Spezies im Hirngewebe gegenübersteht.

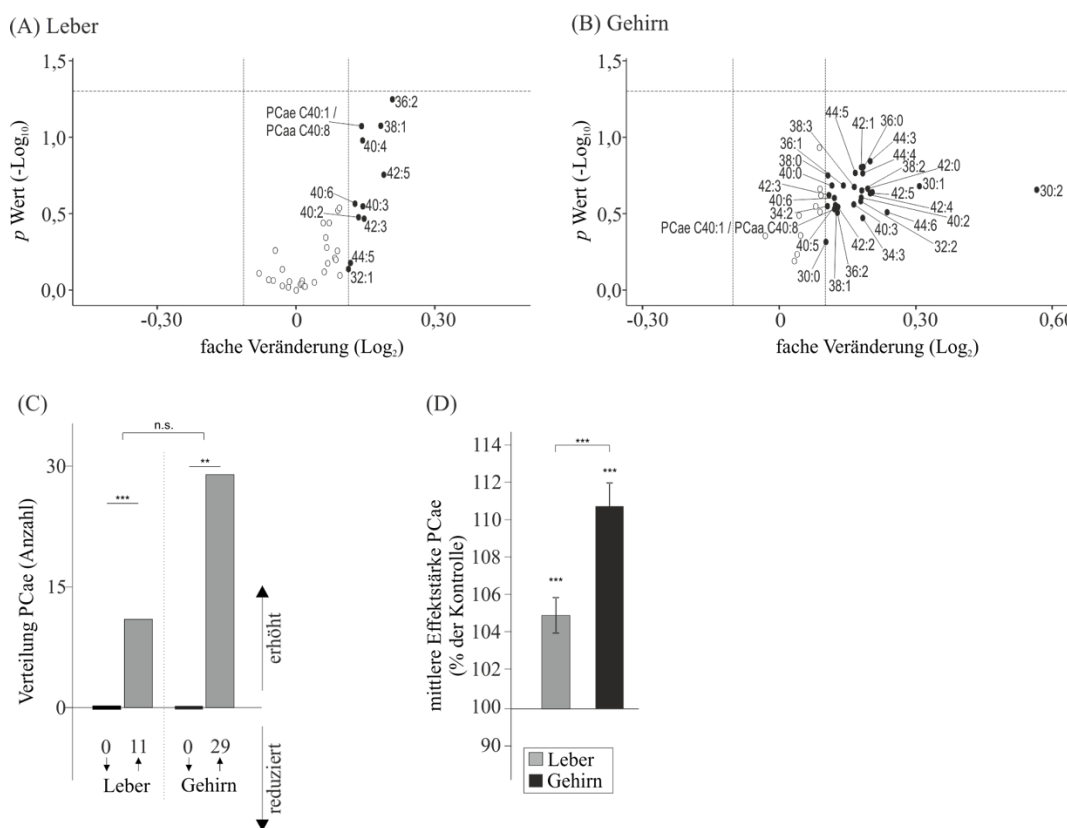


Abbildung 30: Veränderte Phosphatidylcholin-Plasmalogen-(PCae-) Spiegel in murinem 5xFAD-Leber- und Hirngewebe nach Behandlung mit Acitretin. Die relativen Veränderungen einzelner PCae-Spezies in murinem Leber- und Hirngewebe nach Behandlung mit Acitretin sind in den Volcano Plots (A: Leber, B: Gehirn) dargestellt. Der detaillierte Aufbau der Volcano Plots ist 3.2.5.3 zu entnehmen. (C) Verteilung der PCae-Spezies dargestellt als Anzahl der erhöhten oder reduzierten Lipide in Leber- und Hirngewebe in einem Säulendiagramm. Die statistische Signifikanz der beobachteten Verschiebungen hin zu reduzierten oder gesteigerten Spezies im Leber- oder Hirngewebe wurde mittels Binomialtest berechnet, während für die Analyse signifikanter Unterschiede in der PCae-Verteilung zwischen Leber- und Hirngewebe der Exakte Fisher Test verwendet wurde. (D) Mittlere Effektstärke der analysierten PCae in Leber- und Hirngewebe nach Behandlung mit Acitretin ($n = 5$). Die Berechnung der statistischen Signifikanz der mittleren Effektstärke in Leber- und Hirngewebe im Vergleich zu Kontrolltieren wurde mittels Einstichproben-t-Test ausgeführt, während die Unterschiede der mittleren Effektstärken zwischen den beiden analysierten Geweben mit Hilfe des Student-t-Test beurteilt wurden. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Sterne stellen die statistische Signifikanz dar, wobei $**p \leq 0,01$ und $***p \leq 0,001$ gelten (n.s.: nicht signifikant). Kooperationen sind Abbildung 29 zu entnehmen. Abbildung verändert nach (LAUER et al., 2021b).

Während die TAG-, PCaa- und Plasmalogen-Spiegel in Leberproben Acitretin-behandelter 5xFAD-Mäuse im Vergleich zu unbehandelten Tieren erhöht waren, resultierte die Retinoidbehandlung in Bezug auf die SM-Spezies in einer signifikanten Reduzierung der mittleren Effektstärke auf $93,2 \pm 1,5 \%$ ($p \leq 0,001$) (Abbildung 31 D). Im Hinblick auf die Alzheimererkrankung ist dieser SM-reduzierende Effekt als kritisch einzustufen, da berichtet wurde, dass SMasen (SM katabolisierende Enzyme) im Gehirn von Alzheimerpatienten erhöht sind (HE et al., 2010). Zudem konnte auf molekularer Ebene ein Vorwärtsregelkreislauf zwischen Sphingolipiden und der APP-Prozessierung beschrieben werden: Sphingomyelin ist in der Lage die Aktivität der γ -Sekretase zu inhibieren, was in reduzierten A β -Spiegeln resultiert. Auf Grund dessen, dass A β die SMase-Aktivität erhöht, bedingt der SM-bedingte verringerte A β -Spiegel gesteigerte Sphingomyelin Spiegel (ZINSER et al., 2007). Die mit den Effekten im Lebergewebe einheitliche Acitretin-induzierte Reduzierung der mittleren SM-Effektstärke war im Hirngewebe stärker ausgeprägt ($84,5 \pm 1,4 \%$ mit $p \leq 0,001$), wobei 14 der 15 analysierten SM-Spezies in beiden Geweben übereinstimmend reduziert vorlagen, was anhand des Venn-Diagramms deutlich wird (Abbildung 31 E).

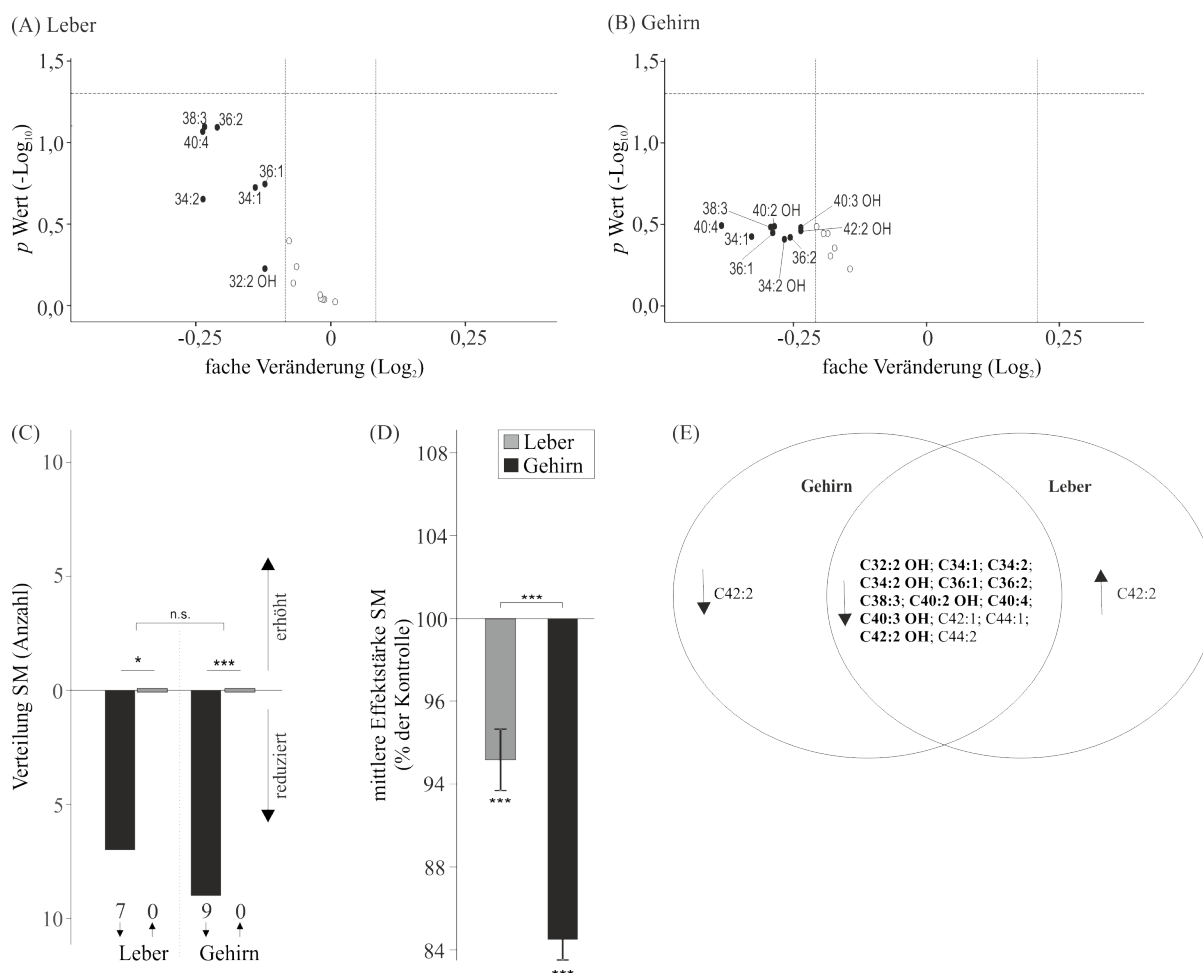


Abbildung 31: Veränderte Sphingomyelin-(SM-) Spiegel in murinem 5xFAD-Leber- und Hirngewebe nach Behandlung mit Acitretin. Die relativen Veränderungen einzelner SM-Spezies in murinem Leber- und Hirngewebe nach Behandlung mit Acitretin sind in den Volcano Plots (A: Leber, B: Gehirn) dargestellt. Der detaillierte Aufbau der Volcano Plots ist 3.2.5.3 zu entnehmen. (C) Verteilung der SM-Spezies dargestellt als Anzahl der erhöhten oder reduzierten Lipide in Leber- und Hirngewebe in einem Säulendiagramm. Die statistische Signifikanz der beobachteten Verschiebungen hin zu reduzierten oder gesteigerten Spezies im Leber-

oder Hirngewebe wurde mittels Binomialtest berechnet, während für die Analyse signifikanter Unterschiede in der SM-Verteilung zwischen Leber- und Hirngewebe der Exakte Fisher Test verwendet wurde. (D) Mittlere Effektstärke der analysierten SM in Leber- und Hirngewebe nach Behandlung mit Acitretin ($n = 5$). Die Berechnung der statistischen Signifikanz der mittleren Effektstärke in Leber- und Hirngewebe im Vergleich zu Kontrolltieren wurde mittels Einstichproben-t-Test ausgeführt, während die Unterschiede der mittleren Effektstärken zwischen den beiden analysierten Geweben mit Hilfe des Student-t-Test beurteilt wurden. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Sterne stellen die statistische Signifikanz dar, wobei $**p \leq 0,01$ und $***p \leq 0,001$ gelten (n.s.: nicht signifikant). (E) Das Venn-Diagramm zeigt sowohl exklusiv veränderte als auch überlappende SM-Spezies in Leber- und Hirngewebe. Spezies mit einer Effektstärke größer des durchschnittlichen SEM sind hervorgehoben. Kooperationen sind Abbildung 29 zu entnehmen. Abbildung verändert nach (LAUER et al., 2021b).

4.2.3 Gehalt an (Acyl- / Acetyl-) Carnitinen in Anwesenheit von Acitretin im Leber- und Hirngewebe von transgenen Alzheimer-Mäusen

Durch das Detektieren von Acitretin-bedingten Veränderungen in den TAG-Spiegeln sowohl im Leber- als auch im Hirngewebe von 5xFAD-Mäusen konnte bereits ein potenzieller Einfluss dieses Retinoids auf den zellulären Energiemetabolismus vermutet werden. Um diesen potenziellen Zusammenhang detaillierter beurteilen zu können, wurden die Mengen an Carnitin (C0), Acetyl-Carnitin (C2) und Acyl-Carnitinen (CX mit $X > 3$) in Leber- und Hirnproben Acitretin-behandelter 5xFAD-Mäuse analysiert. Unter Acyl-Carnitinen wurden alle Carnitine CX mit $X > 3$ zusammengefasst, da es sich bei C3 um das Pendant zu C2 handelt, welches bei der β -Oxidation ungeradzahligter Fettsäuren als Produkt entsteht. In beiden Geweben wurden die Mengen an C0-Carnitin sowie Acetyl-Carnitin (C2) durch Acitretin nicht signifikant verändert (Leber, C0: $99,3 \pm 22,2$ % ($p = 0,984$) und C2: $125,2 \pm 27,2$ % ($p = 0,396$); Hirn, C0: $99,1 \pm 3,8$ % ($p = 0,832$) und C2: $100,9 \pm 4,8$ % ($p = 0,905$)). Die mittlere Effektstärke der Acyl-Carnitine (CX mit $X > 3$) verhielt sich Acitretin-vermittelt sowohl in den Leber- als auch den Hirngeweben ähnlich zu den Effektstärken, die zuvor für die Lipidklassen TAG und PCaa quantifiziert wurden. In der Leber resultierte die Acitretinbehandlung in einer signifikanten Zunahme der mittleren Acyl-Carnitin-Effektstärke auf $117,2 \pm 4,0$ % ($p \leq 0,001$), während sie im Hirn eine signifikante Abnahme der mittleren Effektstärke auf $91,0 \pm 0,8$ % ($p \leq 0,001$) bedingte (Abbildung 32).

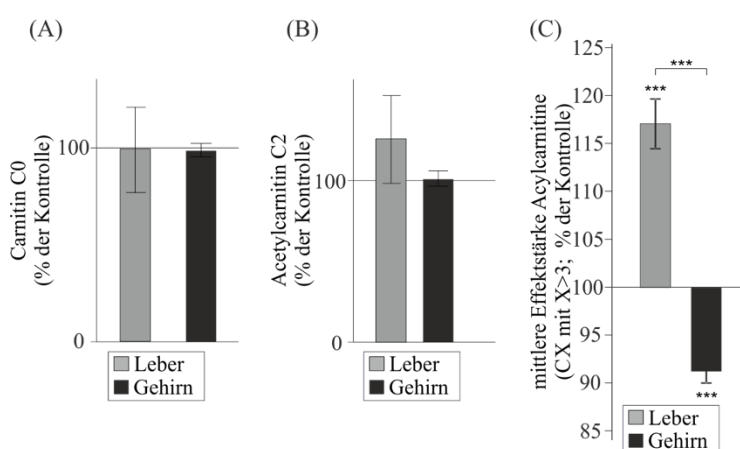


Abbildung 32: Der Einfluss des Retinoids Acitretin auf den Carnitingehalt. Die relativen Veränderungen der Carnitin-Spezies C0 (Carnitin) und C2 (Acetylcarnitin) in murinem Leber- und Hirngewebe nach Behandlung mit Acitretin sind in den Säulendiagrammen (A: Leber, B: Gehirn) dargestellt. (C) Dargestellt ist die mittlere Effektstärke der Acylcarnitine (CX mit $X > 3$) in murinem Leber- und Hirngewebe nach Behandlung mit Acitretin ($n = 5$). Die Berechnung der statistischen Signifikanz der mittleren Effektstärke in Leber- und Hirngewebe im Vergleich zu

Kontrolltieren wurde mittels Einstichproben-t-Test ausgeführt, während die Unterschiede der mittleren Effektstärken zwischen den beiden analysierten Geweben mit Hilfe des Student-t-Test beurteilt wurden. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Sterne stellen die statistische Signifikanz dar, wobei $***p \leq 0,001$ gilt. Kooperationen sind Abbildung 29 zu entnehmen. Abbildung verändert nach (LAUER et al., 2021b).

4.3 Der Einfluss gesättigter mittelkettiger Fettsäuren auf die IDE-vermittelte A β -Degradation

Anhand der bereits vorgestellten Ergebnisse wurde auf Zellkultur- und muriner Ebene deutlich, dass additive Substanzen in der Lage sind, den Metabolismus Alzheimer-assoziiertes Lipide zu beeinflussen. Im Zusammenhang mit einem Vitamin D-Mangel wurde beispielsweise beobachtet, dass die Spiegel an gesättigten Fettsäuren (SFA), die innerhalb von Phosphatidylcholin-Spezies gebunden vorlagen, signifikant erhöht waren. Damit einhergehend waren innerhalb der analysierten Phospholipid-Spezies (PCaa, PCae und Lyso-PC) die SFA/MUFA- und SFA/PUFA-Verhältnisse auf Grund des Mangels an Calcitriol signifikant verändert (Abbildung 25). Basierend darauf bestand das Ziel der im folgenden Abschnitt vorgestellten Studie in der experimentellen Adressierung des Effektes von gesättigten Fettsäuren auf die Alzheimerpathologie. Auf Grund dessen, dass in der *Lipidomics*-Analyse neben dem Einfluss auf den Sättigungsgrad auch Effekte des Calcitriol-Mangels auf die Kettenlänge, speziell die mittelkettigen Fettsäuren (Abbildung 25), detektiert wurden, und innerhalb der gesättigten Fettsäuren eine weitere Aufteilung nur noch anhand der Kettenlänge möglich ist, fokussierte sich die Analyse auf Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 oder 24 Kohlenstoffatomen. Neben den Hypovitaminose D-bedingten Veränderungen der Lipidhomöostase wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls ein Einfluss von Vitamin D auf die A β -Degradation beobachtet (Abbildung 15). Aufbauend darauf und auf den Ergebnissen einer vorausgegangenen Studie der Experimentellen Neurologie, die bereits einen Effekt verschiedener Phospholipide auf die Aktivität von an der APP-Prozessierung beteiligten Sekretasen demonstrierten (GRIMM et al., 2013a), wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit experimentell adressiert, ob es einen Zusammenhang zwischen der Länge gesättigter Fettsäuren und der Degradation des neurotoxischen A β -Peptids gibt. Auf diese Weise sollte evaluiert werden, ob die durch einen Mangel an Vitamin D verursachten Effekte auf den Sättigungsgrad sowie die Kettenlänge der Fettsäuren eine Relevanz im Hinblick auf die Alzheimerpathologie, die potenziell über die Degradation von A β vermittelt werden könnte, besitzen.

Die Ergebnisse dieser Studie sind in *Cells* (MDPI-Verlag, *Impact Factor* dieser Fachzeitschrift Stand November 2022: 7,666) veröffentlicht:

Mett J, **Lauer AA**, Janitschke D, Griebisch LV, Theiss EL, Grimm HS, Koivisto H, Tanila H, Hartmann T, Grimm MOW. *Medium-Chain Length Fatty Acids Enhance A β Degradation by Affecting Insulin-Degrading Enzyme*. *Cells*. 2021 Oct 29;10(11):2941. doi: 10.3390/cells10112941. PMID: 34831163; PMCID: PMC8616162.

Der experimentelle Anteil der Autorin der vorliegenden Arbeit umfasste in dieser Studie die Verifizierung der mittels Western Blot verdeutlichten Einflüsse der Kettenlänge auf die IDE-abhängige A β -Degradation durch die ELISA-Methode, die Experimente zur Beurteilung der Phospholipid-Aufnahme, die Validierung des linearen Western Blot-Nachweises von synthetischem A β sowie die Propidiumiodidfärbung. Die detaillierte Beschreibung dieses experimentellen Anteils ist den jeweiligen Unterschriften der folgenden Abbildungen sowie der entsprechenden Kooperationstabelle (Tabelle 39) zu entnehmen.

Tabelle 39: Kooperationen im Rahmen der Analyse gesättigter Fettsäuren.

Abbildung	Experimenteller Anteil / Tätigkeit	ausführende Person
Abbildung 33	MS-Analyse der Phospholipidaufnahme	Anna A. Lauer
	Analyse der Zellviabilität mittels LDH-Zytotoxizitätsanalyse	Dr. Janine Mett
	Propidiumiodidfärbung	Lea V. Griebisch Dr. Janine Mett Anna A. Lauer
	Proteingehalt β -Aktin	Dr. Janine Mett
	SEAP-Aktivität	Dr. Janine Mett
Abbildung 34	Analyse der A β -Degradation mittels Western Blot	Dr. Janine Mett
	Analyse der A β -Degradation mittels Western Blot	Dr. Janine Mett
	Analyse der A β -Degradation mittels ELISA	Anna A. Lauer
	Analyse der A β -Degradation mittels Western Blot in IDE-KD-Zellen	Dr. Janine Mett
Abbildung 35	Genexpressionsanalyse <i>Ide</i>	Dr. Janine Mett
	Proteingehalt IDE	Dr. Janine Mett
	Aktivität IDE	Dr. Janine Mett
	Analyse der A β -Degradation durch rekombinantes IDE mittels ELISA	Anna A. Lauer
	Aktivität IDE in murinen Serumproben	Dr. Janine Mett
	Studiendesign, Projektbetreuung und -Koordination	Prof. Marcus Grimm

Zur Analyse potenzieller Effekte der Fettsäuren-Kohlenstoffkettenlänge auf die A β -Degradation wurden murine Neuroblastomzellen (N2a) mit Phosphatidylcholinen (PC), welche jeweils die identischen gesättigten Fettsäuren aufsteigender Länge (PC10:0/10:0, PC12:0/12:0, PC14:0/14:0, PC16:0/16:0, PC18:0/18:0, PC20:0/20:0, PC22:0/22:0 und PC24:0/24:0; siehe Kapitel 3.1.6) in der sn1- und sn2 Position enthielten, behandelt. Die zu analysierenden Phospholipide wurden dabei in drei Gruppen zusammengefasst: I) PC16:0-18:0, welche Palmitin- (16:0) und Stearinsäure (18:0), die Haupt-SFAs im menschlichen Gehirn (SASTRY, 1985), enthalten und als Kontrolle (100 %) gesetzt wurden; II) PC10:0-14:0, welche die mittelkettigen Fettsäuren Caprin- (10:0), Laurin- (12:0) und Myristinsäure (14:0) enthalten und III) PC20:0-24:0, die die sehr langkettigen Fettsäuren Arachin- (20:0), Behen- (22:0) und Lignocerinsäure (24:0) (*very long chain fatty acids*, VLCFAs) inkludieren.

Die Analyse der zellulären Phosphatidylcholin-Aufnahme ergab eine zelluläre Aufnahme der supplementierten Lipide unter den gewählten experimentellen Bedingungen, welche in Übereinstimmung mit der Literatur ist (GRIMM et al., 2013a) und in einer mindestens dreifachen Erhöhung über die endogenen Mengen resultierte (Abbildung 33 A). Eine Korrelation der Aufnahme der einzelnen PC-Spezies mit den beobachteten Effekten auf die A β -Degradation (Abbildung 34) konnte ausgeschlossen werden ($p = 0,541$).

Die Analysen der Zellviabilität mittels LDH-Analyse und Propidiumiodidfärbung detektierten keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei analysierten Gruppen gesättigter Fettsäuren (LDH-Aktivität: $p = 0,633$; Propidiumiodid-Aufnahme (- Triton): $p = 0,795$; Propidiumiodid-Aufnahme (+ Triton): $p = 0,358$). Dies weist darauf hin, dass die beobachteten Effekte nicht auf durch die unterschiedlichen Phospholipide veränderte Membranintegrität und somit Zellviabilität zurückzuführen sind.

Auch der Proteingehalt an β -Aktin sowie die konstitutive Proteinsekretion zeigten keine Veränderungen größer 5 % (Abbildung 33 B-E). Die detektierten Unterschiede verschiedener Parameter wurden relativ zu den Effekten, die durch diejenigen PC-Spezies, welche Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 16-18 Kohlenstoffatomen inkludierten, bedingt wurden, ausgewertet. Wie in Abbildung 33 F abgebildet, resultierte die Behandlung mit diesem Palmitinsäure-enthaltenden Kontrolllipid PC16:0/16:0 in keiner signifikanten Veränderung der A β -Degradation im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle Ethanol ($p = 0,552$).

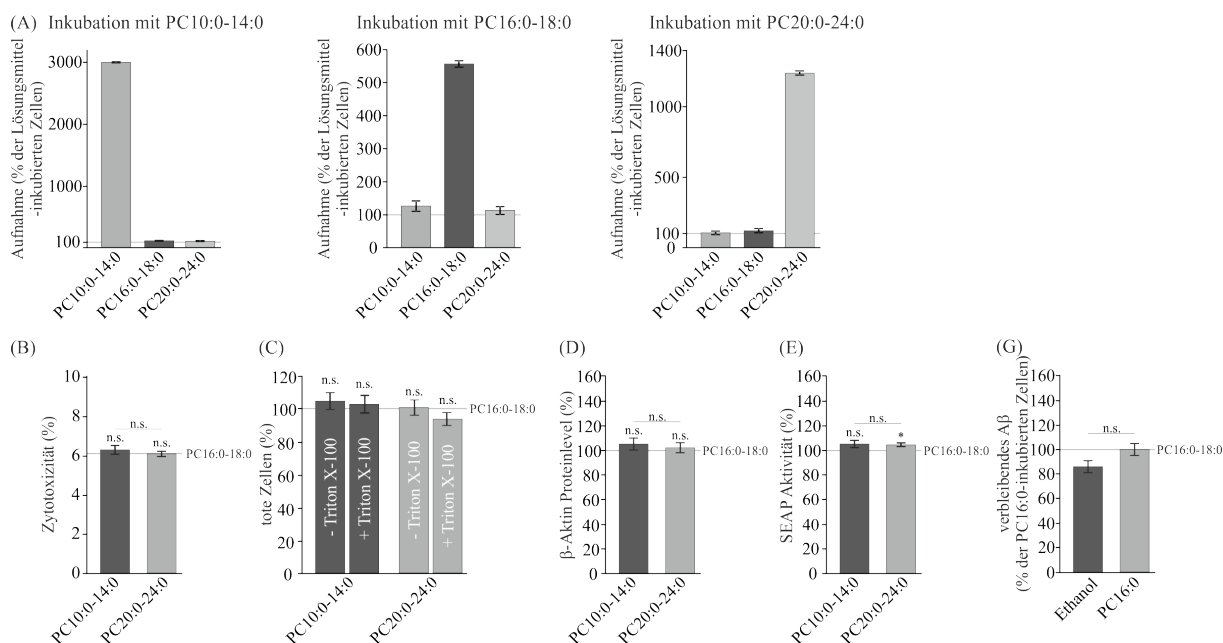


Abbildung 33: Validierung der verwendeten Inkubationsbedingungen sowie der Verwendung von PC16:0-18:0 als Kontrolllipidgruppe. (A) Phospholipidaufnahme durch N2a-Zellen. Die Säulendiagramme stellen das massenspektrometrisch analysierte Phosphatidylcholin-Profil von N2a-Zellen dar, die mit PC10:0-14:0, PC16:0-18:0 oder PC20:0-24:0 (jeweils $n = 3$) inkubiert wurden. Es wurde keine signifikante Korrelation zwischen der Aufnahme der einzelnen PC-Spezies und den beobachteten Effekten auf die A β -Degradation detektiert ($p = 0,541$). (B) Zytotoxizität nach Inkubation der analysierten Phospholipide detektiert durch LDH-Aktivität im Zellkulturmedium ($n \geq 9$) sowie durch die zelluläre Aufnahme von Propidiumiodid ($n \geq 25$; C) (- Triton X-100: tote Zellen nach PC-Behandlung; + Triton X-100: Gesamtzellzahl nach PC-Inkubation). (D) β -Aktin-Proteingehalt in N2a-Zellen nach Behandlung mit den analysierten Phospholipiden ($n \geq 6$). (E) Konstitutive Proteinsekretion abgebildet durch die Aktivität der sekretorischen alkalischen Phosphatase (SEAP) im Zellkulturüberstand von N2a-Zellen nach Inkubation der analysierten Phospholipide ($n = 9$). (G) Effekt der Lösungsmittelkontrolle Ethanol auf die A β -Degradation in murinen Neuroblastomzellen (N2a) verglichen mit dem Einfluss von PC16:0/PC16:0, welcher auf 100 % gesetzt wurde ($n \geq 6$). Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Sterne stellen die statistische Signifikanz dar, wobei $*p \leq 0,05$ gilt (n.s.: nicht signifikant). Die Analyse der Zytotoxizität, des β -Aktin-Proteingehaltes, der SEAP-Aktivität sowie der A β -Degradation erfolgten durch Dr. Janine Mett. Die Propidiumiodidfärbung wurde in Kooperation mit Dr. Janine Mett und Lea V. Griebisch durchgeführt. Abbildung verändert nach (METT et al., 2021).

4.3.1 Der Effekt der Fettsäure-Kettenlänge auf die IDE-abhängige A β -Degradation

Hinsichtlich der A β -Degradation konnten Kettenlängen-abhängige Effekte detektiert werden. Hierzu wurde die Menge an nicht-degradiertem humanem A β 40 im Zellkulturüberstand PC-behandelter N2a-Zellen bestimmt. Es wurde sich für A β 40 und gegen A β 42 entschieden, da zweiteres auf Grund zweier zusätzlicher Aminosäuren ein größeres Oligomerisierungspotenzial besitzt und A β -Oligomere die Aktivität von IDE beeinträchtigen.

Die Menge an verbliebenem A β 40 im Zellkulturüberstand von PC10:0- und PC14:0-behandelten Zellen war im Vergleich zu PC16:0-18:0-inkubierten Zellen signifikant reduziert ($p = 0,030$ und $p = 0,005$), was eine gesteigerte A β -Degradation repräsentierte. Auch in Anwesenheit von PC12:0 tendierte die Menge an verbliebenem A β 40 zu einer Verringerung, wobei der Effekt keine statistische Signifikanz erreichte ($p = 0,092$). Im Gegensatz dazu resultierte die Western Blot-Analyse des konditionierten Mediums von mit PC20:0, PC22:0 und PC24:0 inkubierten Zellen im Vergleich zu PC16:0 in einer inhibierten Degradation von A β , wobei die Menge an verbliebenem A β in Anwesenheit von PC22:0 und PC24:0 jeweils signifikant erhöht war (jeweils $p \leq 0,001$, Abbildung 34 A und B). Aus den Daten der A β -Degradationsanalyse ging eine signifikante Korrelation zwischen der Fettsäure-Kettenlänge und der Menge an verbleibendem A β hervor ($R^2 = 0,76$ mit $p = 0,005$; Abbildung 34 C).

Die Betrachtung der gruppierten Daten resultierte in einer signifikanten Reduzierung von nicht-degradiertem A β auf $66,8 \pm 3,7 \%$ ($p \leq 0,001$) in Zellen, die mit PC10:0-14:0 im Vergleich zu PC16:0-18:0 behandelt wurden. Im Gegensatz dazu bedingte die Behandlung mit den länger-kettigen Spezies PC20:0-24:0 signifikant erhöhte Mengen an verbliebenem A β ($147,7 \pm 8,1 \%$; $p \leq 0,001$), wobei sich dieser Effekt signifikant von dem, der durch Inkubation mit PC10:0-14:0 vermittelt wurde, unterscheidet ($p \leq 0,001$) (Abbildung 34 D). Diese gegensätzlichen Einflüsse auf die Degradation von A β wurden mittels einer zweiten Methode, der enzymgekoppelten Immunadsorptionsanalyse (ELISA), verifiziert (PC10:0-14:0 auf $95,3 \pm 2,6 \%$, PC20:0-24:0 auf $105,3 \pm 3,4 \%$; $p = 0,035$; Abbildung 34 E). Die vorliegenden Daten lassen vermuten, dass die A β -Degradation durch gesättigte mittelkettige Fettsäuren stimuliert wird, während sehr langkettige gesättigte Fettsäuren einen gegenteiligen Effekt zu haben scheinen.

Um weiterführend zu analysieren, ob die beobachteten Einflüsse der Fettsäure-Kettenlänge auf die A β -Degradation abhängig vom A β -degradierenden Enzym IDE sind, wurde das Experiment in stabil transfizierten N2a-IDE-Knockdown-(KD-) Zellen wiederholt. In dieser Zelllinie beeinflussten weder PC10:0-14:0 noch PC20:0-24:0 die A β -Degradation im Vergleich zu PC16:0-18:0 signifikant ($p = 0,129$ beziehungsweise $p = 0,969$). Übereinstimmend damit, dass keine der analysierten PC-Spezies die Degradation von A β im Vergleich zu PC16:0/16:0 signifikant veränderte, konnte in N2a-IDE-KD-Zellen keine signifikante Korrelation zwischen Fettsäure-Kettenlänge und der Menge an nicht-degradiertem A β detektiert werden ($R^2 = 0,17$ mit $p = 0,31$; Abbildung 34 F). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die gesättigten mittelkettigen und sehr langkettigen Fettsäuren die IDE-vermittelte A β -Degradation beeinflussen.

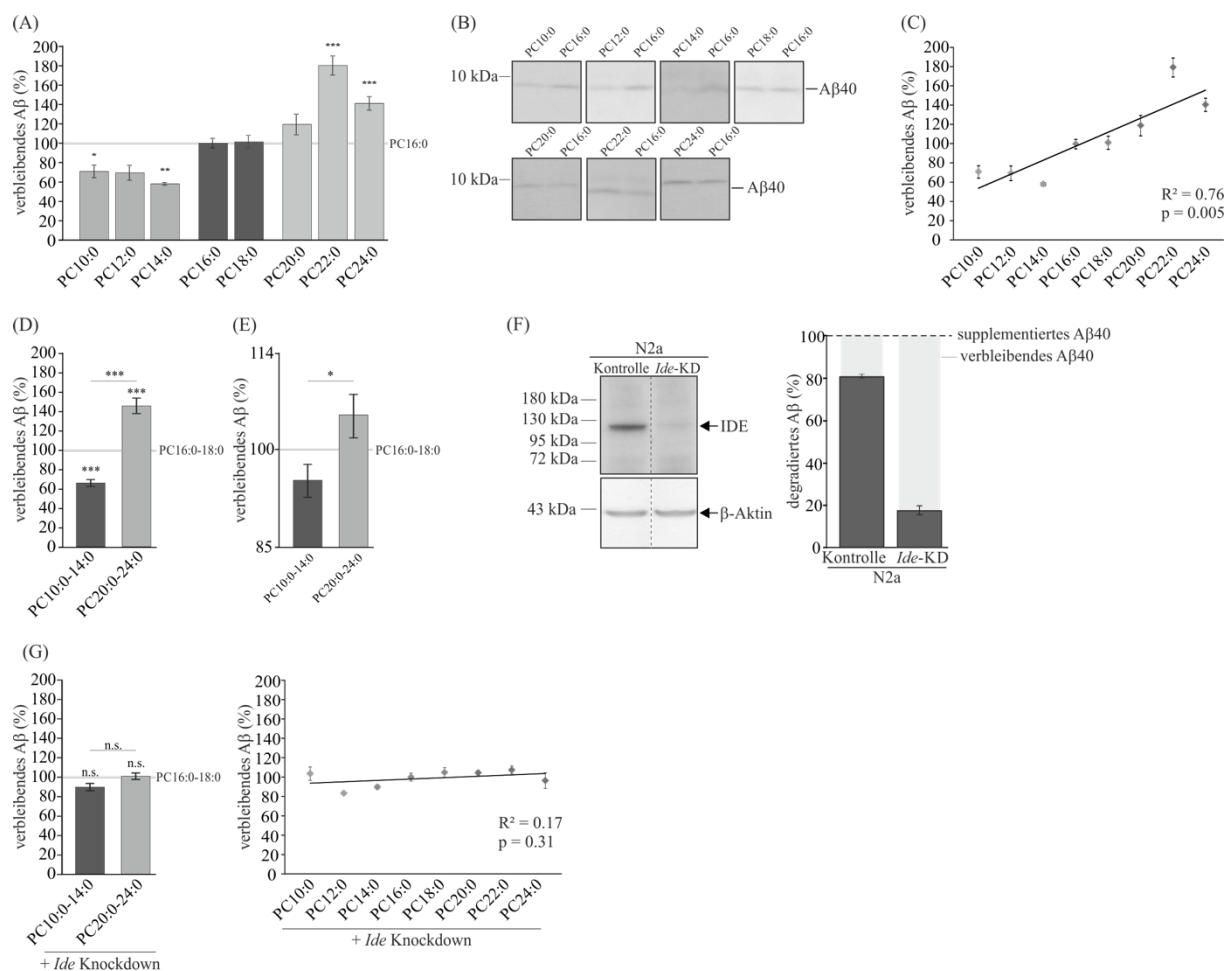


Abbildung 34: Effekt der Fettsäure-Kettenlänge auf die IDE-abhängige Degradation von Aβ. (A) Analyse der Einflüsse ansteigender Fettsäure-Kettenlänge (PC10:0/10:0, PC12:0/12:0, PC14:0/14:0, PC18:0/18:0, PC20:0/20:0, PC22:0/22:0 und PC24:0/24:0) auf die Aβ-Degradation in murinen Neuroblastomzellen (N2a) verglichen mit PC16:0/16:0, welches auf 100 % gesetzt wurde ($n \geq 3$). (B) Repräsentative immunologische Nachweise des nicht-degradierten Aβ40 nach Behandlung von N2a-Zellen mit den aufgeführten Phospholipid-Spezies. (C) Pearson-Korrelation zwischen der Fettsäure-Kettenlänge und der Menge an verbliebenem Aβ40 ($R^2 = 0,76$ und $R = 0,87$). (D) Gruppierete Analyse der Effekte der analysierten Phospholipide auf die Degradation von Aβ in N2a-Zellen mittels Western Blot ($n \geq 11$). (E) Gruppierete Analyse der Effekte der analysierten Phospholipide auf die Degradation von Aβ in N2a-Zellen mittels ELISA ($n = 9$). (F) Validierung des *Ide*-Knockdowns in murinen Neuroblastomzellen durch reduzierte IDE-Proteinspiegel in N2a-*Ide*-KD-Zellen verglichen mit N2a-Kontrollzellen. Einhergehend damit eine verringerte Aβ-Degradation, abgebildet durch erhöhte Mengen an verbliebenem Aβ in N2a-*Ide*-KD-Zellen im Vergleich zu N2a-Kontrollzellen. (G) Analyse der Effekte der Fettsäure-Kettenlänge auf die Aβ-Degradation in stabil transfizierten N2a-*Ide*-KD-Zellen mittels Western Blot ($n \geq 9$) sowie resultierende Pearson-Korrelation zwischen Fettsäure-Kettenlänge und der Menge an nicht-degradiertem Aβ ($R^2 = 0,17$ und $R = 0,31$). Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Sterne stellen die statistische Signifikanz dar, wobei $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$ und $***p \leq 0,001$ gelten (n.s.: nicht signifikant). Die Analyse der Aβ-Degradation mittels Western Blot erfolgte durch Dr. Janine Mett. Abbildung verändert nach (METT et al., 2021).

4.3.2 Der Einfluss der Fettsäure-Kettenlänge auf die Sekretion von IDE sowie dessen katalytische Aktivität

Die detaillierteren Analysen der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen konzentrierten sich zunächst auf die *Ide*-Genexpression, da MCFAs als endogene Aktivatoren des Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptors Gamma (PPAR γ) bekannt sind. PPAR γ kann an das funktionale Peroxisom-Proliferator-Antwort-Element in der Promotorregion von *IDE* binden und es wurde berichtet, dass so die Transkription von *IDE* in Primärneuronen gesteigert wurde (DU et al., 2009; LIBERATO et al., 2012).

Die durchgeführte Genexpressionsanalyse demonstrierte, dass die Transkription von *Ide* unter den in der vorliegenden Arbeit gewählten experimentellen Bedingungen nicht in Abhängigkeit der Kettenlänge beeinflusst wird. Weder die Behandlung von N2a-Zellen mit PC10:0-14:0 ($p = 0,763$) noch diejenige mit PC20:0-24:0 ($p = 0,717$) hatte Einfluss auf die *Ide*-Expression (Abbildung 35 A). Dies weist darauf hin, dass die Fettsäure-Kettenlänge-abhängigen Effekte auf die IDE-abhängige Degradation von A β nicht durch Veränderungen der *Ide*-Genexpression bedingt werden.

Auf Grund dessen, dass IDE Exosomen-vermittelt in den Extrazellularraum freigesetzt werden kann, in dem es eine Rolle im Katabolismus sezernierter A β -Peptide spielt (BULLOJ et al., 2010; VEKRELLIS et al., 2000), wurde zur weiteren Aufklärung der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der Einfluss der Fettsäure-Kettenlänge auf die zelluläre Sortierung von IDE experimentell adressiert.

Mittels Western Blot-Analyse wurde ein signifikant erhöhter Proteingehalt an extrazellulärem IDE ($138,9 \pm 7,8$ %; $p \leq 0,001$), begleitet von einem signifikant reduzierten intrazellulären IDE-Spiegel ($76,1 \pm 4,4$ %; $p = 0,040$), in N2a-Zellen, die mit PC10:0-14:0 im Vergleich zu PC16:0-18:0 behandelt wurden, detektiert. Der zelluläre Anteil an β -Aktin, welches als Kontrollprotein im Rahmen der Western Blot-Analyse herangezogen wurde, war unter diesen Bedingungen unverändert (Abbildung 33 D). Auch ein genereller Effekt der analysierten Fettsäuren auf die Proteinsekretion über den konstitutiven, nicht-regulierten sekretorischen Signalweg konnte durch nur geringe (< 5 %) Veränderungen der SEAP-Aktivität im Zellkulturüberstand ausgeschlossen werden (Abbildung 33 E). Im Gegensatz zu den Einflüssen von PC10:0-14:0 beeinflussten PC20:0-24:0 die zelluläre IDE-Sortierung nicht, da weder der Proteingehalt an extrazellulärem noch der an intrazellulärem IDE in den entsprechend inkubierten N2a-Zellen im Vergleich zu PC16:0-PC18:0 verändert war ($p = 1,000$ bzw. $p = 0,571$) (Abbildung 35 B). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die beobachtete Steigerung in der A β -Degradation nach Behandlung der Zellen mit PC10:0-14:0 auf eine erhöhte exosomale IDE-Sekretion zurückgeführt werden könnte, welche in erhöhten extrazellulären und reduzierten intrazellulären IDE-Spiegeln resultiert.

Den reduzierenden Einflüssen von PC20:0-24:0 auf die A β -Degradation scheinen hingegen andere molekularen Mechanismen zugrunde zu liegen. Daher wurden potenzielle direkte Einflüsse der Fettsäure-Kettenlänge auf die katalytische Aktivität von IDE analysiert. Hierzu wurde rekombinantes IDE *in vitro* mit den verschiedenen PC-Spezies inkubiert, bevor eine Quantifizierung der Enzymaktivität mittels spezifischem fluoreszierenden Substrat erfolgte. Die Inkubation mit gesättigten mittelkettigen Fettsäuren erhöhte die Aktivität von rekombinantem IDE direkt ($134,9 \pm 7,6$ %; $p = 0,013$), während die Behandlung mit längerkettigen Fettsäuren in einer inhibierten Enzymaktivität im Vergleich zu PC16:0-18:0 resultierte ($56,0 \pm 6,9$ %; $p = 0,002$).

Zudem lieferte der Vergleich von PC10:0-14:0- und PC20:0-24:0- bedingten Effekten ebenfalls einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,001$) (Abbildung 35 C). Auch diese Ergebnisse wurden unter Verwendung des ELISA als zweite Methode validiert, wobei das fluorogene Substrat durch synthetisches humanes A β 40 ersetzt wurde, dessen geringeres Oligomerisierungspotenzial im Vergleich zu A β 42 keine inhibierende Wirkung auf die degradierende Aktivität von IDE haben sollte. Während unter diesen experimentellen Bedingungen die Inkubation mit PC10:0-14:0 in einer leicht, jedoch nicht signifikant, verringerten Menge an nicht-degradiertem A β resultierte ($89,6 \pm 4,1 \%$; $p = 0,537$), erhöhte die Inkubation mit PC20:0-24:0 das verbliebene A β signifikant auf $133,2 \pm 8,2 \%$, wobei diese Änderung sowohl verglichen mit PC16:0-18:0 ($p = 0,011$) als auch mit PC10:0-14:0 ($p = 0,002$) das Signifikanzniveau erreichte (Abbildung 35 D). Somit schien die katalytische Aktivität von IDE durch gesättigte mittelkettige Fettsäuren direkt stimuliert zu werden, während sie durch gesättigte sehr langkettige Fettsäuren inhibiert wird.

Es lässt sich zusammenfassen, dass die gesättigten kurzkettigen Fettsäuren ihren Effekt auf die A β -Degradation potenziell über die Sortierung von IDE vermitteln, während die langkettigen gesättigten Fettsäuren einen direkten Einfluss auf die katalytische IDE-Aktivität zu haben scheinen.

Die Effekte der gesättigten mittelkettigen Fettsäuren auf die Aktivität des A β -degradierenden Enzyms IDE konnten *in vivo* anhand von APP^{sw}/PS1 Δ E9-Mäusen, die mit einer Kokosnuss-Öl-angereicherten Diät, welche große Mengen an mittelkettige Fettsäuren enthält, gefüttert wurden, validiert werden. Im Serum dieser Mäuse wurde eine auf $142,4 \pm 5,0 \%$ ($p \leq 0,001$) signifikant gesteigerte IDE-Aktivität im Vergleich zum Serum von Tieren, die eine isokalorische Kontrolldiät erhielten, detektiert (Abbildung 35 E). Diese Daten deuten an, dass die Supplementierung von gesättigten MCFA auch die Aktivität von IDE in extrazellulären Kompartimenten im *ex vivo* Modell erhöht. Zudem unterstreichen sie, dass nicht nur mehrfach ungesättigte Fettsäuren, wie beispielsweise die Docosahexaensäure (DHA), sondern auch mittelkettige gesättigte Fettsäuren, wie sie beispielsweise in Kokosnuss-Öl enthalten sind, hinsichtlich Prävention und Behandlung der Alzheimererkrankung vorteilhaft sein könnten.

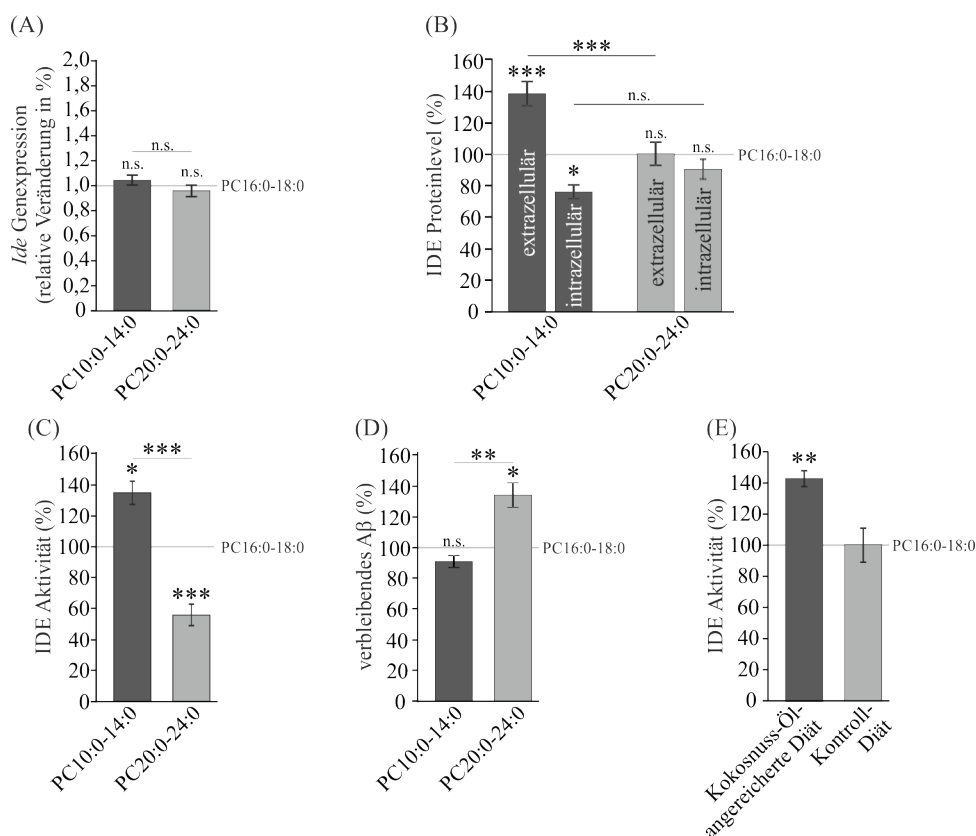


Abbildung 35: Effekte der Fettsäure-Kettenlänge auf die Sekretion von IDE und dessen katalytische Aktivität. (A) Genexpressionsanalyse der Einflüsse der Fettsäure-Kettenlänge (PC10:0-14:0 und PC20:0-24:0 wurden jeweils mit PC16:0-18:0 verglichen) auf die *Ide*-Transkription in N2a-Zellen ($n \geq 11$). (B) Analyse des Einflusses von PC10:0-14:0 und PC20:0-24:0 auf die zelluläre Sortierung von IDE in N2a-Zellen. Die extra- und intrazellulären IDE-Proteinspiegel wurden mittels Western Blot-Analyse detektiert ($n \geq 9$). (C) Analyse der direkten Effekte der Fettsäure-Kettenlänge auf die katalytische IDE-Aktivität unter Verwendung des fluorogenen Substrats MCA-RPPGFSAFK(Dnp)-OH ($n \geq 12$) (C) oder des humanen A β 40-Peptides ($n = 5$) (D). (E) Analyse des Einflusses von MCFA auf die Aktivität von IDE im Serum von APP^{swe}/PS1 Δ E9-Mäusen, die mit einer Kokosnuss-Öl-angereicherten Diät oder einer isokalorischen Kontrolldiät gefüttert wurden ($n = 7$). Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Sterne stellen die statistische Signifikanz dar, wobei * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$ gelten (n.s.: nicht signifikant). Die Analysen von IDE-Transkription, -Proteingehalt und -Aktivität erfolgte durch Dr. Janine Mett. Abbildung verändert nach (METT et al., 2021).

4.4 Analyse eines regulatorischen Rückkopplungszyklus zwischen der APP-Intrazellulären Domäne (AICD) und IDE

Im vorangegangenen Abschnitt konnte ein regulierender Einfluss von Phospholipiden, die gesättigte mittelkettige Fettsäuren inkludieren, auf das A β -degradierende Enzym IDE demonstriert werden. Dieser ist dem bereits in der Literatur beschriebenen Effekt gesättigter Fettsäuren auf die APP-prozessierenden Sekretasen (GRIMM et al., 2013a) sehr ähnlich. Dieser Einfluss auf die Sekretasen könnte die Grundlage für einen weiteren Weg sein, über den Vitamin D die IDE-vermittelte A β -Degradation beeinflussen könnte: durch die Lipidhomöostase-modulierenden Eigenschaften ist Vitamin D in der Lage, die Sekretasen, die an der APP-Prozessierung beteiligt sind, zu beeinflussen, was sich wiederum auf die Menge an AICD, welches sowohl aus der amyloidogenen als auch nicht-amyloidogenen APP-Prozessierung resultiert, auswirkt. Für die AICD ist bekannt, dass sie transkriptionsregulatorische Eigenschaften besitzt und neben der Expression der Sekretasen auch die des A β -degradierenden Enzyms Neprilysin (*NEP*) reguliert (GRIMM et al., 2015a; VON ROTZ et al., 2004). Basierend darauf wurde sich im Folgenden auf die Analyse eines potenziellen Zusammenhangs zwischen der AICD und der IDE-vermittelten A β -Degradation fokussiert.

Die Ergebnisse dieser Studie sind in *Aging Cell* (Wiley-Blackwell-Verlag, *Impact Factor* dieser Fachzeitschrift Stand November 2022: 11,005) veröffentlicht:

Lauer AA*, Mett J*, Janitschke D, Thiel A, Stahlmann CP, Bachmann CM, Ritzmann F, Schrul B, Müller UC, Stein R, Riemenschneider M, Grimm HS, Hartmann T*, Grimm MOW*. *Regulatory feedback cycle of the insulin-degrading enzyme and the amyloid precursor protein intracellular domain: Implications for Alzheimer's disease*. *Aging Cell*. 2020 Nov;19(11):e13264. doi: 10.1111/accel.13264. Epub 2020 Oct 31. PMID: 33128835; PMCID: PMC7681056. *diese Autoren haben gleichermaßen zu dieser Publikation beigetragen

Der experimentelle Anteil der Autorin der vorliegenden Arbeit umfasste in dieser Studie die Analyse der A β -Degradation in verschiedenen Zelllinien unter unterschiedlichen Bedingungen, die Analyse der IDE-Aktivität, des IDE-Proteingehaltes, der IDE-Promotoraktivität und der IDE- / Ide-, APP- sowie *PGC-1 α* -Genexpressionen. Die detaillierte Beschreibung dieses experimentellen Anteils ist den jeweiligen Unterschriften der folgenden Abbildungen sowie der entsprechenden Kooperationstabelle (Tabelle 40) zu entnehmen.

Tabelle 40: Kooperationen im Rahmen der Analyse eines potenziellen Zusammenhangs zwischen AICD und IDE.

Abbildung	Experimenteller Anteil / Tätigkeit	ausführende Person
Abbildung 37	Analyse der A β -Degradation mittels Western Blot	Dr. Janine Mett Anna A. Lauer
Abbildung 38	Analyse der A β -Degradation mittels Western Blot in Anwesenheit von Insulin und / oder Thiorphan	Daniel Janitschke Cornel M. Bachmann Anna A. Lauer
	Analyse der IDE-Aktivität	Dr. Janine Mett
Abbildung 39	Analyse des IDE-Proteingehaltes mittels Western Blot	Dr. Janine Mett Andrea Thiel Anna A. Lauer

Abbildung 40	Analyse der <i>IDE</i> -Genexpression mittels qRT-PCR	Dr. Janine Mett Dr. Christoph P. Stahlmann Anna A. Lauer
Abbildung 41	Analyse der <i>IDE</i> -Genexpression mittels qRT-PCR	Dr. Janine Mett Anna A. Lauer
	Analyse des IDE-Proteingehaltes mittels Western Blot	Dr. Janine Mett Andrea Thiel Anna A. Lauer
Abbildung 42	Analyse der IDE-Promotoraktivität	Dr. Janine Mett Anna A. Lauer
Abbildung 43	Analyse der <i>Ide</i> -Genexpression mittels qRT-PCR	Dr. Janine Mett Anna A. Lauer
	Analyse des IDE-Proteingehaltes mittels Western Blot	Dr. Felix Ritzmann Anna A. Lauer
Abbildung 44	<i>APP</i> - und <i>IDE</i> -Genexpressionsanalyse in humanen Hirnproben	Daniel Janitschke Anna A. Lauer
	Studiendesign, Projektbetreuung und -Koordination	Prof. Marcus Grimm

4.4.1 Validierung der in diesem Projekt verwendeten Zelllinien

Im Rahmen der Analyse eines potenziellen Zusammenhanges zwischen der AICD und dem A β -degradierenden Enzym IDE wurden verschiedene zelluläre Modelle unterschiedlichen Ursprungs (murin und human) verwendet. Dieses Kapitel veranschaulicht die initiale Validierung derjenigen Zelllinien, die genetisch so verändert wurden, dass sie beispielsweise AICD- oder IDE-defizient waren (Abbildung 36).

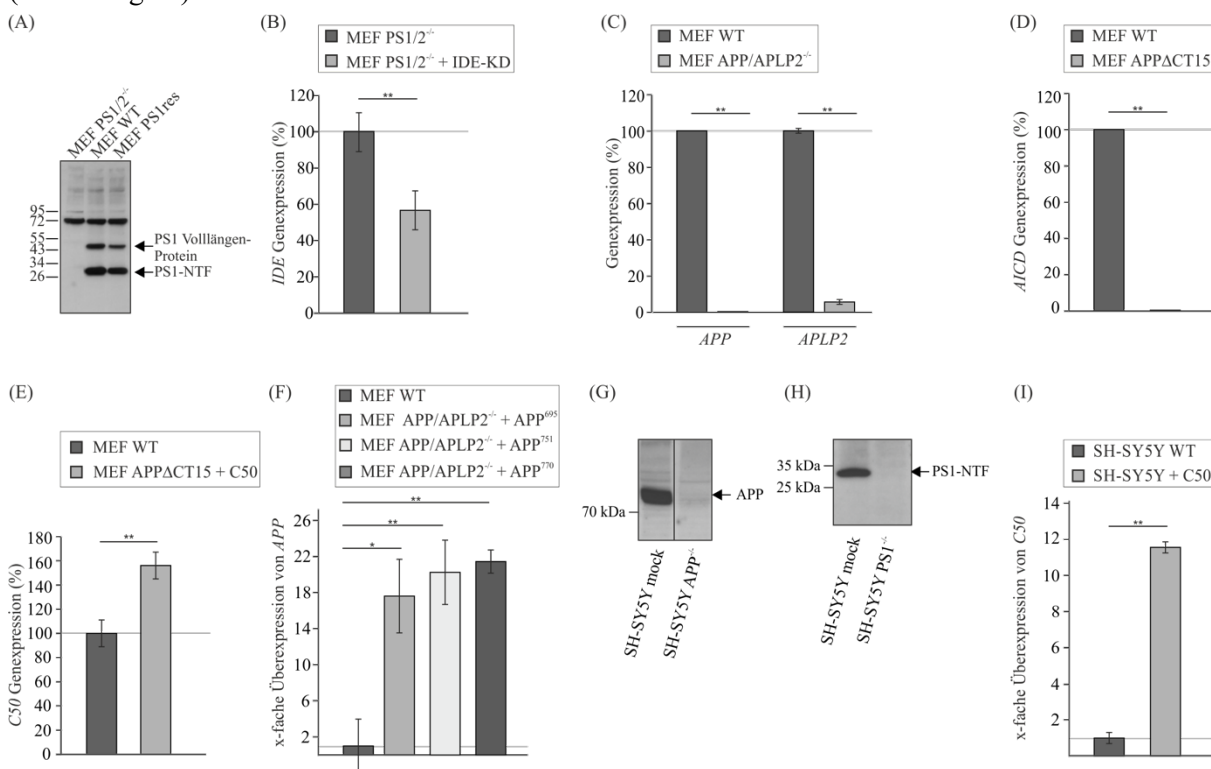


Abbildung 36: Verifizierung der zur Analyse des potenziellen Rückkopplungsmechanismus zwischen der AICD und IDE verwendeten Zelllinien. (A) Verifizierung der Presenilin 1-Retransfektion in MEF-PS1/2^{-/-}-Zellen durch Western Blot-Analyse (NTF: N-terminales Fragment). In Übereinstimmung mit der Literatur (GRIMM et al., 2005; HERREMAN et al., 2000). Abbildung verändert nach (ZINSER, 2009). (B) Reduzierte

IDE-Genexpression in MEF-PS1/2^{-/-} + IDE-KD-Zellen. (C) Reduzierte Expression von *APP* und *APLP2* in MEF-APP/APLP2^{-/-}-Zellen verglichen mit MET-WT-Zellen. In Übereinstimmung mit der Literatur (HEBER et al., 2000). (D) Reduzierte Expression der AICD in MEF-APPΔCT15-Zellen verglichen mit MEF-WT-Zellen. In Übereinstimmung mit der Literatur (RING et al., 2007). (E) Überexpression der 50 C-terminalen Aminosäuren von APP in transfizierten MEF-APPΔCT15-Zellen verglichen mit MEF-WT-Zellen. (F) x-fache Überexpression von APP⁶⁹⁵, APP⁷⁵¹ und APP⁷⁷⁰ in transfizierten MEF-APP/APLP2^{-/-}-Zellen verglichen mit MEF-WT-Zellen. Es wurden keine signifikanten Unterschiede im Expressionsniveau zwischen den APP-Isoformen detektiert. (G) Verifizierung des *APP*-Knockouts in der entsprechenden SH-SY5Y-Zelllinie mittels Western Blot-Analyse verglichen zu mock-transfizierten Zellen. Abbildung verändert nach (STAHLMANN, 2018). (H) Verifizierung des *PS1*-Knockouts in der entsprechenden SH-SY5Y-Zelllinie mittels Western Blot-Analyse verglichen zu mock-transfizierten Zellen (NTF: N-terminales Fragment). Abbildung verändert nach (STAHLMANN, 2018). (I) x-fache Überexpression von *C50* in transfizierten SH-SY5Y-Zellen verglichen mit SH-SY5Y-WT-Zellen. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Sterne stellen die statistische Signifikanz, die mittels ungepaartem Student-t-Test berechnet wurde, dar, wobei *p ≤ 0,05 und **p ≤ 0,01 gelten. Abbildung verändert nach (LAUER et al., 2020).

4.4.2 Analyse der Aβ-Degradation in PS1/2-, APP/APLP2- und AICD-defizienten embryonalen Maus-Fibroblasten

Zur Analyse des Einflusses der katalytisch aktiven Untereinheiten des γ-Sekretasekomplexes, Presenilin 1 und 2 (PS1 / PS2), auf die intrazelluläre Aβ-degradierende Aktivität, wurden embryonale Maus-Fibroblasten ohne PS1 und PS2 (MEF-PS1/2^{-/-}) sowie PS1-retransfizierte Kontrollzellen (MEF-PS1res), die zuvor validiert wurden (Kapitel 4.4.1), zur Vermeidung klonaler Heterogenität herangezogen. Die Funktionalität der PS1-Retransfektion hinsichtlich des Aβ-Katabolismus wurde durch die Beobachtung, dass keine signifikanten Unterschiede in der Aβ-Degradation zwischen wildtypischen embryonalen Maus-Fibroblasten (MEF-WT) und MEF-PS1res-Zellen detektiert wurden (p = 0,526), verifiziert (Abbildung 37 A). In den beiden verglichenen Zelllinien wird durch die Aktivität der γ-Sekretase AICD gebildet, welches über die Expression von *NEP* die Degradation von Aβ regulieren kann. Die intrazelluläre Degradation von Aβ wurde experimentell adressiert, indem synthetisches humanes Aβ für eine Stunde zu den entsprechenden Zelllysaten gegeben wurde und die nicht-degradierten, verbliebenen Peptide mittels Western Blot-Analyse quantifiziert wurden (Kapitel 3.2.3.9).

Übereinstimmend mit dem bereits in der Literatur beschriebenen transkriptionsregulatorischen Einfluss der AICD auf das Aβ-degradierende Enzym NEP (GRIMM et al., 2015a), war die Aβ-Degradation in MEF PS1/2^{-/-}-Zellen im Vergleich zu MEF-PS1res-Zellen signifikant reduziert, was sich in signifikant erhöhten Mengen an verbliebenem Aβ auf 120,5 ± 3,2 % (p ≤ 0,001) widerspiegelte (Abbildung 37 A). Die Effektstärke war im identischen experimentellen Setting in MEF-PS1/2^{-/-}-Zellen mit transientem *Ide*-KD im Vergleich zu MEF-PS1res-Zellen mit transientem *Ide*-KD geringer und nicht mehr signifikant ausgeprägt: 113,0 ± 9,1 % (p = 0,339) (Abbildung 37 B). Dies deutete darauf hin, dass neben NEP auch das Aβ-degradierende Enzym IDE von der Inhibierung der γ-Sekretase-Aktivität beeinflusst wird.

Basierend darauf, dass neben APP eine Vielzahl weiterer Substrate des γ-Sekretasekomplexes beschrieben wurde, wurde weiterführend experimentell adressiert, ob der Effekt der PS1/PS2-Defizienz auf die Aβ-Degradation von APP und seinen γ-Sekretase-vermittelten Prozessierungsprodukten Aβ und AICD abhängt.

Hierzu wurde die Degradation von A β in embryonalen Maus-Fibroblasten ohne Volllängen-APP und APLP2 (MEF-APP/APLP2^{-/-}) und embryonalen Maus-Fibroblasten ohne die 15 C-terminalen Aminosäuren von APP (MEF-APP Δ CT15) analysiert. Auf Grund dessen, dass die Expression des APP-Homologes APLP1 auf neuronale Zellen beschränkt ist (THINAKARAN et al., 1995), fehlt den verwendeten MEF-APP/APLP2^{-/-}-Zellen die komplette APP-Familie. Den MEF-APP Δ CT15-Zellen, die eine C-Terminal verkürzte Form von APP exprimieren, fehlt hingegen das YENPTY-Motiv, welches für die Translokation von AICD zum Zellkern essenziell ist (KIMBERLY et al., 2001). Verglichen mit MEF-WT-Zellen war die A β -Degradation in MEF-APP/APLP2^{-/-}- und MEF-APP Δ CT15-Zellen inhibiert, was anhand der signifikant erhöhten Menge an nicht-degradiertem A β auf $143,0 \pm 6,3$ % ($p \leq 0,001$; MEF APP/APLP2^{-/-}) und $151,5 \pm 8,2$ % ($p \leq 0,001$; MEF APP Δ CT15) deutlich wurde (Abbildung 37 C).

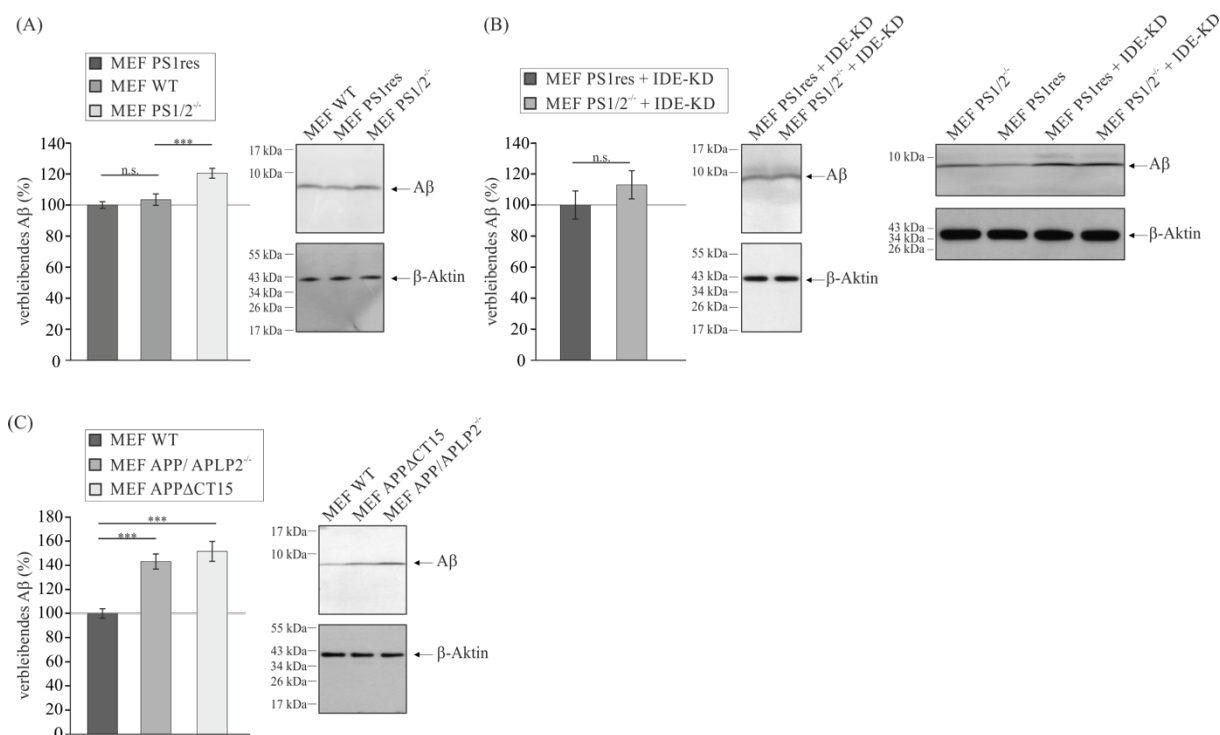


Abbildung 37: Analyse eines potenziellen Zusammenhangs zwischen γ -Sekretase-vermittelter APP-Prozessierung und der Degradation von A β . (A) Analyse der A β -Degradation in embryonalen Maus-Fibroblasten ohne PS1 und PS2 (MEF-PS1/2^{-/-}) sowie MEF-WT-Zellen im Vergleich zu MEF-PS1/2^{-/-}-Zellen, die mit PS1 retransfiziert wurden (MEF-PS1res) ($n \geq 5$). (B) Degradation von A β in MEF-PS1/2^{-/-}-Zellen mit transientem IDE-Knockdown (MEF-PS1/2^{-/-} + IDE-KD) verglichen mit MEF-PS1res-Zellen mit transientem IDE-KD (MEF-PS1res + IDE-KD) ($n = 5$). (C) Analyse der A β -Degradation in MEF-Zellen ohne APP-Proteinfamilie (MEF-APP/APLP2^{-/-}) und MEF-Zellen, die eine verkürzte APP-Form ohne funktionale AICD exprimieren (MEF-APP Δ CT15) verglichen mit MEF-WT-Zellen ($n \geq 14$). Die Bestimmung der A β -Degradation erfolgte durch Zugabe von humanem, synthetischem A β 40 zu den entsprechenden Zelllysaten. Die verbliebenen A β -Peptide wurden mittels Western Blot-Analyse und immunologischem Nachweis durch den W02-Antikörper, der humanes, aber nicht murines, endogenes A β detektiert, quantifiziert. Rechts der Säulendiagramme sind repräsentative Western Blots dargestellt. Zwischen den verglichenen Zelllinien existieren keine signifikanten Unterschiede im β -Aktin-Signal (MEF-WT: 109,4 %, $p = 0,640$; MEF-PS1/2^{-/-}: 104,3 %, $p = 0,877$; MEF-PS1/2^{-/-} + IDE-KD: 103,5 %, $p = 0,441$; MEF-APP/APLP2^{-/-}: 90,4 %, $p = 0,357$; MEF-APP Δ CT15: 95,2 %, $p = 0,111$). Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Sterne stellen die statistische Signifikanz dar, wobei *** $p \leq 0,001$ gilt (n.s.: nicht signifikant). Basierend darauf, dass die Daten in allen Fällen normalverteilt waren, wurde im Falle der

Varianzhomogenität (A-B) die ANOVA als statistischer Test herangezogen, während bei Verletzung der Varianzhomogenität (C) die statistische Signifikanz mittels Welch-ANOVA beurteilt wurde. Die Analysen der A β -Degradation erfolgten in Kooperation mit Dr. Janine Mett. Abbildung verändert nach (LAUER et al., 2020).

Zusammenfassend werden die detektierten Effekte hinsichtlich der A β -Degradation in den einzelnen Zellkulturmodellen in Tabelle 41 tabellarisch aufgelistet.

Tabelle 41: Überblick über die A β -Degradation in den analysierten Zellkulturmodellen. MW: Mittelwert; SEM: mittlerer Standardfehler.

gegeneinander verglichene Zelllinien	verbleibendes A β	p Wert
MEF-PS1res (100 %) vs. MEF-WT	103,5 \pm 3,7 %	0,526
MEF-PS1res (100%) vs. MEF-PS1/2 ^{-/-}	120,5 \pm 3,2 %	\leq 0,001
MEF-PS1res + <i>Ide</i> -KD (100 %) vs. MEF-PS1/2 ^{-/-} + <i>Ide</i> -KD	113,0 \pm 9,1 %	0,339
MEF-WT (100 %) vs. MEF-APP/APLP2 ^{-/-}	143,0 \pm 6,3 %	\leq 0,001
MEF-WT (100 %) vs. MEF-APPACT15	151,5 \pm 8,2 %	\leq 0,001

Eine statistische Analyse der Effektstärken zwischen den analysierten Zelllinien auf die Degradation von A β detektierte, dass die Spiegel an verbliebenem A β in MEF-APP/APLP2^{-/-}- und MEF-APPACT15-Zellen im Vergleich zu MEF-PS1/2^{-/-}-Zellen signifikant erhöht waren, was auf eine stärker inhibierte A β -Degradation in den APP/APLP2^{-/-}- und APPACT15-Zellen hinweist (120,5 % in MEF-PS1/2^{-/-}-Zellen im Vergleich zu 143,0 % in MEF-APP/APLP2^{-/-}-Zellen mit $p = 0,003$ sowie im Vergleich zu 151,5 % in MEF-APPACT15-Zellen mit $p = 0,003$). Dies könnte darin begründet sein, dass die Inhibierung der γ -Sekretase-Aktivität in den MEF-PS1/2^{-/-}-Zellen durch das Fehlen von Presenilin 1 und Presenilin 2 als eine von vier Komponenten des γ -Sekretasekomplexes hinsichtlich der Blockierung der AICD-Generierung nicht so suffizient war wie das Defizit an Substrat (APP/APLP2^{-/-}-Zellen) oder die genomische Deletion der letzten 15 Aminosäuren von APP (APPACT15-Zellen).

Zur weiteren Validierung eines regulierenden Einflusses des Presenilin-abhängigen APP-Prozessierungsproduktes AICD auf IDE wurde die A β -Degradation in MEF-APP/APLP2^{-/-}-Zellen im Vergleich zu MEF-WT-Zellen in Anwesenheit des kompetitiven IDE-Inhibitors Insulin analysiert.

In Anwesenheit von Insulin war die Menge an nicht-degradiertem A β in MEF-APP/APLP2^{-/-}-Zellen im Vergleich zu MEF-WT-Zellen zwar noch immer signifikant erhöht (114,3 \pm 3,1 %, $p = 0,006$), jedoch war die Effektstärke nicht so ausgeprägt wie in Zellen, die nicht mit diesem IDE-Inhibitor behandelt wurden (143,0 % mit Lösungsmittelkontrolle im Vergleich zu 114,3 % mit Insulin, $p \leq 0,001$; Abbildung 38 A zu B).

Eine ähnliche Beobachtung resultierte aus der Behandlung mit dem NEP-Inhibitor Thiorphan (117,3 \pm 4,3 %, $p = 0,035$; Abbildung 38 C; 143,0 % mit Lösungsmittelkontrolle im Vergleich zu 117,3 % mit Thiorphan, $p = 0,003$). Einhergehend mit den vorherigen Erkenntnissen führte die kombinierte Anwesenheit beider Inhibitoren zur Aufhebung des AICD-vermittelten, signifikanten Effekts auf die Degradation von A β (104,5 \pm 7,7 %, $p = 0,686$; Abbildung 38 D; 143,0 % mit Lösungsmittelkontrolle im Vergleich zu 104,5 % mit beiden Inhibitoren, $p = 0,007$).

Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse vermuten, dass die aus der γ -Sekretase-vermittelten APP-Prozessierung resultierende AICD neben dem berichteten Einfluss auf NEP (GRIMM et al., 2015a) auch in die Regulierung des A β -degradierenden Enzyms IDE involviert zu sein scheint.

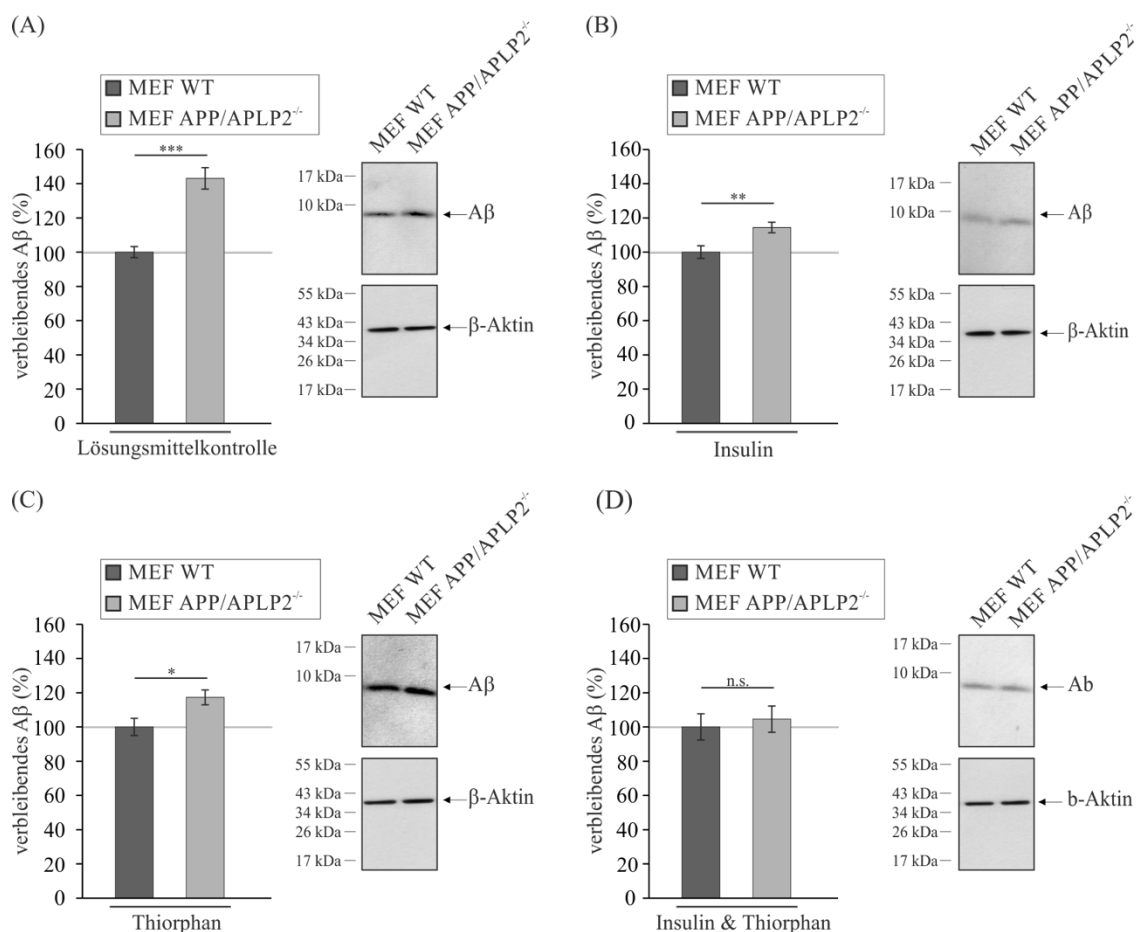


Abbildung 38: A β -Degradation in Anwesenheit des IDE-Inhibitors Insulin und / oder des NEP-Inhibitors Thiorphan in MEF-WT- und MEF-APP/APLP2^{-/-}-Zellen. Behandlung der Zellen mit der Lösungsmittelkontrolle (n = 20) (A), Insulin (n = 15) (B), Thiorphan (n = 5) (C) oder der Kombination aus Insulin und Thiorphan (n = 5) (D). Zwischen den beiden jeweils verglichenen Zelllinien existieren keine signifikanten Unterschiede im β -Aktin-Signal (MEF-APP/APLP2^{-/-} Lösungsmittelkontrolle: 90,4 %, p = 0,357; Insulin: 99,3 %, p = 0,970; Thiorphan: 102,0 %, p = 0,902; Kombination beider Inhibitoren: 93,4 %, p = 0,622). Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Sterne stellen die statistische Signifikanz dar, wobei *p \leq 0,05, **p \leq 0,01 und ***p \leq 0,001 gelten (n.s.: nicht signifikant). Basierend darauf, dass die Daten in allen Fällen normalverteilt waren, wurde im Falle der Varianzhomogenität (B-D) die ANOVA als statistischer Test herangezogen, während bei Verletzung der Varianzhomogenität (A) die statistische Signifikanz mittels Welch-ANOVA beurteilt wurde. Die Analysen der A β -Degradation erfolgten in Kooperation mit Daniel Janitschke und Cornel M. Bachmann. Abbildung verändert nach (LAUER et al., 2020).

4.4.3 Analyse der IDE-Aktivität und des IDE-Proteingehaltes in *PS1/2*-, *APP/APLP2*- und AICD-defizienten embryonalen Maus-Fibroblasten

Die vorausgehenden Ergebnisse weisen eine beeinträchtigte A β -Degradation in MEF-Zellen, denen bedingt durch ein Defizit an *PS1/2* oder *APP/APLP2* beziehungsweise der letzten 15 Aminosäuren von APP (*APP Δ CT15*) die AICD fehlt, nach. Durch den *Ide-Knockdown* sowie den Einsatz des IDE-Inhibitors Insulin wurde eine Beteiligung von IDE an diesem molekularen Mechanismus bestätigt. Um diese Beteiligung von IDE zu verifizieren, wurde die katalytische IDE-Aktivität in unterschiedlichen Zellmodellen experimentell adressiert. Die Analyse der enzymatischen IDE-Aktivität in MEF *PS1/2*^{-/-}-, MEF-*APP/APLP2*^{-/-}- und MEF-*APP Δ CT15*-Zellen verglichen mit den jeweiligen Kontrollzelllinien resultierte jeweils in einer signifikanten Reduzierung der IDE-Aktivität (MEF-*PS1/2*^{-/-}: 88,5 \pm 2,5 %, $p = 0,019$; MEF-*APP/APLP2*^{-/-}: 82,6 \pm 1,7 %, $p = 0,005$; und MEF-*APP Δ CT15*: 73,9 \pm 4,9 %, $p = 0,002$) (Abbildung 39 A-B). Weiterführend wurde analysiert, ob die beobachtete verringerte Enzymaktivität von IDE mit einem reduzierten IDE-Proteingehalt einhergeht. Wie in Abbildung 39 C-D ersichtlich, basieren diese Effekte auf einer signifikanten Reduzierung des IDE-Proteingehaltes. Das Fehlen der katalytischen Untereinheit des γ -Sekretasekomplexes in MEF-*PS1/2*^{-/-}-Zellen resultierte in einem auf 69,8 \pm 3,8 % ($p \leq 0,001$) signifikant reduzierten IDE-Proteingehalt im Vergleich zu MEF-*PS1res*-Zellen. Übereinstimmend damit bedingte auch eine Inhibition der γ -Sekretase-Aktivität in MEF-*PS1res*-Zellen durch DAPT einen ähnlichen Effekt auf den IDE-Proteinspiegel (MEF-*PS1res* + DAPT: 68,7 \pm 5,9 %; $p \leq 0,001$), was validiert, dass die Proteinmenge von IDE eng mit der Aktivität der γ -Sekretase zusammenhängt. Auch in MEF-Zellen, denen die APP-Proteinfamilie oder eine funktionale AICD fehlen, konnten ähnliche, signifikant reduzierende Effekte auf den Proteingehalt von IDE detektiert werden (MEF-*APP/APLP2*^{-/-}: 41,4 \pm 4,2 %; $p \leq 0,001$ und MEF-*APP Δ CT15*: 59,3 \pm 10,4 %; $p = 0,007$) (Abbildung 39 D). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das Fehlen der AICD, welches durch das Defizit an *PS1/2*, *APP/APLP2* oder den terminalen 15 Aminosäuren von APP (*APP Δ CT15*) sowie durch den Einsatz des γ -Sekretaseinhibitors DAPT experimentell bedingt wurde, einen Effekt auf die *Ide*-Genexpression haben könnte, welcher sich in den beobachteten reduzierten Proteinspiegeln äußert. Dieser potenzielle transkriptionsregulatorische Einfluss der AICD auf IDE wurde daher im folgenden Kapitel analysiert.

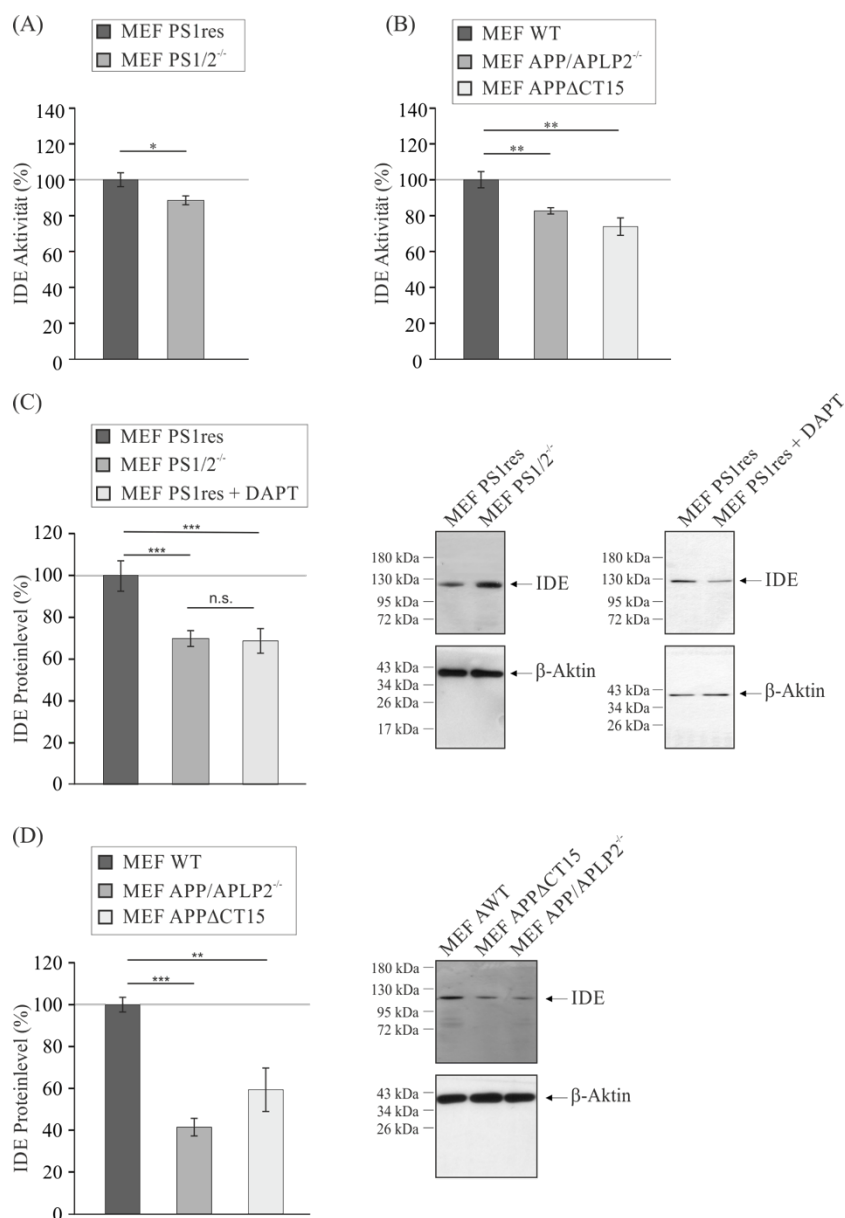


Abbildung 39: Analyse der IDE-Enzymaktivität und des IDE-Proteingehaltes in PS1/2-, APP/APLP2- oder AICD-defizienten embryonalen Maus-Fibroblasten. (A) Aktivität von IDE in MEF-PS1/2^{-/-}-Zellen verglichen mit MEF-PS1/2^{-/-}-Zellen, die mit PS1 retransfiziert wurden (MEF-PS1res) (n = 14). (B) Reduzierte IDE-Enzymaktivität in MEF-APP/APLP2^{-/-}- und MEF-APPACT15-Zellen im Vergleich zu MEF-WT-Zellen (n = 8). (C) Mittels Western Blot-Analyse detektierter IDE-Proteingehalt in MEF-PS1/2^{-/-}- oder MEF-PS1res-Zellen, die mit dem γ -Sekretase-Inhibitor DAPT inkubiert wurden im Vergleich zu MEF-PS1res-Zellen (n \geq 8). (D) IDE-Proteingehalt in MEF-APP/APLP2^{-/-}- und MEF-APPACT15-Zellen verglichen mit MEF-WT-Zellen (n = 7). Rechtsständig sind repräsentative Western Blots abgebildet. Zwischen den gegenübergestellten Zelllinien wurden keine Unterschiede im β -Aktin-Signal detektiert (MEF-PS1/2^{-/-}: 106,8 %, p = 0,099; MEF-PS1/2^{-/-} + DAPT: 106,1 %, p = 0,761; MEF-APP/APLP2^{-/-}: 93,2 %, p = 0,769; MEF-APPACT15: 112,7 %, p = 0,518). Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Sterne stellen die statistische Signifikanz dar, wobei *p \leq 0,05, **p \leq 0,01 und ***p \leq 0,001 gelten (n.s.: nicht signifikant). Waren die Daten normalverteilt, wurde im Falle der Varianzhomogenität (A und D (MEF-WT gegen MEF-APP/APLP2^{-/-})) die ANOVA als statistischer Test verwendet, während bei Verletzung der Varianzhomogenität (D (MEF-WT gegen MEF-APPACT15)) die statistische Signifikanz mittels Welch-ANOVA beurteilt wurde. Für C wurde zur Beurteilung des Mehrfachvergleichs der Tukey-HSD Post-Hoc-Test verwendet. Lag keine Normalverteilung der Daten vor, wurde die statistische Signifikanz mittels Kruskal-Wallis-Test (B) berechnet. Die Analysen der IDE-Aktivität erfolgten in Kooperation mit Dr. Janine Mett und die des IDE-Proteingehaltes in Kooperation mit Dr. Janine Mett und Andrea Thiel. Abbildung verändert nach (LAUER et al., 2020).

4.4.4 Der Einfluss von Presenilin, APP und AICD auf die *IDE*-Genexpression in embryonalen Maus-Fibroblasten und humanen Neuroblastomzellen

AICD kann in den Nukleus translozieren und ist dort in die Regulierung einiger Zielgene involviert (GRIMM et al., 2015a; PARDOSSI-PIQUARD et al., 2005; ROBINSON et al., 2014; VON ROTZ et al., 2004). Um zu überprüfen, ob die Reduzierungen des IDE-Proteingehaltes und der IDE-Aktivität in Zellen ohne PS, APP oder AICD durch eine verringerte *IDE*-Genexpression in Abwesenheit von AICD bedingt werden, wurden Echtzeit-PCR-Analysen der entsprechenden Zelllinien durchgeführt. Die Transkription von *Ide* war in MEF-PS1/2^{-/-}, MEF-APP/APLP2^{-/-} und MEF-APPΔCT15-Zellen signifikant verringert (MEF-PS1/2^{-/-}: 74,7 ± 7,2 % mit p = 0,010; MEF-APP/APLP2^{-/-}: 76,6 ± 6,4 % mit p ≤ 0,001 und MEF-APPΔCT15: 37,9 ± 9,7 % mit p ≤ 0,001) (Abbildung 40 A-B). Weiterführend wurde analysiert, ob die AICD-abhängige Transkriptionsregulierung von *Ide* auf MEF-Zellen beschränkt ist. Auf Grund der wichtigen Aβ-degradierenden Funktion von IDE im humanen Gehirn wurde sich für die humane Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y als zweites Zellkulturmodell entschieden. In Übereinstimmung mit den in murinen Fibroblasten beobachteten Effekten war die *IDE*-Genexpression in SH-SY5Y-Zellen, in denen die für PS1 (SH-SY5Y-PS1^{-/-}) oder APP (SH-SY5Y-APP^{-/-}) kodierenden Gene mittels CRISPR/Cas9-Methode deletiert wurden, signifikant reduziert (SH-SY5Y-PS1^{-/-}: 87,2 ± 5,7 % mit p = 0,015; SH-SY5Y-APP^{-/-}: 51,6 ± 3,3 % mit p = 0,002) (Abbildung 40 C-D). Der signifikante Unterschied in den Effektstärken zwischen SH-SY5Y-PS1^{-/-} und SH-SY5Y-APP^{-/-}-Zellen (87,2 % im Vergleich zu 51,6 % mit p ≤ 0,001) könnte darauf zurückzuführen sein, dass der Knockout von *PS1* in SH-SY5Y-Zellen auf Grund des Vorhandenseins von *PS2* die γ-Sekretase-Aktivität nicht so stark beeinträchtigt wie der Knockout von *APP*. Im Einklang mit diesen Beobachtungen resultierte die Überexpression von APP⁶⁹⁵, der am häufigsten vorkommenden APP-Isoform in neuronalen Zellen, in einer signifikant auf 169,9 ± 29,4 % (p = 0,005) gesteigerten *IDE*-Genexpression in SH-SY5Y-Zellen (Abbildung 40 D). Auf Grund dessen, dass in der Literatur aktuell diskutiert wird, ob die Kernlokalisierung und die genregulatorische Aktivität auf die von APP⁶⁹⁵-stammende AICD beschränkt ist (BELYAEV et al., 2010), wurde weiterführend der Einfluss verschiedener APP-Isoformen auf die *Ide*-Genexpression in MEF-APP/APLP2^{-/-}-Zellen analysiert. Die transiente Retransfektion mit Plasmiden, die für APP⁶⁹⁵, APP⁷⁵¹ und APP⁷⁷⁰, die drei hauptsächlichen Spleiß-Isoformen von APP, kodieren, resultierte in einer Hochregulierung der *Ide*-Transkription in vergleichbarem Maße, erreichte jedoch nicht das Expressionsniveau in MEF-WT-Zellen (MEF-APP/APLP2^{-/-} + APP⁶⁹⁵: 131,6 ± 6,9 % mit p = 0,047; MEF-APP/APLP2^{-/-} + APP⁷⁵¹: 134,0 ± 6,9 % mit p = 0,022; MEF-APP/APLP2^{-/-} + APP⁷⁷⁰: 134,5 ± 4,4 % mit p = 0,018 im Vergleich zu MEF-WT: 186,6 ± 14,5 % mit p ≤ 0,001) (Abbildung 40 E).

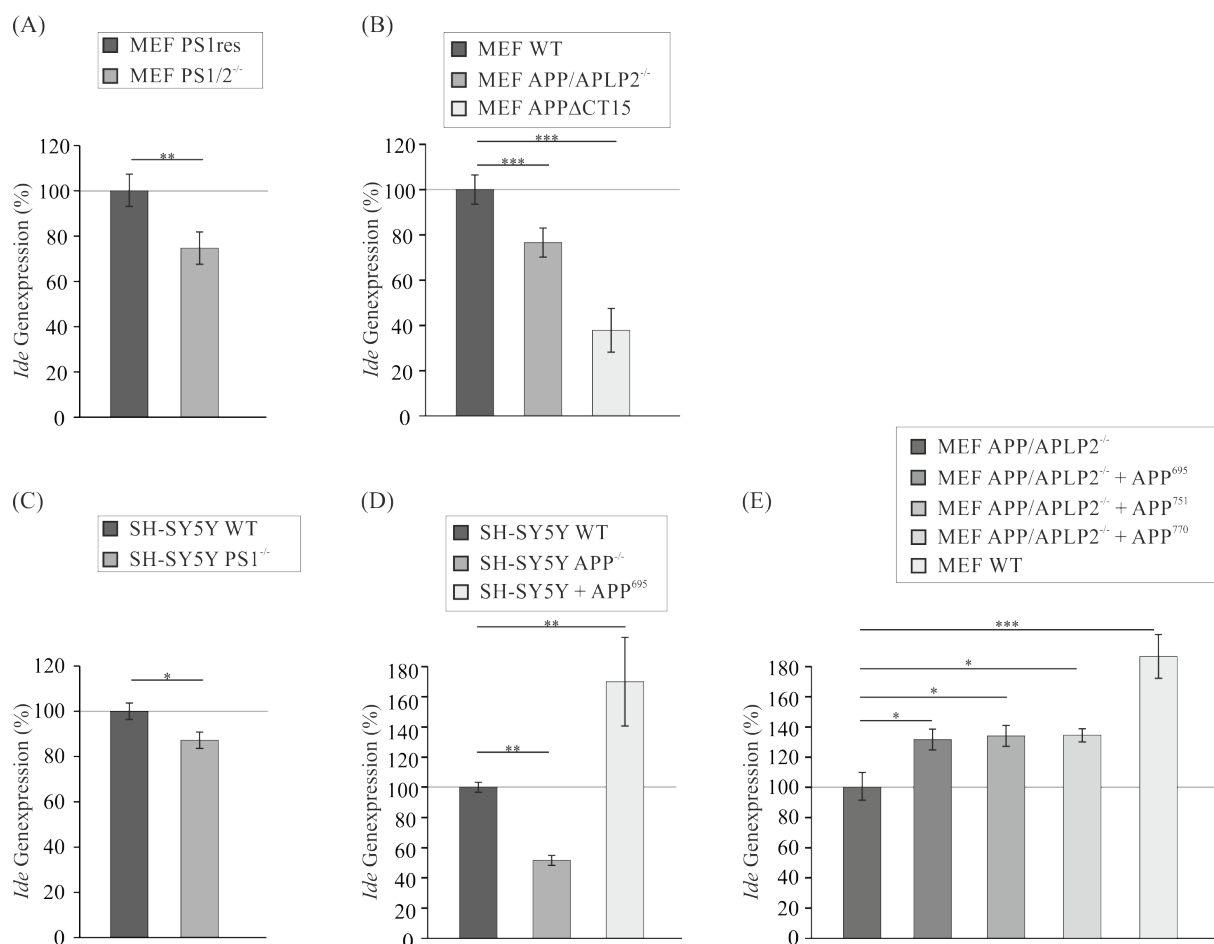


Abbildung 40: Analyse der IDE-Genexpression mittels Echtzeit-PCR in verschiedenen Zelllinien ohne katalytisch aktive Komponenten des γ -Sekretasekomplexes, der APP-Familie oder AICD sowie in APP-überexprimierenden Zellen. (A) *Ide*-Genexpression in MEF-Zellen ohne PS1 und PS2 (MEF-PS1/2^{-/-}) im Vergleich zu MEF-PS1/2^{-/-}-Zellen mit Retransfektion von PS1 (MEF-PS1res) (n = 16). (B) Beeinträchtigte *Ide*-Genexpression in MEF-Zellen ohne APP-Familie (MEF-APP/APLP2^{-/-}) oder funktionale AICD (MEF-APPACT15) im Vergleich zu MEF-WT-Zellen (n ≥ 11). (C) Reduzierte *IDE*-Genexpression in humanen Neuroblastomzellen mit CRISPR/Cas-vermitteltem Knockout für PS1 (SH-SY5Y-PS1^{-/-}) im Vergleich zu SH-SY5Y-WT-Zellen (n = 10). (D) *IDE*-Genexpression in humanen Neuroblastomzellen mit CRISPR/Cas-vermitteltem Knockout für APP (SH-SY5Y-APP^{-/-}) sowie in stabil APP⁶⁹⁵-überexprimierenden SH-SY5Y-Zellen (SH-SY5Y + APP⁶⁹⁵) im Vergleich zu SH-SY5Y-WT-Zellen (n ≥ 5). (E) Genexpression von *Ide* in MEF-APP/APLP2^{-/-}-Zellen, die transient mit den Haupt-APP-Isoformen APP⁶⁹⁵, APP⁷⁵¹ und APP⁷⁷⁰ retransfiziert wurden, sowie in MEF-WT-Zellen verglichen mit der Expression in MEF-APP/APLP2^{-/-}-Zellen (n = 5). Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Sterne stellen die statistische Signifikanz dar, wobei *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01 und ***p ≤ 0,001 gelten (n.s.: nicht signifikant). Da die aus der Genexpressionsanalyse resultierten Daten nicht normalverteilt waren, wurde die statistische Signifikanz mittels Kruskal-Wallis-Test berechnet (A-E). Für E erfolgte der Dunn's Paarweise-Vergleich. Die Analysen der IDE-Aktivität erfolgten in Kooperation mit Dr. Janine Mett und die des IDE-Proteingehaltes in Kooperation mit Dr. Janine Mett und Dr. Christoph P. Stahlmann. Abbildung verändert nach (LAUER et al., 2020).

4.4.5 Die Wirkung der AICD auf IDE-Genexpression und Proteinspiegel

Um die Rolle der AICD in der Regulierung von IDE detaillierter aufzuklären, wurden MEF-APP Δ CT15-Zellen, die keine funktionale AICD besitzen, transient mit einem AICD-exprimierenden Plasmid, welches für die letzten 50 Aminosäuren des C-Terminus von APP (C50) kodiert, transfiziert und die *Ide*-Genexpression analysiert. Die Re-Transfektion mit C50 stellte hierbei das optimale Kontrollexperiment dar, da die Ergebnisse nach Re-Transfektion von APP nicht allein auf die AICD zurückführbar gewesen wären, da die Δ CT15-Deletion mit reduzierten A β -Spiegeln einhergeht (RING et al., 2007).

Im Vergleich zu untransfizierten MEF-APP Δ CT15-Zellen wurde in C50-überexprimierenden Zellen eine signifikant auf $131,4 \pm 11,6$ % ($p = 0,005$) gesteigerte *Ide*-Expression detektiert. Übereinstimmend damit resultierten sowohl eine kurzzeitige (48 h) als auch eine langzeitige (neun Tage) Inkubation von MEF-APP Δ CT15-Zellen mit AICD-Peptiden in einer signifikanten Zunahme der *Ide*-Genexpression (48 h: $139,6 \pm 10,2$ % ($p \leq 0,001$); 9d: $145,4 \pm 12,3$ % ($p \leq 0,001$)), wobei zwischen den C50-überexprimierenden Zellen sowie den für neun Tage mit AICD-Peptiden inkubierten Zellen kein statistisch signifikanter Unterschied detektiert wurde ($p = 0,608$) (Abbildung 41 A). Auf Grund dessen, dass beide AICD-Inkubationsbedingungen vergleichbare Effekte bedingten und um die Menge an AICD einzusparen, wurde sich im Folgenden nur noch auf die kurzzeitige AICD-Behandlung konzentriert. Auch in humanen SH-SY5Y-Zellen, die stabil mit C50 transfiziert wurden, konnte eine signifikant auf $147,8 \pm 10,4$ % ($p = 0,002$) hochregulierte *IDE*-Genexpression quantifiziert werden (Abbildung 41 B). In Übereinstimmung mit der erhöhten *IDE*-Genexpression in MEF-APP Δ CT15-Zellen nach Inkubation mit AICD-Peptid oder Transfektion von C50, war der IDE-Proteingehalt nach 48-stündiger Anwesenheit von AICD signifikant auf $128,4 \pm 8,5$ % ($p = 0,027$) und nach transienter Transfektion mit C50 signifikant auf $135,9 \pm 6,4$ % ($p = 0,004$) erhöht (Abbildung 41 C). Die Effektstärken unterschieden sich dabei nicht signifikant voneinander ($p = 0,498$). Eine signifikante Zunahme des IDE-Proteingehaltes wurde auch in Presenilin-defizienten MEF-Zellen detektiert, welche für 48 Stunden mit AICD behandelt wurden (MEFPS1/2^{-/-} + AICD: $135,9 \pm 2,3$ % ($p \leq 0,001$)) (Abbildung 41 D). Auch die, durch das Fehlen von PS1 und PS2 bedingten, Beeinträchtigungen in der A β -Degradation konnten, in Übereinstimmung mit der erhöhten IDE-Proteinexpression durch transiente Transfektion mit C50 oder Behandlung mit AICD-Peptiden behoben werden. Die transiente Transfektion von MEF-PS1/2^{-/-} mit C50 resultierte in einer wiederhergestellten A β -Degradation, die keinen signifikanten Unterschied zu der Degradation von A β in MEF-PS1res-Zellen aufwies (MEF-PS1/2^{-/-} + C50: $104,0 \pm 4,2$ % ($p = 0,675$)). Gleichzeitig war die Menge an nicht-degradierten A β -Peptiden in MEF-PS1/2^{-/-}+C50-Zellen verglichen mit MEF-PS1/2^{-/-}-Zellen ohne transiente Transfektion signifikant von $120,5 \pm 3,2$ % auf $104,0 \pm 4,2$ % ($p = 0,030$) reduziert (Abbildung 41 E).

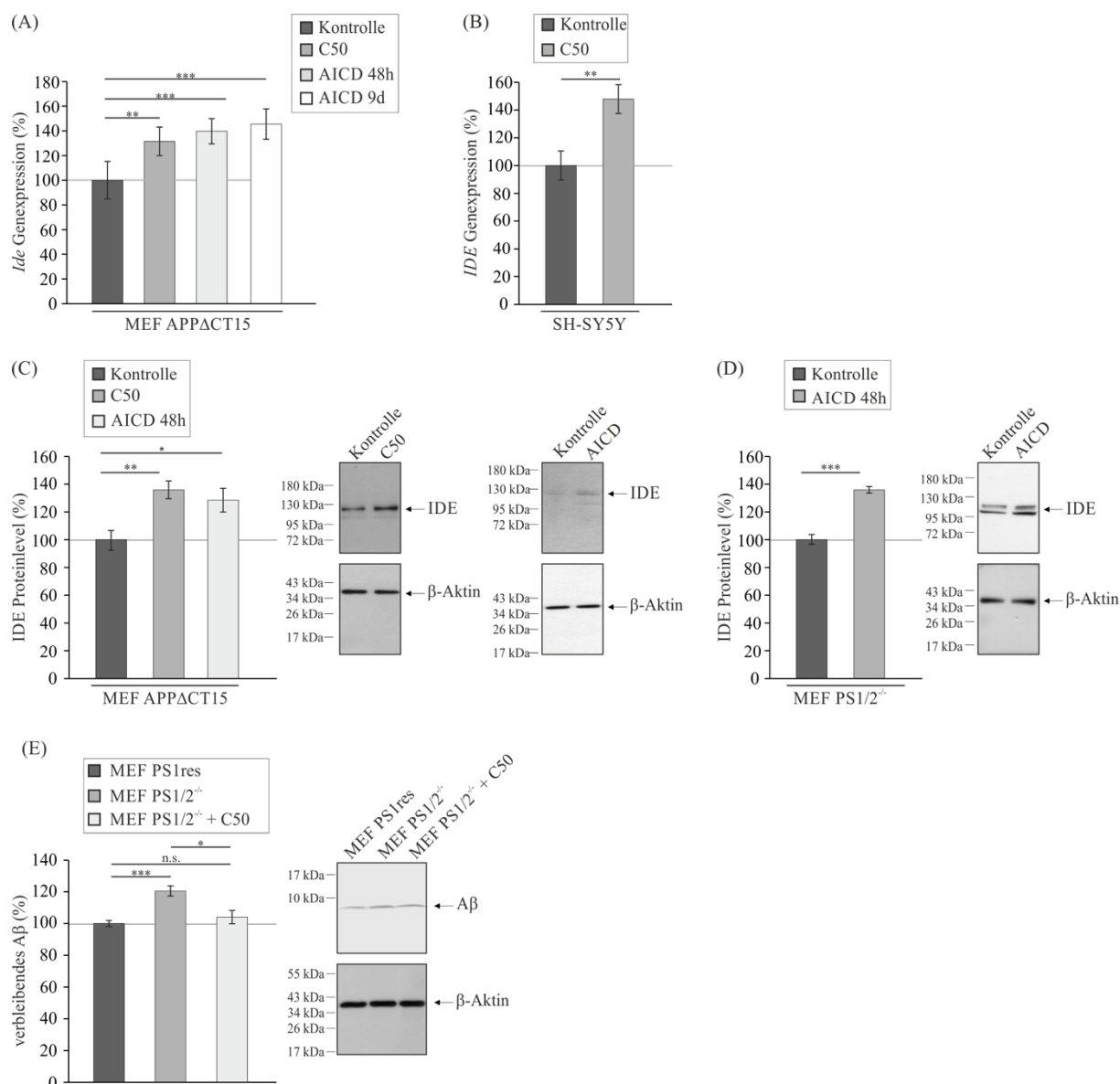


Abbildung 41: Analyse der IDE-Gen- und Proteinexpression in Anwesenheit von AICD. (A) *Ide*-Genexpression in MEF-APPΔCT15-Zellen, welche mit einem Plasmid, das für die letzten 50 Aminosäuren des C-Terminus von APP (C50) kodiert, transfiziert oder kurzzeitig (48 Stunden) bzw. langfristig (neun Tage) mit AICD-Peptiden inkubiert wurden (n ≥ 5). (B) Erhöhte *IDE*-Genexpression in humanen Neuroblastomzellen (SH-SY5Y), die C50 stabil überexprimieren, im Vergleich zu mock-transfizierten Kontrollzellen (n = 6). (C) Gesteigerter IDE-Proteingehalt in MEF-APPΔCT15-Zellen, die mit C50 transfiziert oder für 48 Stunden mit AICD inkubiert wurden (n ≥ 5). (D) Erhöhte IDE-Spiegel in MEF-PS1/2^{-/-}-Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit AICD (n = 5). (E) Aβ-Degradation in MEF-PS1res-, MEF-PS1/2^{-/-}- und MEF-PS1/2^{-/-}-Zellen transfiziert mit C50 (MEF-PS1/2^{-/-}+C50) (n ≥ 5). Rechtsständig sind jeweils repräsentative Western Blots abgebildet. Zwischen den gegenübergestellten Zelllinien wurden keine Unterschiede im β-Aktin-Signal detektiert (MEF-APPΔCT15 + C50: 96,8 %, p = 0,771; MEF-APPΔCT15+AICD: 104,6 %, p = 0,664; MEF-PS1/2^{-/-}+AICD: 109,8 %, p = 0,599; MEF-PS1/2^{-/-}: 104,3 %, p = 0,877; MEF-PS1/2^{-/-}+C50: 101,5 %, p = 0,892). Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Sterne stellen die statistische Signifikanz dar, wobei *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01 und ***p ≤ 0,001 gelten (n.s.: nicht signifikant). Waren die Daten normalverteilt, wurde im Falle der Varianzhomogenität die ANOVA als statistischer Test herangezogen (C-D). Lag keine Normalverteilung der Daten vor, wurde die statistische Signifikanz mittels Kruskal-Wallis-Test (A-B) berechnet. Für A wurde zur Beurteilung des Mehrfachvergleichs der Dunn's Paarweise-Vergleich und für D der Games-Howell-Test herangezogen. Die Analysen der IDE-Gen- und Proteinexpression sowie der Aβ-Degradation erfolgten in Kooperation mit Dr. Janine Mett und Andrea Thiel. Abbildung verändert nach (LAUER et al., 2020).

4.4.6 Der Einfluss einer funktionalen AICD auf die *IDE*-Promotoraktivität

Weiterführend wurde analysiert, ob die Aktivität des *IDE*-Promotors in Zellen, denen die APP-Proteinfamilie oder eine funktionale AICD fehlt, beeinträchtigt ist. Dazu wurden MEF-APP/APLP2^{-/-}- sowie MEF-APPΔCT15-Zellen transient mit dem dualen Reportersystem-Vektor pEZX-PG04-*IDE*-*Gluc* transfiziert, bei welchem das Gen der *Gaussia* Luciferase (*GLuc*) als Reporter gen fungiert, dessen Expression unter der Kontrolle der *IDE*-Promotorregion steht. In beiden analysierten Zelllinien war die Luciferase-Aktivität, welche die Aktivität des *IDE*-Promotors abbildet, im Vergleich zu wildtypischen MEF-Zellen signifikant reduziert (MEF-APP/APLP2^{-/-}: 32,2 ± 2,3 % (p = 0,004); MEF-APPΔCT15: 57,5 ± 2,4 % (p ≤ 0,001)), wobei der Effekt in MEF-APP/APLP2^{-/-}- signifikant stärker ausgebildet war als in MEF-APPΔCT15-Zellen (32,2 % zu 57,5 % mit p = 0,002) (Abbildung 42 A). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass AICD in der Lage ist, die Promotorregion der *IDE*-kodierenden Sequenz zu regulieren. Dieser Hinweis wurde weiterführend durch die Beobachtungen der C50-Transfektionsexperimente gestützt. In MEF-APPΔCT15-Zellen resultierte die Transfektion mit C50 in einer signifikanten Zunahme der *IDE*-Promotoraktivität auf 125,7 ± 4,1 % (p = 0,003) im Vergleich zu Kontroll-transfizierten Zellen (Abbildung 42 B).

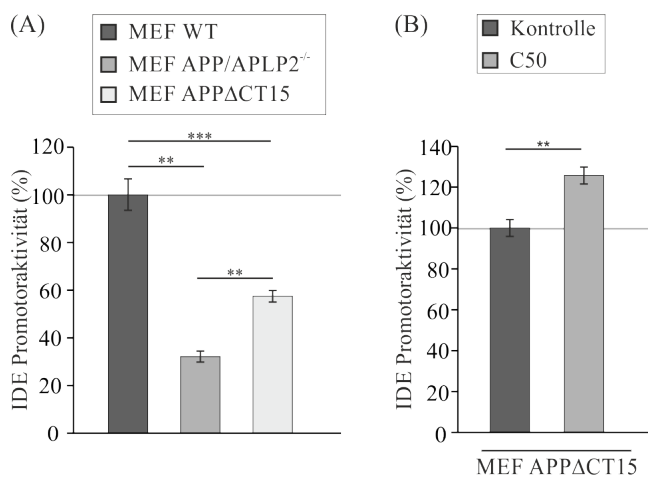


Abbildung 42: Analyse der *IDE*-Promotoraktivität. (A) Reduzierte Aktivität des *IDE*-Promotors in Zellen ohne APP-Familie (MEF-APP/APLP2^{-/-}) oder funktionale AICD (MEF-APPΔCT15) im Vergleich zu MEF-WT-Zellen (n = 6). (B) Erhöhte *IDE*-Promotoraktivität in MEF-APPΔCT15-Zellen, die mit C50 transfiziert wurden (n = 5). Zur Bestimmung der Aktivität des *IDE*-Promotors wurden die Zellen transient mit dem dualen Reportersystem-Vektor pEZX-PG04-*IDE*-*Gluc* transfiziert und die Aktivität der *Gaussia* Luciferase (*GLuc*) mit Hilfe einer Fluoreszenz-basierten Analyse detektiert. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Sterne stellen die statistische Signifikanz dar, wobei **p ≤ 0,01 und ***p ≤ 0,001 gelten. Waren die Daten normalverteilt, wurde im Falle der Varianzhomogenität die ANOVA als statistischer Test herangezogen (B). Im Falle normalverteilter, aber nicht-varianzhomogener Daten wurde die Welch-ANOVA angewendet (A, MEF-APPΔCT15). Lag keine Normalverteilung der Daten vor, wurde die statistische Signifikanz mittels Kruskal-Wallis-Test (A, MEF-APP/APLP2^{-/-}) berechnet. Die Analysen der *IDE*-Promotoraktivität erfolgten in Kooperation mit Dr. Janine Mett. Abbildung verändert nach (LAUER et al., 2020).

4.4.7 Die Alzheimer-Relevanz der AICD-abhängigen *IDE*-Genexpression

Zur Validierung der auf zellulärer Ebene beobachteten Zusammenhänge zwischen der AICD und dem A β -degradierenden Enzym IDE wurde die Genexpression von *Ide* in APP-KO-Mäusen (APP^{-/-}) und in heterozygoten Mäusen, die eine verkürzte APP-Form ohne die letzten 15 C-terminalen Aminosäuren exprimieren (APP Δ CT15^{+/-}), analysiert.

Die *Ide*-Genexpression war in Hirnhomogenaten von APP^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen signifikant auf $86,9 \pm 4,8$ % ($p = 0,014$) reduziert. Ähnlich dazu wurde eine signifikant verringerte Expression von *Ide* in APP Δ CT15^{+/-}-exprimierenden, heterozygoten, transgenen Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen detektiert ($91,7 \pm 2,9$ % ($p = 0,007$)) (Abbildung 43 A).

Einhergehend mit den Ergebnissen der Genexpressionsanalyse wurde ein signifikant verminderter IDE-Proteingehalt in Hirnhomogenaten von APP Δ CT15^{+/-}-Mäusen im Vergleich zum Hirngewebe von WT-Mäusen quantifiziert ($77,3 \pm 4,9$ % ($p = 0,041$)) (Abbildung 43 B).

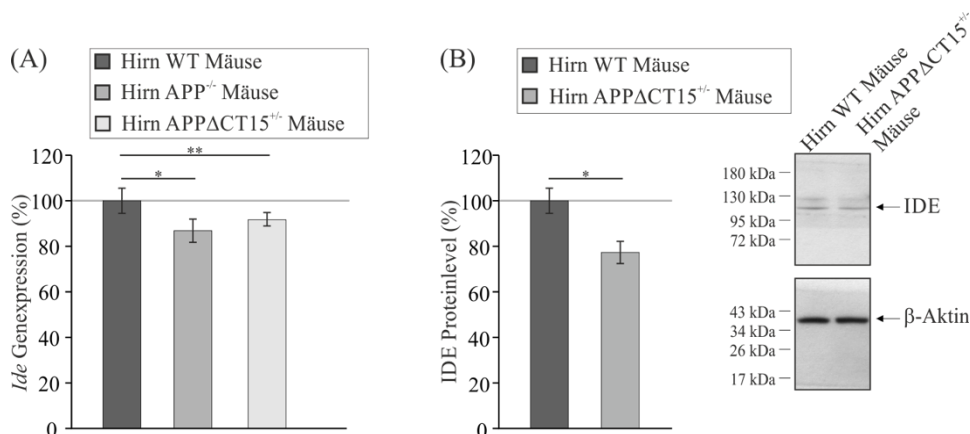


Abbildung 43: Analyse von murinen APP^{-/-}- und APP Δ CT15^{+/-}- Hirngewebeproben. (A) *Ide*-Genexpression in Hirnhomogenaten von APP-defizienten Mäusen (APP^{-/-}) und in Mäusen, die eine verkürzte Form von APP, welcher die letzten 15 Aminosäuren des APP-C-Terminus fehlen, exprimieren (APP Δ CT15^{+/-}), verglichen mit WT-Mäusen ($n \geq 4$). (B) IDE-Proteingehalt in Hirnhomogenaten von APP Δ CT15^{+/-}-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen ($n \geq 4$). Rechtsständig sind jeweils repräsentative Western Blots abgebildet. Zwischen den gegenübergestellten Mausmodellen wurden keine Unterschiede im β -Aktin-Signal detektiert (MEF-APP Δ CT15^{+/-}-Mäuse: 105,5 %, $p = 0,406$). Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Sterne stellen die statistische Signifikanz dar, wobei * $p \leq 0,05$ und ** $p \leq 0,01$ gelten. Waren die Daten normalverteilt, wurde im Falle der Varianzhomogenität die ANOVA als statistischer Test herangezogen (B). Lag keine Normalverteilung der Daten vor, wurde die statistische Signifikanz mittels Kruskal-Wallis-Test (A) berechnet. Die Analysen der IDE-Gen- und Proteinexpression erfolgten in Kooperation mit Dr. Janine Mett und Dr. Felix Ritzmann. Abbildung verändert nach (LAUER et al., 2020).

Um die Alzheimerrelevanz der AICD-vermittelten Hochregulierung der *IDE*-Genexpression detaillierter beurteilen zu können, wurde die Transkription der beiden Gene *IDE* und *APP* in humanen *post mortem* Hirnproben von 156 Alzheimerpatienten (detaillierte Charakterisierung in Tabelle 7) mittels Echtzeit-PCR analysiert. Wie anhand Abbildung 44 A deutlich wird, korrelierte die Expression von *APP* signifikant positiv mit der *IDE*-Genexpression ($R = 0,455$ mit $p \leq 0,001$) in Patienten, deren Braak-Status zwischen 4-6 charakterisiert wurde, was den späten Stadien der Alzheimererkrankung entspricht.

Auch für 67 Patienten mit Braak-Stadien zwischen 1-3 (detaillierte Charakterisierung in Tabelle 8), welche frühe Alzheimer-Stadien darstellen, wurde eine positive Korrelation zwischen *APP*- und *IDE*-Expression beobachtet, welche mit $R = 0,261$ ($p = 0,033$) im Vergleich zu der Korrelation in Patienten mit fortgeschrittener Alzheimerprogression weniger stark ausgeprägt war (Abbildung 44 B).

Einhergehend mit diesen Ergebnissen resultierte die kombinierte Analyse beider Patientenkohorten (Braak 1-3 und Braak 4-6) in einer signifikant positiven Korrelation zwischen der Transkription der Gene *APP* und *IDE* ($R = 0,327$ mit $p \leq 0,001$) (Abbildung 44 C). Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse konnten in zufällig ausgewählten Patientenproben aus den Braak-Stadien 1-6, von denen noch ausreichend Hirnhomogenate für weitere Analysen zur Verfügung standen, auf Proteinebene validiert werden. Die Western Blot-Analyse resultierte in einer signifikant positiven Korrelation zwischen *APP*- und *IDE*-Proteingehalt ($R = 0,497$ mit $p = 0,030$) (Abbildung 44 D).

Ein Vergleich der Expressionen von *APP* und *IDE* in den Braak-Stadien 2-6 gegenüber dem Braak-Stadium 1, welches den frühen Beginn der Alzheimererkrankung repräsentiert, resultierte in keinen signifikanten Veränderungen (Abbildung 44 E). Des Weiteren schien die positive Korrelation zwischen *APP*- und *IDE*-Transkription nicht geschlechtsspezifisch zu sein, da sowohl für Frauen als auch für Männer signifikant positive Korrelation detektiert wurde (Frauen: $R = 0,323$ mit $p \leq 0,001$; Männer: $R = 0,335$ mit $p = 0,006$) (Abbildung 44 F).

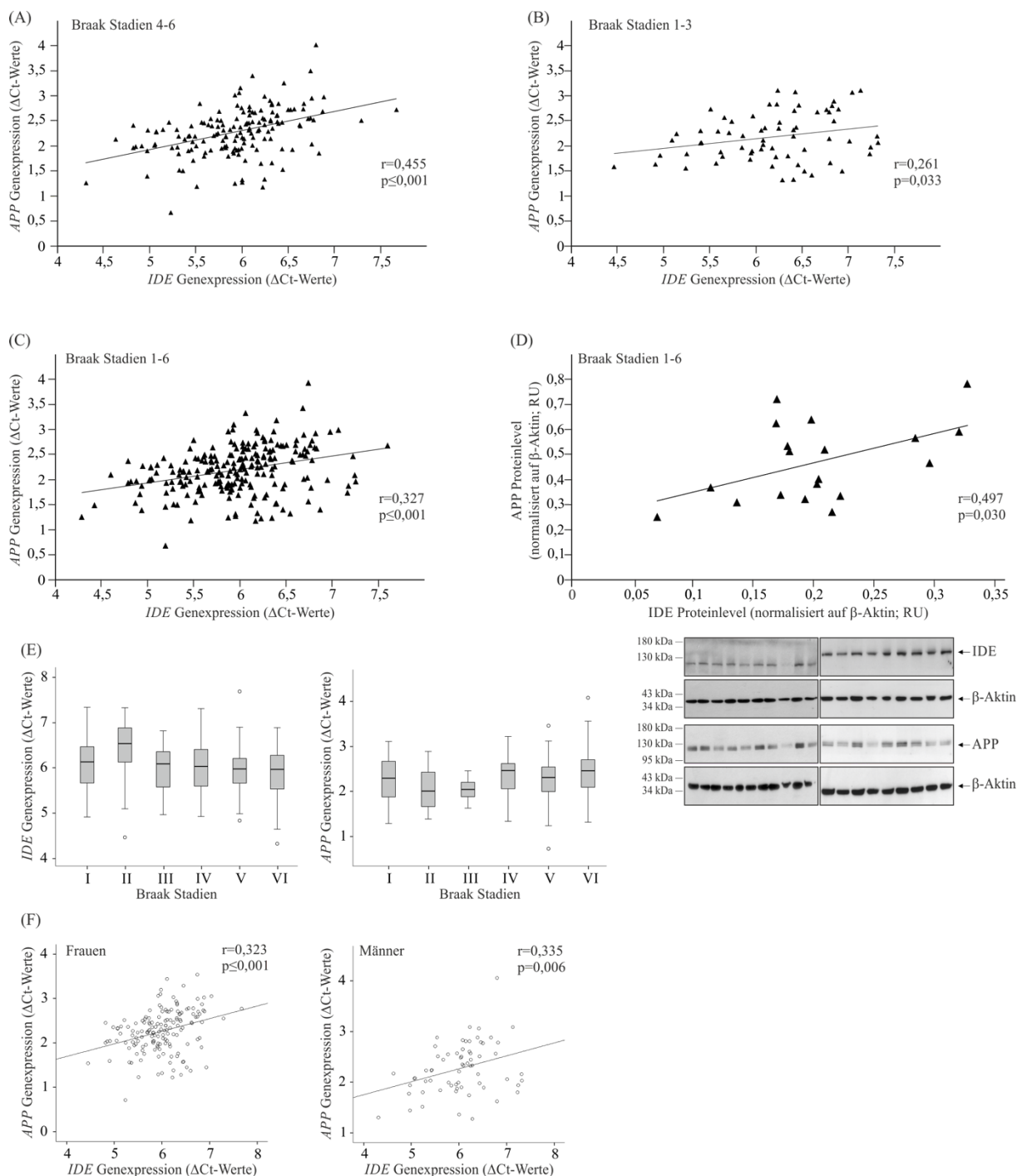


Abbildung 44: Expression von IDE und APP in humanen *post mortem* Hirnproben. (A) Spearman-Korrelation der *APP/IDE*-Transkription in humanen *post mortem* Hirnproben von Alzheimerpatienten, bei welchen ein Braak-Status zwischen 4 und 6 diagnostiziert wurde ($n = 156$). (B) Pearson-Korrelation der *APP/IDE*-Transkription in humanen *post mortem* Hirnproben von Alzheimerpatienten, bei welchen ein Braak-Status zwischen 1 und 3 diagnostiziert wurde ($n = 67$). (C) Kombinierte Analyse und resultierende Korrelation der *APP/IDE*-Transkription in Hirnproben von Patienten mit Braak-Status 1-6 ($n = 223$). (D) Korrelation von APP- und IDE-Proteingehalt in humanen Hirnproben mit ausreichend Proteinmenge für eine Western Blot-Analyse ($n = 19$). (E) Subgruppenanalyse der IDE- und APP-Genexpressionen hinsichtlich Braak-Status dargestellt als Boxplots (Signifikanzberechnung mittels ANOVA; $n = 223$). (F) Pearson-Korrelation der *APP/IDE*-Transkription in Abhängigkeit des Geschlechts (Frauen: $n = 157$; Männer: $n = 66$). Für normalverteilte Daten und Stichprobengrößen > 200 wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient berechnet, wohingegen bei nicht-normalverteilten Daten der Spearman-Korrelationskoeffizient ermittelt wurde. Abbildung verändert nach (LAUER et al., 2020).

4.5 Im Rahmen von Kooperationen generierte Ergebnisse weiterer Projekte

Das folgende Kapitel stellt Ergebnisse vor, die von der Autorin der vorliegenden Arbeit im Rahmen verschiedener Kooperationen generiert und publiziert wurden. Neben der Veranschaulichung der Daten wird kurz auf deren Bedeutung für das jeweilige Projekt eingegangen.

4.5.1 Methylxanthine und die Alzheimererkrankung

Die Ergebnisse der Studien, die sich mit dem Einfluss von Methylxanthinen auf die molekularen Mechanismen der Alzheimererkrankung befassten, sind in *biomolecules* (MDPI-Verlag, *Impact Factor* dieser Fachzeitschrift Stand September 2022: 4,879) und *International Journal of Molecular Sciences* (MDPI-Verlag, *Impact Factor* dieser Fachzeitschrift Stand September 2022: 5,924) veröffentlicht:

Janitschke D*, Nelke C*, **Lauer AA**, Regner L, Winkler J, Thiel A, Grimm HS, Hartmann T, Grimm MOW. *Effect of Caffeine and Other Methylxanthines on β -Homeostasis in SH-SY5Y Cells*. *Biomolecules*. 2019 Nov 2;9(11):689. doi: 10.3390/biom9110689. PMID: 31684105; PMCID: PMC6920871. *diese Autoren haben gleichermaßen zu dieser Publikation beigetragen

Janitschke D*, **Lauer AA***, Bachmann CM*, Seyfried M, Grimm HS, Hartmann T, Grimm MOW. *Unique Role of Caffeine Compared to Other Methylxanthines (Theobromine, Theophylline, Pentoxifylline, Propentofylline) in Regulation of AD Relevant Genes in Neuroblastoma SH-SY5Y Wild Type Cells*. *Int J Mol Sci*. 2020 Nov 27;21(23):9015. doi: 10.3390/ijms21239015. PMID: 33260941; PMCID: PMC7730563. *diese Autoren haben gleichermaßen zu dieser Publikation beigetragen

Janitschke D*, **Lauer AA***, Bachmann CM, Winkler J, Griebisch LV, Pilz SM, Theiss EL, Grimm HS, Hartmann T, Grimm MOW. *Methylxanthines Induce a Change in the AD/Neurodegeneration-Linked Lipid Profile in Neuroblastoma Cells*. *Int J Mol Sci*. 2022 Feb 18;23(4):2295. doi: 10.3390/ijms23042295. PMID: 35216410; PMCID: PMC8875332. *diese Autoren haben gleichermaßen zu dieser Publikation beigetragen

Methylxanthine sind von Purinen abgeleitete Xanthinderivate und Vertreter wie Koffein, Theophyllin und Theobromin kommen natürlicherweise in Lebensmitteln, wie Kaffee, grünem Tee oder Kakao vor. Synthetische Methylxanthine, wie Propentofyllin oder Pentoxifyllin, werden auf Grund ihrer bronchoprotektiven Wirkungen als Pharmazeutika zur Behandlung von Atemwegsverengungen eingesetzt. Auf molekularer Ebene stellen Methylxanthine Antagonisten von Adenosinrezeptoren sowie Phosphodiesterase-Inhibitoren dar und es wurden Effekte auf das cholinerge System, die Genregulierung und die Histon-Deacetylase-Aktivierung beschrieben. Diese lassen anti-inflammatorische, anti-oxidative sowie neuroprotektive Eigenschaften der Xanthinderivate vermuten und bilden gemeinsam mit nur moderaten Nebenwirkungen die Grundlage für die Erforschung ihres potenziellen Einsatzes zur Prävention und Therapie neurodegenerativer Erkrankungen (JANITSCHKE et al., 2021). Die folgend vorgestellten Studien beabsichtigten, die mechanistischen Einflüsse der drei natürlichen Methylxanthine Koffein, Theobromin und Theophyllin sowie der beiden synthetischen Xanthinderivate Propentofyllin und Pentoxifyllin auf die Alzheimerpathologie aufzuklären.

Der experimentelle Anteil der Autorin der vorliegenden Arbeit umfasste in der ersten Studie die Analyse der β -Sekretase-Aktivität in postnukleären Fraktionen (PNF) muriner Hirne sowie die Analyse der Transkription von *ADAM10*, *BACE1* und *APP* in humanen Neuroblastomzellen nach deren Inkubation mit den natürlich vorkommenden Methylxanthinen Koffein, Theobromin und Theophyllin sowie den synthetischen Methylxanthinen Propentofyllin und Pentoxifyllin. Die Analysen basierten darauf, dass eine Behandlung von Zellen mit diesen Methylxanthinen in initialen Experimenten in signifikant reduzierten Mengen an A β resultierte und weiterführend die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen aufgeklärt werden sollten. Die Analysen der nicht-amyloidogenen APP-Prozessierung lieferten, auf Grund signifikant erhöhter Spiegel an sAPP α , Hinweise auf eine gesteigerte α -Sekretase-vermittelte APP-Spaltung. Einhergehend damit war die Aktivität der α -Sekretase in Zellen unter Anwesenheit von 100 μ M der analysierten Methylxanthine signifikant erhöht. Mögliche Gründe hierfür könnten direkte Effekte auf die enzymatische Aktivität oder indirekte Effekte, welche die Gen- oder Proteinexpression, den Proteintransport oder die Proteinstabilität beeinflussen, sein. Basierend darauf wurde der ADAM10-Proteingehalt weiterführend experimentell adressiert und es zeigte sich, dass die in die Studie inkludierten Methylxanthine diesen signifikant erhöhten. Um beurteilen zu können, ob der gesteigerte ADAM10-Proteingehalt auf eine erhöhte *ADAM10*-Transkription zurückzuführen ist, wurde von der Autorin der vorliegenden Arbeit eine qRT-PCR-Analyse inkubierter Zellen durchgeführt, welche verdeutlichte, dass die Methylxanthine im Durchschnitt eine schwache, aber signifikante Reduzierung der *ADAM10*-Genexpression bedingten (Abbildung 45 A). Diese Ergebnisse deuten an, dass die Xanthinderivate die Erhöhung des ADAM10-Proteingehaltes nicht über eine gesteigerte Transkription hervorrufen. Einhergehend damit wurde weiterführend detektiert, dass das natürlich vorkommende Methylxanthin Koffein die Proteinstabilität von ADAM10 signifikant erhöht. Im Gegensatz zur gesteigerten nicht-amyloidogenen APP-Prozessierung, war die amyloidogene Prozessierung in Anwesenheit der Xanthinderivate reduziert. Dies wurde unter anderem durch signifikant verringerte sAPP β -Spiegel oder eine signifikant verminderte Aktivität der β -Sekretase nach der Inkubation mit Koffein deutlich. Darüber hinaus konnte die Autorin der vorliegenden Arbeit durch Analysen an postnukleären Fraktionen muriner Hirnproben darlegen, dass das natürlich vorkommende Xanthinderivat Koffein in der Lage ist, die β -Sekretase-Aktivität direkt zu reduzieren (Abbildung 45 B). Neben diesem direkten Einfluss auf die β -Sekretase wies die Analyse der *BACE1*-Transkription, die in Anwesenheit der Methylxanthine signifikant reduziert war (Abbildung 45 C), darauf hin, dass es auch einen indirekten Einfluss zu geben scheint, über welchen die Xanthinderivate die amyloidogene APP-Prozessierung hemmen können. Auf Grund dessen, dass die Alzheimerpathologie und die A β -Konzentrationen nicht nur von der nicht- beziehungsweise amyloidogenen Prozessierung, sondern auch von weiteren, in die A β -Homöostase involvierten, zellulären Prozessen abhängig sind, analysierte die Autorin der vorliegenden Arbeit in einem weiteren Experiment die Transkription von *APP* und detektierte eine signifikante Abnahme in Koffein-behandelten humanen Neuroblastomzellen (Abbildung 45 D).

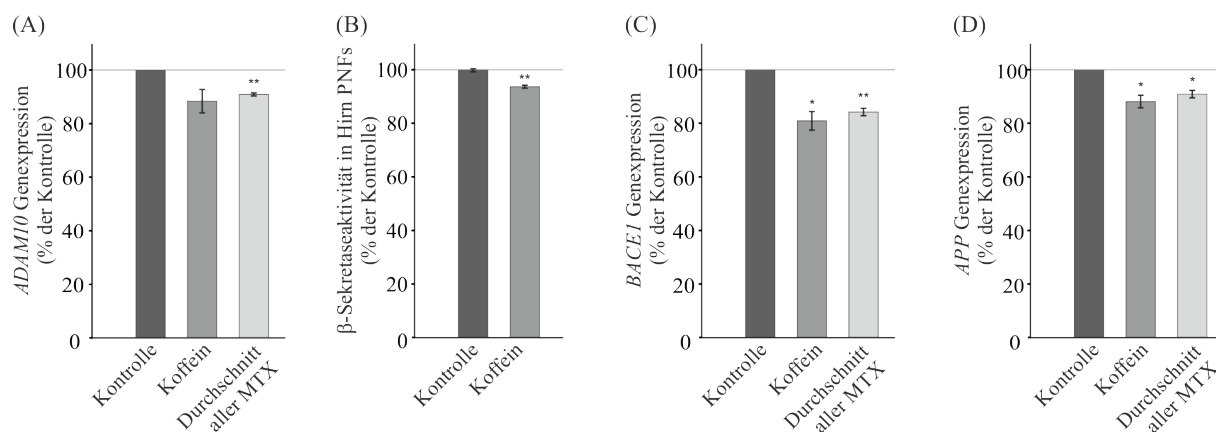


Abbildung 45: Methylxanthine beeinflussen die an der APP-Prozessierung beteiligten Sekretasen. (A) qRT-PCR-Analyse der *ADAM10*-Transkription in den mit den Methylxanthinen Koffein, Theobromin, Theophyllin, Propentofyllin und Pentoxifyllin behandelten SH-SY5Y-WT-Zellen im Vergleich zu den Lösungsmittelkontrolle-inkubierten Zellen ($n \geq 10$). (B) Aktivität der β -Sekretase in Koffein-behandelten postnukleären Fraktionen von WT-Maushirnen ($n = 6$). (C) Analyse der Expression von *BACE1* in mit verschiedenen Methylxanthinen behandelten SH-SY5Y-WT-Zellen mittels qRT-PCR ($n \geq 10$). (D) qRT-PCR-Transkriptionsanalyse von *APP* nach Inkubation mit Koffein und den weiteren Xanthinderivaten Theobromin, Theophyllin, Propentofyllin und Pentoxifyllin ($n \geq 10$). Die Kontrollbedingungen wurden auf 100 % gesetzt und als Linie im Säulendiagramm dargestellt. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Sterne stellen die statistische Signifikanz, die mittels ungepaartem Student-t-Test berechnet wurde, dar, wobei * $p \leq 0,05$ und ** $p \leq 0,01$ gelten. Abbildung verändert nach (JANITSCHKE et al., 2019).

Neben diesen beeinflussten APP-Gen- und Proteinspiegeln konnten in der Studie auch verringerter oxidativer Stress, reduzierte Cholesterinspiegel sowie eine verringerte $A\beta_{1-42}$ -Aggregation in Anwesenheit der Methylxanthine als weitere, pleiotrope Mechanismen identifiziert werden, durch welche diese Xanthinderivate ihre positiven Einflüsse auf die Alzheimerpathologie vermitteln könnten.

Weiterführend sollte in einer zweiten Studie analysiert werden, ob weitere Prozesse, die in die Alzheimerpathologie involviert sind, durch Methylxanthine beeinflusst werden. Hierzu wurde die transkriptionelle Regulierung von 83 Alzheimer-relevanten Genen in verschiedenen zellulären Systemen nach Inkubation unterschiedlicher Methylxanthine (Koffein, Theobromin, Theophyllin, Propentofyllin, Pentoxifyllin) mittels qRT-PCR analysiert. Der Anteil der Autorin der vorliegenden Arbeit an dieser Studie umfasste die initialen qRT-PCR-Analysen der behandelten SH-SY5Y-Zellen sowie in Kooperation mit Cornel M. Bachmann und Daniel Janitschke die Auswahl der Gene, das Entwerfen der Primer, die experimentelle HKG-Selektion und die Auswertung der generierten Daten. Es wurde deutlich, dass die Transkription derjenigen Gene, die in die zellulären Prozesse oxidativer Stress, Lipid- und Energiemetabolismus, Signaltransduktion und Genexpression, $A\beta$ - und Tau-Pathologie, Inflammation sowie neuronale Funktion involviert sind, nach 24-stündiger Behandlung humaner Neuroblastomzellen mit $100 \mu\text{M}$ der analysierten Xanthinderivate im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle unterschiedlich durch die verschiedenen Methylxanthine reguliert wird (Abbildung 46 A). Im Säulendiagramm wurde die Anzahl an signifikant hoch- oder runterregulierten Genen abhängig der analysierten Methylxanthine dargestellt und es wurde deutlich, dass es signifikante Unterschiede in den Verteilungsmustern, speziell für Koffein, gab (Abbildung 46 B). Folgend wurde mit Hilfe von multivariaten Verfahren deutlich, dass Koffein im Vergleich zu den weiteren Xanthinderivaten unterschiedliche und teilweise inverse Effekte auf die Genregulierung bedingt.

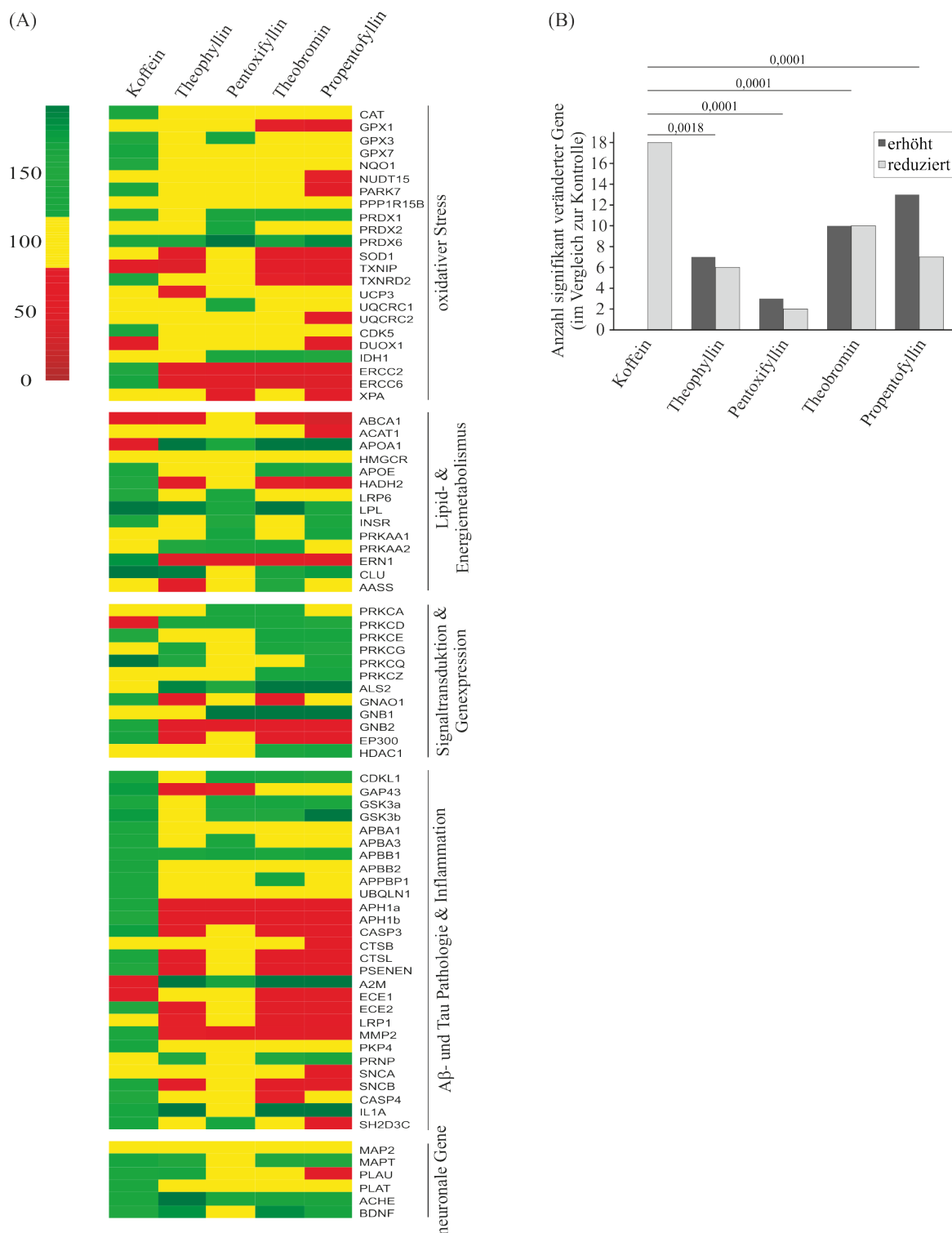


Abbildung 46: Methylxanthine beeinflussen die Expression Alzheimer-relevanter Gene. (A) Transkriptionelle Veränderungen von Genen, die unterschiedlichen Signalwegen, wie oxidativem Stress, Lipid- und Energiemetabolismus, Signaltransduktion, Genexpression, β - und Tau-Pathologie und Inflammation, zugeordnet werden können, nach 24-stündiger Behandlung von SH-SY5Y-WT-Zellen mit 100 μ M der Xanthinderivate Koffein, Theophyllin, Pentoxifyllin, Theobromin oder Propentofyllin im Vergleich zu Lösungsmittelkontrolle-inkubierten Zellen dargestellt als Heatmap. (B) Säulendiagramm zur Darstellung der Anzahl an signifikant veränderten Genen durch die einzelnen Methylxanthine. Die statistische Signifikanz wurde mittels ANOVA und folgendem Dunnett's Post-Hoc-Test berechnet. Abbildung verändert nach (JANITSCHKE et al., 2020).

Die dritte Studie befasste sich mit der Aufklärung der Fragestellung, ob Methylxanthine, für die bereits Einflüsse auf Triglyzerid- und Cholesterin-Spiegeln beobachtet wurden, in der Lage sind, die Homöostase derjenigen Lipidklassen zu verändern, welche für die Entstehung und Progression der Alzheimererkrankung relevant sind. Der Anteil der Autorin der vorliegenden Arbeit an dieser Studie umfasste die Auswertung der generierten *Shotgun Lipidomics*-Daten in Kooperation mit Daniel Janitschke sowie die Erstellung der Abbildungen und die Mitwirkung bei der Anfertigung des Manuskriptes. Die in den beiden Neuroblastomzelllinien N2a (muriner Ursprung) und SH-SY5Y (humaner Ursprung) generierten Ergebnisse wiesen auf zusätzliche Einflüsse der analysierten Xanthinderivate Koffein, Theobromin, Theophyllin, Pentoxifyllin und Propentofyllin auf die Lipidklassen Sphingomyeline, Ceramide, Phosphatidylcholine und Plasmalogene hin. Diese resultierten zum einen in positiven Effekten hinsichtlich der Alzheimerpathologie, aber auch in gegenteiligen Effekten, die nicht zu vernachlässigen sind, und unterstreichen damit die Komplexität des Zusammenhangs zwischen Methylxanthinen und der Alzheimererkrankung. Zu den unerwünschten Effekten hinsichtlich der neurodegenerativen Alzheimererkrankung zählen beispielsweise der durch die beiden synthetischen Xanthinderivate Propentofyllin und Pentoxifyllin mediierte Rückgang in denjenigen Plasmalogenspezies, die die ω -3 Fettsäuren EPA und DHA enthalten können. Demgegenüber bewirken diese beiden Methylxanthine einen Anstieg in dem Verhältnis Gesamt-PCae/Gesamt-PCaa, was eine positive Wirkung hinsichtlich derjenigen Alzheimermechanismen andeutet, die mit oxidativem Stress assoziiert sind. Darüber hinaus wurden nach Inkubation der in die Studie inkludierten Xanthinderivate erhöhte Sphingomyelin- und reduzierte Lyso-PC-Spiegel in den neuronalen Zellen detektiert, die als positive Aspekte hinsichtlich der Alzheimerpathologie angesehen werden können.

Auf Grund der moderaten Effektstärken können Methylxanthine zwar nicht als alleinige Präventions- oder Behandlungsstrategie für die Alzheimererkrankung angesehen werden, nichtsdestotrotz sollten sie auf Grund ihrer pleiotropen positiven Einflüsse auf die APP-Prozessierung in eine gesunde Ernährungsweise integriert werden. Außerdem scheinen einzelne Methylxanthine, wie Koffein beispielsweise, einzigartige Wirkungsmuster vor allem auf genregulatorischer Ebene zu medieren. Hinsichtlich der Einflüsse der analysierten Xanthinderivate Koffein, Theobromin, Theophyllin, Pentoxifyllin und Propentofyllin auf die Homöostase Alzheimer-relevanter Lipide konnten sowohl positive als auch zu vermeidende Effekte ausgemacht werden, die den kombinierten Einsatz von Methylxanthinen und einer den Lipidmetabolismus positiv beeinflussenden Ernährung, die sich beispielsweise durch eine hohe Aufnahme langkettiger ungesättigter Fettsäuren auszeichnen könnte, empfehlen. Zusammenfassend bieten die auf Zellkulturebene beobachteten positiven Effekte natürlicher und synthetischer Methylxanthine auf die Alzheimer-relevante Lipidhomöostase sowie die molekularen Mechanismen der A β -Bildung eine Grundlage für weitere *in vivo* Studien, um das präventive und potenziell therapeutische Potenzial von Xanthinderivaten hinsichtlich neurodegenerativer Erkrankungen umfassender beurteilen zu können.

4.5.2 Der Einfluss von Capsaicinoiden auf die APP-Prozessierung in SH-SY5Y-Zellen

Die Ergebnisse der folgend vorgestellten Studie, die den Einfluss von Capsaicinoiden auf die Prozessierung von APP analysierte, sind in *Scientific Reports* (Nature Research-Verlag, Impact Factor dieser Fachzeitschrift Stand September 2022: 4,380) veröffentlicht:

Grimm MOW*, Blümel T*, **Lauer AA**, Janitschke D, Stahlmann C, Mett J, Hauptenthal VJ, Miederer AM, Niemeyer BA, Grimm HS, Hartmann T. *The impact of capsaicinoids on APP processing in Alzheimer's disease in SH-SY5Y cells*. Sci Rep. 2020 Jun 8;10(1):9164. doi: 10.1038/s41598-020-66009-6. PMID: 32514053; PMCID: PMC7280252. *diese Autoren haben gleichermaßen zu dieser Publikation beigetragen

Bei Capsaicin handelt es sich um den primären und natürlich vorkommenden Inhaltsstoff von *Capsicum* Spezies, der für die Schärfe von Chilischoten verantwortlich ist und strukturell zu der chemischen Gruppe der Vanilloide gehört (CORDELL, ARAUJO, 1993). Neben Capsaicin stellt Dihydrocapsaicin den zweithäufigsten Vertreter der Capsaicinoide dar und wurde aus diesem Grund, ebenso wie eine natürlich vorkommende Mischung, in die systematische Analyse potenzieller Effekte auf die Alzheimerpathologie inkludiert. Grundlage für diese Studie bilden die pleiotropen pharmakologischen und physiologischen Aktivitäten, die für Capsaicinoide beschrieben wurden, sowie deren weitverbreiteter Konsum als Ernährungskomponente (CHAUDHARY et al., 2022; ZHANG et al., 2020). So stellt beispielsweise Capsaicin einen hochselektiven Agonisten des Transienten Rezeptor-Potential-Kationenkanals der Unterfamilie V(anilloid) Subtyp 1 (TRPV1) dar, dessen Aktivierung im zentralen Nervensystem unter anderem in die synaptische Plastizität oder auch die hippocampale Gedächtnisfunktion involviert ist (KAUER, GIBSON, 2009). Neben positiven Effekten von Capsaicin hinsichtlich oxidativem Stress oder der Tau-Pathologie ist bisher wenig über eine potenzielle Beeinflussung der APP-Prozessierung bekannt, weshalb diese Gegenstand der folgend vorgestellten Studie war.

Basierend auf den initialen Erkenntnissen, dass die 24-stündige Behandlung von Neuroblastomzellen mit 10 μ M der Capsaicinoide in einem erhöhten A β -Proteingehalt einhergehend mit erhöhten Proteinmengen an sAPP β und β -CTF resultierte, analysierte die Autorin der vorliegenden Arbeit in Kooperation mit Dr. Heike S. Grimm den BACE1-Proteingehalt nach Inkubation mit Capsaicin, welcher signifikant erhöht war (Abbildung 47 A). Darüber hinaus adressierte sie die γ -Sekretase-Aktivität in Capsaicin-behandelten Zellen und detektierte eine signifikante Zunahme (Abbildung 47 B), die einhergehend mit einer gesteigerten Genexpression sowie einem Wechsel der Lokalisierung von Presenilin von Nicht-Raft in Raft-Membrandomänen war. Die in SH-SY5Y-Zellen beobachteten Erhöhungen in den Aktivitäten der β - und γ -Sekretasen wurden durch die von ihr durchgeführten Analysen in HEK- und N2a-Zellen bestätigt, da die Behandlung mit der natürlichen Capsaicinoid-Mischung dort ebenfalls in gesteigerten pro-amyloidenen Aktivitäten resultierte (Abbildung 47 C). Neben der gesteigerten A β -Generierung wurde eine beeinträchtigte A β -Degradation detektiert, welche auf eine signifikant reduzierte IDE-Aktivität nach Inkubation mit der natürlichen Capsaicinoid-Mischung zurückgeführt werden konnte (Abbildung 47 D).

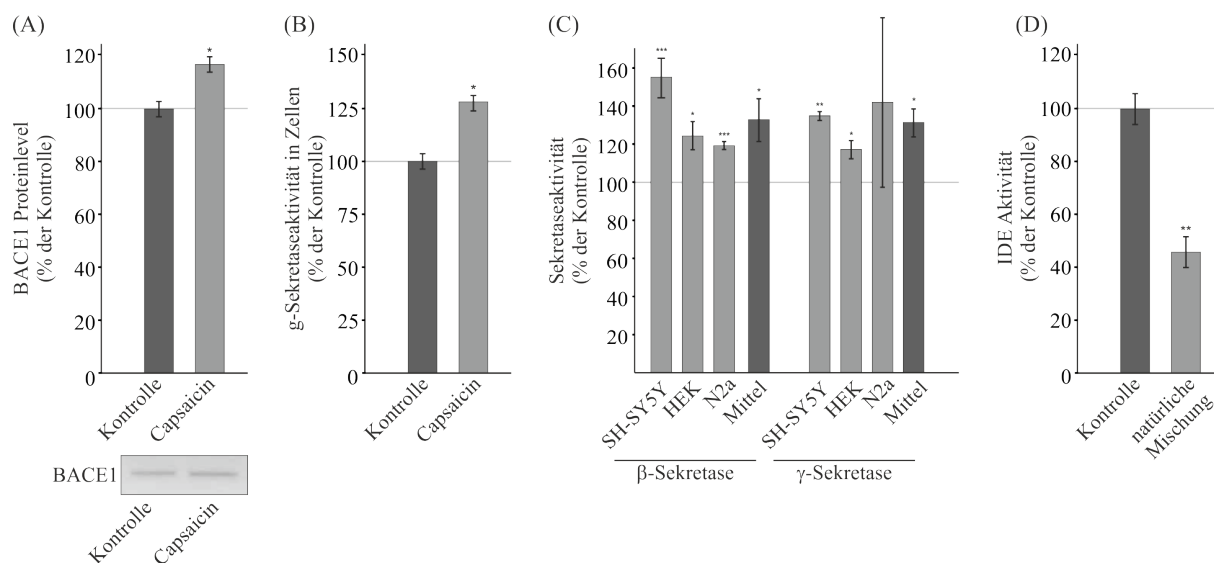


Abbildung 47: Der Einfluss von Capsaicinoiden auf die an der amyloidogenen APP-Prozessierung beteiligten Sekretasen sowie auf das Aβ-degradierende Enzym IDE. (A) BACE1-Proteinlevel in SH-SY5Y-APP⁶⁹⁵-Zellen nach Inkubation mit Capsaicin, experimentell adressiert mittels Western Blot-Analyse ($n \geq 3$). (B) Aktivität der γ -Sekretase in Capsaicin-behandelten SH-SY5Y-WT-Zellen ($n \geq 9$). (C) Effekt der natürlichen Mischung auf die A β -Degradation. Analyse der IDE-Aktivität in N2a-Zellen, die mit der natürlichen Mischung inkubiert wurden ($n = 6$). (D) Einzelne und durchschnittliche Aktivitäten der β - und γ -Sekretase in SH-SY5Y-, HEK- und N2a-Zellen ($n \geq 5$). Die Kontrollbedingungen wurden auf 100 % gesetzt und als Linie im Säulendiagramm dargestellt. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Sterne stellen die statistische Signifikanz, die mittels ungepaartem Student-t-Test berechnet wurde, dar, wobei * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$ gelten. Abbildung verändert nach (GRIMM et al., 2020).

Zusammenfassend lieferten diese Ergebnisse Hinweise darauf, dass neben zahlreichen positiven Effekten, die für Capsaicinoide beschrieben wurden, hinsichtlich der APP-Pathologie im Rahmen der Alzheimererkrankung durch pro-amyloidogene Eigenschaften dieser Substanzklasse ein therapeutischer Einsatz auf der zellulären Evidenzstufe abgelehnt werden sollte.

4.5.3 Spleißvarianten von STIM1 und die Alzheimererkrankung

Das folgende Kapitel befasst sich mit einer Studie, die sich mit der Charakterisierung einer kurzen, neuronal spezifischen Isoform des Proteins Stroma-Interaktionsmolekül 1 (*stromal interaction molecule 1*, STIM1) beschäftigt und welche in *Cell Reports* (Cell Press-Verlag, Impact Factor dieser Fachzeitschrift Stand September 2022: 9,423) veröffentlicht wurde:

Ramesh G*, Jarzembowski L*, Schwarz Y*, Poth V, Konrad M, Knapp ML, Schwär G, Lauer AA, Grimm MOW, Alansary D, Bruns D, Niemeyer BA. *A short isoform of STIM1 confers frequency-dependent synaptic enhancement*. Cell Rep. 2021 Mar 16;34(11):108844. doi: 10.1016/j.celrep.2021.108844. PMID: 33730587. *diese Autoren haben gleichermaßen zu dieser Publikation beigetragen

STIM-Proteine sind im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert und für die Erfassung des Kalziumgehaltes sowie die Vermittlung des Kalziumeinstroms über die Öffnung hochselektiver ORAI-Kanäle zuständig. Dieser Prozess wird als speichergesteuerter Kalziumeinstrom (*store-operated Ca²⁺-entry*, SOCE) bezeichnet und verbindet die Kalziumdepletion im Endoplasmatischen Retikulum mit dessen Wiedereintritt (PRAKRIYA, LEWIS, 2015). Während bekannt ist, dass STIM1 eine wichtige Rolle in Immunzellen spielt, ist über eine potenzielle Rolle in der neuronalen Kalziumhomöostase bisher wenig bekannt. In der hier kurz vorgestellten Studie wurde basierend darauf die Neuronen-spezifische *STIM1*-Spleißvariante *STIM1B* charakterisiert, deren Proteingehalt im Kleinhirn über den von *STIM1* hinausgeht. Der experimentelle Anteil der Autorin der vorliegenden Arbeit an dieser Studie umfasste die Transkriptionsanalyse von *STIM1*-Spleißvarianten in *post mortem* Hirnproben von Patienten mit der familiären und sporadischen Form der Alzheimererkrankung. In Abbildung 48 wird ersichtlich, dass der relative Anteil an gespleißtem *STIM1B* im Vergleich zur Expression von *STIM1* sowohl in familiären als auch sporadischen Alzheimerfällen signifikant reduziert war. Dies könnte auf eine abweichende Regulierung des Spleißens von *STIM1* im Rahmen der Alzheimerpathologie hindeuten.

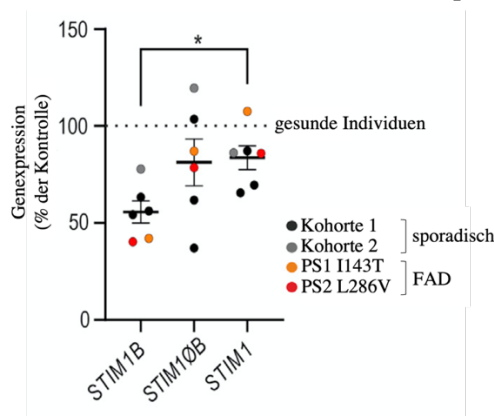


Abbildung 48: Transkriptionsanalyse verschiedener *STIM1*-Spleißvarianten in *post mortem* Hirnproben von Alzheimerpatienten. Dargestellt ist die relative Expression von *STIM1B*, *Nicht-B* und Gesamt-*STIM1* in Hirnproben von familiären (PS1 I143T und PS2 L286V) und sporadischen Alzheimerpatienten im Vergleich zu gesunden altersentsprechenden Individuen (85 gesunde Individuen und 175 Alzheimerpatienten). Sterne stellen die statistische Signifikanz dar, wobei $*p \leq 0,05$ gilt. Die statistische Signifikanz wurde mittels ANOVA und folgendem Tukey-HSD-Post-Hoc-Test berechnet. Abbildung verändert nach (RAMESH et al., 2021).

Gemeinsam mit den weiteren Erkenntnissen dieser Studie, welche beispielsweise verdeutlichten, dass *STIM1B* selektiv auf das präsynaptische Endoplasmatische Retikulum abzielt, trägt die Detektion des alternativen *STIM1*-Spleißens in der Alzheimererkrankung dazu bei, dass das Spleißen von *STIM1* als wichtiger regulatorischer Faktor in der neuronalen Kalziumhomöostase und der synaptischen Plastizität angesehen werden kann.

4.5.4 *Lipidomics*-Analyse der Mitochondrien eines zellulären Alzheimer Modells

Die folgend vorgestellte Studie führte eine gezielte *Lipidomics*-Analyse von Mitochondrien in einem zellulären Modell der Alzheimererkrankung durch und wurde in *biomedicines* (MDPI-Verlag, *Impact Factor* dieser Fachzeitschrift Stand September 2022: 4,757) veröffentlicht:

Kurokin I*, Lauer AA*, Janitschke D*, Winkler J, Theiss EL, Griebisch LV, Pilz SM, Matschke V, van der Laan M, Grimm HS, Hartmann T, Grimm MOW. *Targeted Lipidomics of Mitochondria in a Cellular Alzheimer's Disease Model*. *Biomedicines*. 2021 Aug 21;9(8):1062. doi: 10.3390/biomedicines9081062. PMID: 34440266. *diese Autoren haben gleichermaßen zu dieser Publikation beigetragen

Hinsichtlich der molekularen Mechanismen der Pathophysiologie der Alzheimererkrankung rückt die mitochondriale Funktion derzeit immer weiter in den Fokus. Basierend darauf, dass ein Zusammenhang zwischen der Alzheimererkrankung und der Lipidhomöostase existiert, aber bisher nicht ausreichend über mögliche Veränderungen in der Lipidkomposition der Mitochondrien bekannt ist, war das Ziel dieser Studie die Analyse potenzieller Veränderungen der mitochondrialen Lipidklassen PC und PE sowie deren korrespondierender Plasmalogene in einem zellulären Alzheimermodell (SH-SY5Y-APP^{sw}) im Vergleich zu SH-SY5Y-Zellen, die mit einem Kontrollplasmid transfiziert wurden. Diese Änderungen wurden denen, die im selben zellulären Vergleich in den Zellhomogenaten detektiert wurden, gegenübergestellt. Der experimentelle Anteil der Autorin der vorliegenden Arbeit belief sich im Rahmen dieser Studie auf die Durchführung sowie Auswertung der *Lipidomics*-Analyse mit Fokus auf der detaillierteren Analyse der einzelnen Lipidspezies und den Vergleich der beiden zellulären Alzheimermodelle SH-SY5Y-APP^{sw} und -APP^{wt}.

Die initiale Betrachtung der Gesamtheit an 226 Lipidspezies, die in dieser Studie analysiert wurden, verdeutlichte, dass Lipidveränderungen im Vergleich SH-SY5Y-APP^{sw} und Kontroll-transfizierten SH-SY5Y-Zellen existieren, die spezifisch für Mitochondrien sind und nicht aus der Analyse der Gesamt-Zellhomogenate vorhergesagt werden können (Abbildung 49 A).

Eine detailliertere Analyse der einzelnen Lipidspezies zeigte auf, dass speziell Lipide, die drei- oder vierfach ungesättigte Fettsäuren, wie beispielsweise Arachidonsäure, enthalten und überwiegend ω -6 Fettsäuren repräsentieren, in Mitochondrien von SH-SY5Y-APP^{sw}-Zellen erhöht waren. Dem gegenüber waren die Spezies, die fünf- oder sechsfach ungesättigte Fettsäuren, wie beispielsweise die ω -3 Fettsäuren EPA oder DHA, enthalten, in mitochondrialen Proben dieses zellulären Alzheimermodells reduziert (Abbildung 49 B, oben und unten). Die beobachteten Veränderungen im Lipidmetabolismus wurden von Änderungen im Carnitin-*Carrier*-System in den Homogenat-Proben begleitet, was eine veränderte mitochondriale Funktionalität in APP^{sw}-Zellen im Vergleich zu Kontroll-transfizierten Zellen andeutet (Abbildung 49 C).

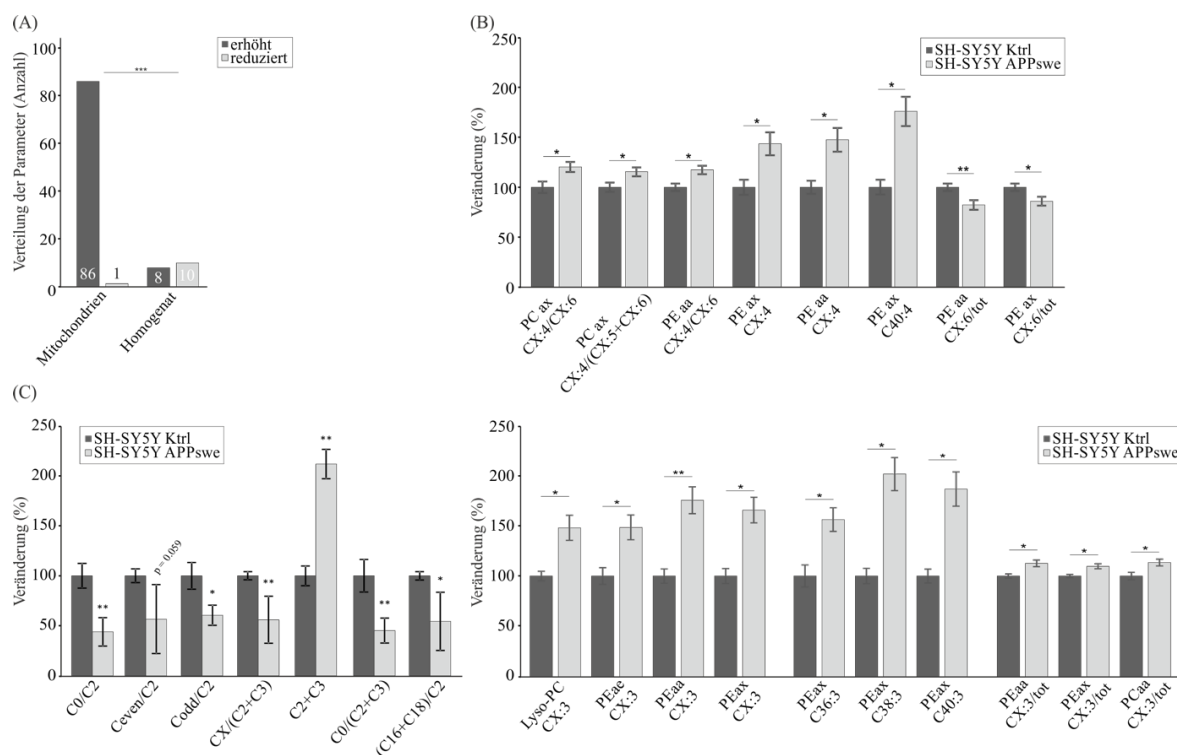


Abbildung 49: Lipidveränderungen in Homogenaten und Mitochondrien von SH-SY5Y-APPswe-Zellen im Vergleich zu Kontroll-transfizierten SH-SY5Y-Zellen. (A) Verteilung derjenigen Lipidspezies mit einer Effektstärke größer des durchschnittlichen Standardfehlers und einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ dargestellt als Anzahl der reduzierten oder erhöhten Lipidspezies in Homogenaten und Mitochondrien von SH-SY5Y-APPswe-Zellen im Vergleich zu Kontroll-transfizierten SH-SY5Y-Zellen im Säulendiagramm. Der Exakte Fisher-Test wurde zur Berechnung der statistischen Signifikanz herangezogen ($*** p \leq 0,001$). (B) Prozessierte Daten der Mitochondrien. Relative Veränderungen der ω -6/ ω -3-Verhältnisse der analysierten Phospholipid-Spezies in SH-SY5Y-APPswe-Zellen verglichen mit Kontroll-transfizierten Zellen (oben). Relative Veränderungen verschiedener dreifach-ungesättigter Phospholipide in SH-SY5Y-APPswe-Zellen verglichen mit Kontroll-transfizierten Zellen (unten). (C) Analyse der Carnitinspiegel in Homogenaten von SH-SY5Y-APPswe-Zellen verglichen mit Kontroll-transfizierten Zellen in Form unterschiedlicher Verhältnisse. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Sterne stellen die statistische Signifikanz, die mittels ungepaartem Student-t-Test berechnet wurde, dar, wobei $*p \leq 0,05$ und $**p \leq 0,01$ gelten. Abbildung verändert nach (KUROKIN et al., 2021).

Hinsichtlich der PE-Plasmalogene wurde im Rahmen der *Lipidomics*-Analyse eine Erhöhung in den Mitochondrien im Vergleich zu Homogenaten von SH-SY5Y-APPswe-Zellen detektiert (Abbildung 50 A). Die vorliegenden Daten der mitochondrialen Fraktionen konnten darüber hinaus in einem zweiten zellulären Alzheimermodell, in welchem WT-APP überexprimiert wurde (SH-SY5Y-APPwt), verifiziert werden. Der Unterschied zwischen beiden APP-Formen besteht darin, dass APPswe hauptsächlich amyloidogen durch die β -Sekretase prozessiert wird, während APPwt sowohl amyloidogen als auch nicht-amyloidogen prozessiert werden kann (CITRON et al., 1992). Neben einigen Ähnlichkeiten wurden gerade in Bezug auf die PE-Spezies Unterschiede ausgemacht. Während APPswe-transfizierte SH-SY5Y-Zellen einen Anstieg in den PE-Spezies aufzeigten, waren die PE-Spiegel in APPwt-transfizierten Zellen überwiegend reduziert oder unverändert (Abbildung 50 B). Dies lässt vermuten, dass Änderungen in der APP-Prozessierung spezifische Veränderungen in der Lipidhomöostase von Mitochondrien bedingen könnten. Genau diese, durch amyloidogene oder nicht-amyloidogene Prozesse bedingten, Unterschiede sollten in weiteren Studien detailliert analysiert werden.

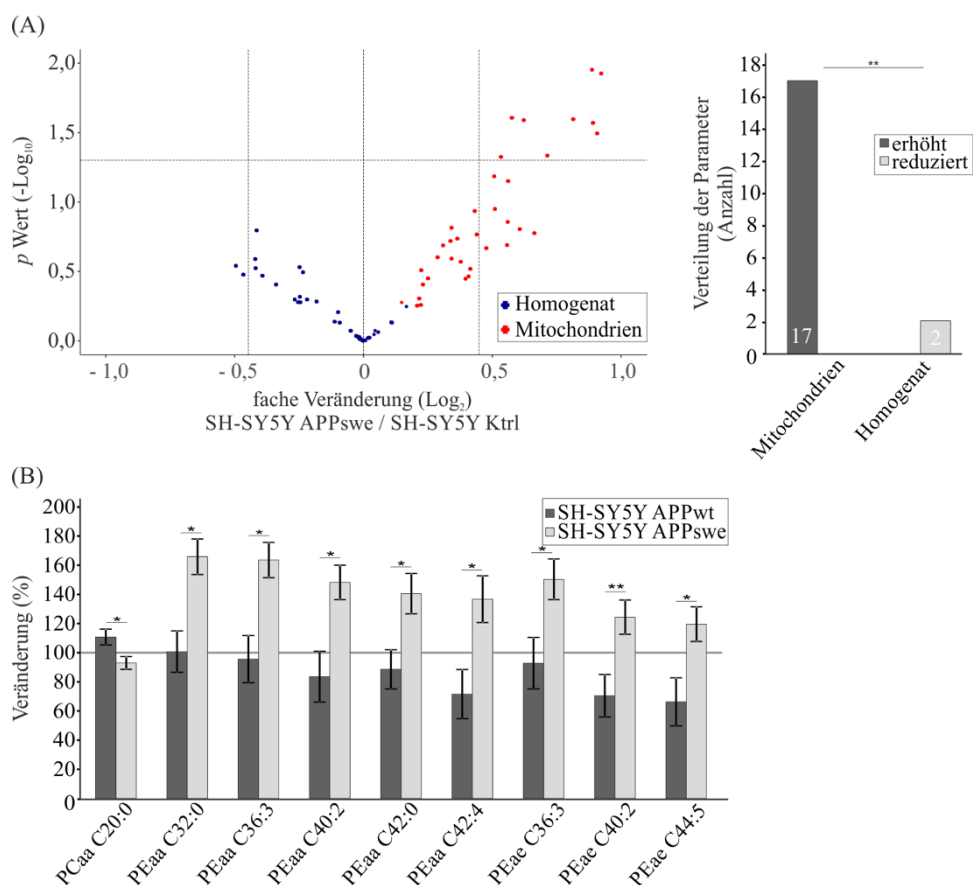


Abbildung 50: Veränderte Phosphatidylethanolamin- (PE-) Spiegel in Mitochondrien von APP_{swe}- gegenüber APP_{wt}-Zellen. (A) Änderungen der einzelnen PE-Plasmalogen- (PEae-) Spezies in Homogenaten und Mitochondrien von SH-SY5Y-APP_{swe}-Zellen im Vergleich zu Kontroll-transfizierten SH-SY5Y-Zellen, dargestellt als Volcano Plot (links). Das Ergebnis der korrespondierenden Verteilungsanalyse ist dem nebenstehenden Säulendiagramm zu entnehmen. Die vertikalen Linien repräsentieren den durchschnittlichen Standardfehler und die horizontale Linie markiert ein Signifikanzniveau von $p = 0,05$. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz im Rahmen der Verteilungsanalyse wurde der Exakte Fisher-Test verwendet ($**p \leq 0,01$). (B) Veränderungen der Lipidhomöostase in mitochondrialen Fraktionen von SH-SY5Y-APP_{wt}-Zellen im Vergleich zu APP_{swe}-überexprimierenden Zellen. Die signifikanten Unterschiede in den PEaa- und PEae-Spezies sind als Säulendiagramm dargestellt. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Sterne stellen die statistische Signifikanz, die mittels ungepaartem Student-t-Test berechnet wurde, dar, wobei $*p \leq 0,05$ und $**p \leq 0,01$ gelten. Abbildung verändert nach (KUROKIN et al., 2021).

4.5.5 Der Zusammenhang zwischen PEX19 und der Speicherung von Neutrallipiden

Die Ergebnisse der folgend vorgestellten Studie, die den Zusammenhang zwischen PEX19 und der Speicherung von Neutrallipiden analysierte, sind in *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Frontiers-Verlag, *Impact Factor* dieser Fachzeitschrift Stand September 2022: 6,684) veröffentlicht:

Lyschik S*, Lauer AA*, Roth T, Janitschke D, Hollander M, Will T, Hartmann T, Kopito RR, Helms V, Grimm MOW*, Schrul B*. PEX19 Coordinates Neutral Lipid Storage in Cells in a Peroxisome-Independent Fashion. *Front Cell Dev Biol.* 2022 Apr 26;10:859052. doi: 10.3389/fcell.2022.859052. PMID: 35557938; PMCID: PMC9086359. *diese Autoren haben gleichermaßen zu dieser Publikation beigetragen

Bei dem Peroxin-Protein PEX19 handelt es sich um einen für den zellulären Lipidmetabolismus wichtigen peroxisomalen Biogenesefaktor, der in der Lage ist, Membranproteine selektiv zu den Peroxisomen zu dirigieren (HUA, KIM, 2016). Darüber hinaus ist PEX19 in die korrekte Insertion von Endoplasmatisches Retikulum- oder Lipidtropfen-assoziierten Proteinen in die entsprechenden Membranen involviert (SCHRUL, KOPITO, 2016). Beeinträchtigungen der Funktion von Peroxisomen, in welchen beispielsweise die Synthese von Ether-Phospholipiden oder die Oxidation sehr langkettiger Fettsäuren stattfindet, können sich klinisch unter anderem im Zellweger-Syndrom äußern und betroffene Patienten tragen häufig Mutationen in PEX-Proteinen (WANDERS et al., 2015). Der experimentelle Anteil der Autorin der vorliegenden Arbeit an der Studie, die eine potenzielle Rolle des PEX19-vermittelten Proteintransports zum Endoplasmatischen Retikulum und Lipidtropfen in der Regulierung der Speicherung von Neutrallipiden analysierte, umfasste die Mitwirkung an der Lipidanalytik mittels *Shotgun Lipidomics*-Ansatz, deren Ergebnisse im Folgenden kurz vorgestellt werden.

Um die Funktionen von PEX19 im Metabolismus von Neutrallipiden näher zu charakterisieren, wurden neben einer HeLa-Kyoto-WT-Zelllinie eine mittels CRISPR-Cas9-Methode generierte PEX19-defiziente Zelllinie desselben Ursprungs (PEX19^{-/-}-Zellen) sowie eine auf Hintergrund der PEX19^{-/-}-Zelllinie generierte Zelllinie mit stabiler Expression einer nicht-farnesylierten PEX19_{C296S}-Mutante (PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zellen) herangezogen (SCHRUL, KOPITO, 2016). Diese post-translationale Modifizierung richtet sich an das Cystein C296 innerhalb des CAAX-Motives am C-Terminus von PEX19 und es wurde beschrieben, dass diese Mutation in PEX19-defizienten Zellen, denen Peroxisomen fehlen, eine Wiederherstellung der peroxisomalen Biogenese bedingt (SCHRUL, KOPITO, 2016; VASTIAU et al., 2006) und somit wahrscheinlich die Peroxisomen-assoziierten Funktionen von PEX19 Farnesylierungs-unabhängig sind. Für den ER-/Lipidtropfen-gerichteten Proteintransport von UBXD8 hingegen ist eine WT-farnesylierte PEX19-Form notwendig (SCHRUL, KOPITO, 2016).

In der *Shotgun Lipidomics*-Analyse wurden Zellhomogenate der beiden genannten PEX19-Zelllinien mit denen von WT-Zellen verglichen. Eine erste Charakterisierung des Lipidomes, abgebildet durch 170 verschiedene Lipidspezies aus unterschiedlichen Lipidklassen, verdeutlichte, dass in der Gegenüberstellung von PEX19^{-/-}-Zellen zu WT-Zellen eine größere Anzahl an Lipidspezies signifikant verändert war im Vergleich zu der Gegenüberstellung von PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zellen zu WT-Zellen (Abbildung 51). Dies könnte darauf hinweisen, dass die Expression der nicht-farnesylierten PEX19-Variante in der Lage ist, einen Teil der PEX19-abhängigen Lipidprofilveränderungen wiederherzustellen.

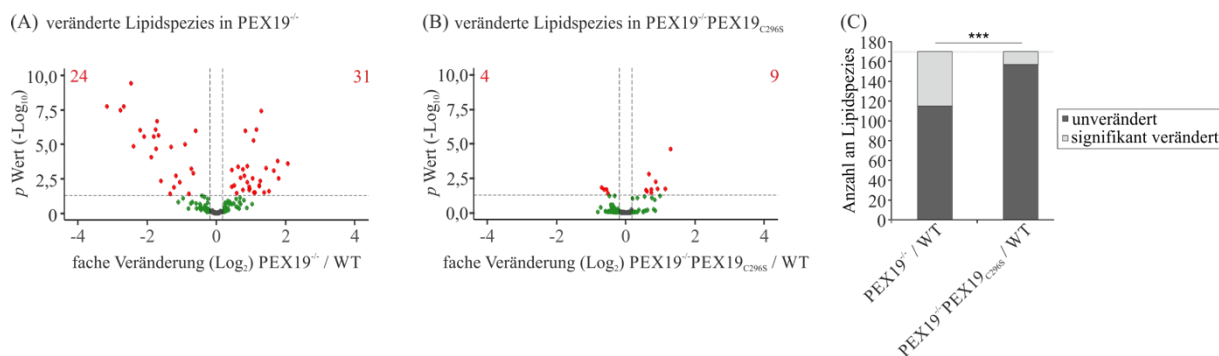


Abbildung 51: Veränderungen des Lipidmetabolismus in PEX19^{-/-}- und PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zellen verglichen mit WT-Zellen. (A) Die *Shotgun Lipidomics*-Analyse von 170 unterschiedlichen Lipidspezies in PEX19^{-/-}-Zellen im Vergleich zu WT-Zellen resultierte in 24 signifikant reduzierten und 31 signifikant erhöhten Lipidspezies. (B) Die *Shotgun Lipidomics*-Analyse von 170 unterschiedlichen Lipidspezies in PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zellen im Vergleich zu WT-Zellen resultierte in vier signifikant reduzierten und neun signifikant erhöhten Lipidspezies. (C) Die im Säulendiagramm dargestellten Anzahlen an unverändert und signifikant veränderten Lipidspezies unterschieden sich signifikant zwischen PEX19^{-/-}-Zellen und PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zellen im jeweiligen Vergleich zu WT-Zellen, was der aus dem Chi-Quadrat-Test resultierende p-Wert bestätigte ($p \leq 0,001$; $n = 11$ pro Zelllinie). Abbildung verändert nach (LYSCHIK et al., 2022).

Um zu analysieren, ob diejenigen Peroxisomen, welche durch Expression von PEX19_{C296S} auf PEX19^{-/-} Hintergrund wiederhergestellt werden können, funktionell aktiv sind, wurden die Spiegel an Phosphatidylcholinen (PCaa) und deren Etherlipiden (Plasmalogene; PCae) in den drei Zelllinien mittels *Shotgun Lipidomics*-Analyse bestimmt. Die resultierenden Ergebnisse wiesen darauf hin, dass die Expression von PEX19_{C296S} in PEX19^{-/-}-Zellen in der Lage ist, die peroxisomale β -Oxidation sehr langkettiger Fettsäuren sowie die Synthese von Etherlipiden wiederzuerstellen (Abbildung 52).

Hinsichtlich der PCaa-Spezies wurden keine Unterschiede in den Gesamtspiegeln der analysierten PCaa-Spezies zwischen den drei Zelllinien detektiert (Abbildung 52 A). Bei Betrachtung einzelner Untergruppen wurde deutlich, dass die im Vergleich PEX19^{-/-} zu WT-Zellen beobachtete Akkumulation von PCaa-Spezies mit einer Kettenlänge ab 40 Kohlenstoffatomen ($\geq 40:X$) in der Gegenüberstellung PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} nicht mehr vorhanden war (Abbildung 52 B-D). Dies verdeutlichte, dass die Expression der nicht-farnesylierten PEX19-Variante in der Wiederherstellung von funktionellen Peroxisomen resultiert, in denen die β -Oxidation sehr langkettiger Fettsäuren stattfinden kann.

Einhergehend mit der zweiten wichtigen Funktion von Peroxisomen, der Synthese von Etherlipiden, waren die Gesamtspiegel an PCae in PEX19^{-/-}-Zellen im Vergleich zu WT-Zellen signifikant reduziert (Abbildung 52 G). Ähnlich zu der peroxisomalen Oxidation sehr langkettiger Fettsäuren resultierte die Expression von PEX19_{C296S} in einer partiellen Wiederherstellung der Etherlipidsynthese, was sich durch signifikant erhöhte Gesamt-PCae-Spiegel in PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zellen im Vergleich zu PEX19^{-/-}-Zellen äußerte (Abbildung 52 G-I).

Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass die Farnesylierung von PEX19 für die peroxisomale Biogenese und Funktion nicht essenziell zu sein scheint.

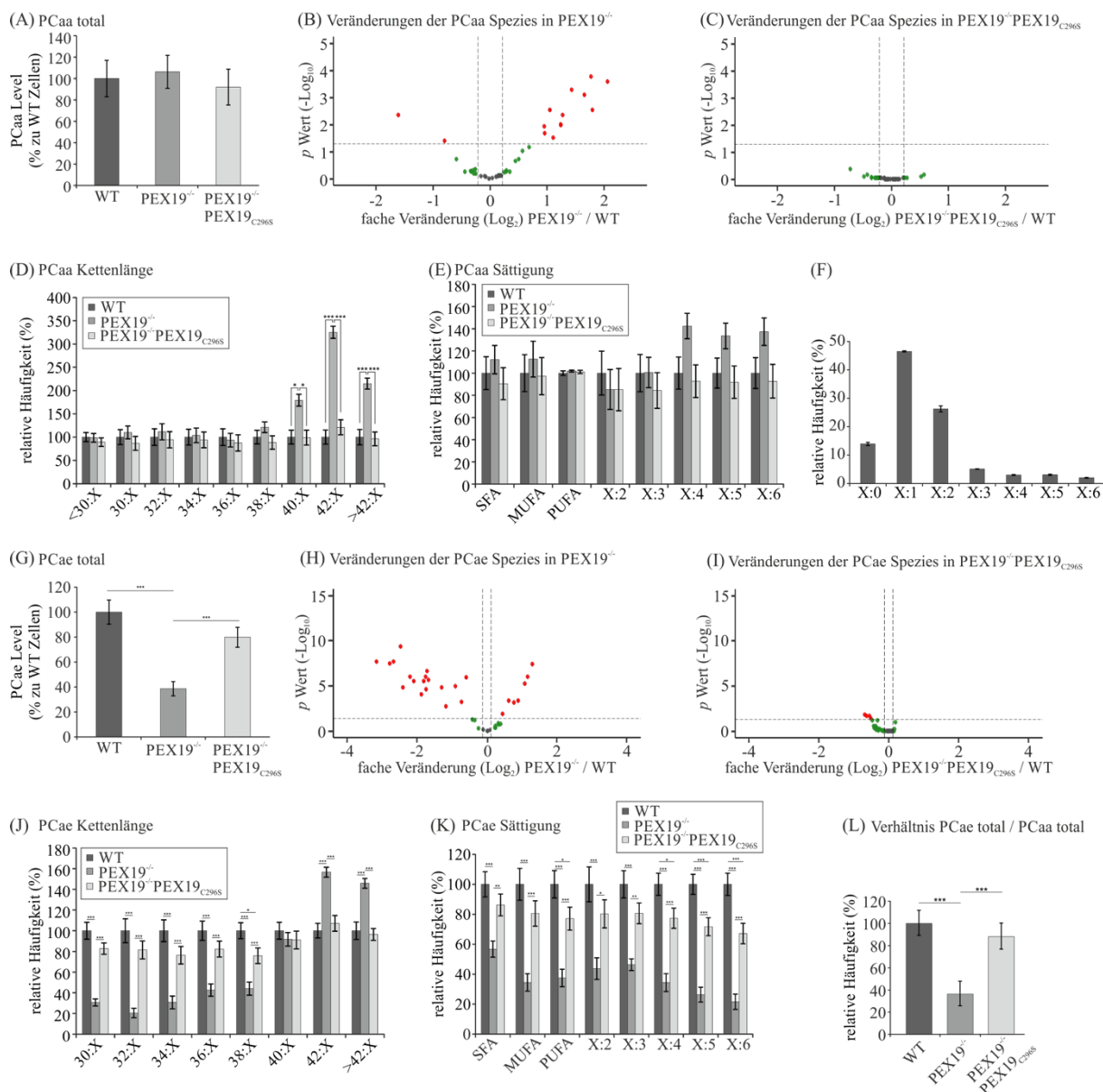


Abbildung 52: Lipidomics-Analyse der Spiegel an PCaa- und PCae-Spezies in PEX19^{-/-}- und PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zellen verglichen mit HeLa-Kyoto-WT-Zellen. (A) Relative Gesamt-PCaa-Menge in WT-, PEX19^{-/-}- und PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zellen, für die mittels ANOVA-Analyse kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Zelllinien detektiert wurde. (B-C) Volcano Plots, welche die Veränderungen der einzelnen 43 analysierten PCaa-Spezies im Vergleich PEX19^{-/-} zu WT und PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} zu WT visualisieren. (D) Relativer Vergleich der PCaa-Spezies hinsichtlich der Kettenlänge ihrer gebundenen Fettsäuren. (E) Relativer Vergleich der PCaa-Spezies hinsichtlich des Sättigungsgrades der gebundenen Fettsäuren. (F) Relative Häufigkeiten der einzelnen Sättigungsgrade (X:0 bis X:6) innerhalb der analysierten PCaa-Spezies. (G-K) *Shotgun Lipidomics*-Analyse von 39 PCae-Spezies in WT-, PEX19^{-/-}- und PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zellen. Die Darstellungen sind analog zu (A-E). (L) Analyse der relativen Häufigkeiten des Verhältnisses zwischen der Gesamtmenge an PCae und PCaa in PEX19^{-/-}- und PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zellen verglichen mit WT-Zellen. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Sterne stellen die statistische Signifikanz dar, wobei * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$ gelten. Die im Volcano Plot dargestellten Signifikanzwerte wurden mittels ungepaartem Student-t-Test berechnet, während die statistische Analyse der Gesamt-Lipid-Vergleiche zwischen den drei analysierten Zelllinien mittels ANOVA und folgendem Post-Hoc-Test durchgeführt wurde ($n = 11$ pro Zelllinie). Abbildung verändert nach (LYSCHIK et al., 2022).

Die in dieser Studie der *Lipidomics*-Analyse vorausgegangene Anfärbung von Neutrallipiden resultierte in der Detektion einer Akkumulierung von Lipidtropfen in PEX19^{-/-}- und PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zellen im Vergleich zu HeLa-WT-Zellen (LYSCHIK et al., 2022). Basierend darauf wurde diese Akkumulierung mittels *Shotgun Lipidomics*-Ansatz quantifiziert, was verdeutlichte, dass die TAG-Spiegel in beiden analysierten Zelllinien im Vergleich zu WT-Zellen signifikant um circa 60 % erhöht waren (Abbildung 53 A). Die Betrachtung der einzelnen TAG-Spezies zeigte, dass verglichen mit WT-Zellen in den beiden Zelllinien PEX19^{-/-} und PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} jeweils ähnliche Spezies akkumulierten (C50:0, C50:1, C52:0, C52:1, C54:2; Abbildung 53 B-C). Hinsichtlich der Angleichung der TAG-Spiegel auf das Niveau von WT-Zellen verdeutlichten die Ergebnisse, dass die nicht-farnesylierte PEX19-Variante nicht ausreichte, um diesen Effekt zu vermitteln.

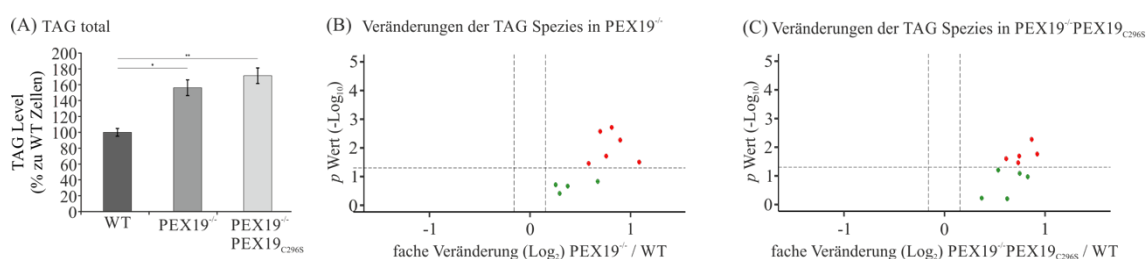


Abbildung 53: Lipidomics-Analyse der Spiegel an TAG-Spezies in PEX19^{-/-}- und PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zellen verglichen mit HeLa-Kyoto-WT-Zellen. (A-C) Analyse der relativen Häufigkeiten von zehn Triacylglyceriden in PEX19^{-/-}- und PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zellen verglichen mit WT-Zellen. Die Darstellungen sind analog zu Abbildung 52 A-C. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Sterne stellen die statistische Signifikanz dar, wobei * $p \leq 0,05$ und ** $p \leq 0,01$ gelten. Die im Volcano Plot dargestellten Signifikanzwerte wurden mittels ungepaartem Student-t-Test berechnet, während die statistische Analyse der Gesamt-Lipid-Vergleiche zwischen den drei analysierten Zelllinien mittels ANOVA und folgendem Post-Hoc-Test durchgeführt wurde ($n = 11$ pro Zelllinie). Abbildung verändert nach (LYSCHIK et al., 2022).

Mögliche Gründe für die erhöhten Mengen an TAG und Lipidtropfen in PEX19^{-/-}-Zellen, bei welchen es sich potenziell um PEX19-spezifische Peroxisomen-unabhängige Effekte handelte, da diese auch in PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zellen detektiert wurden, können eine gesteigerte Lipogenese oder eine reduzierte Lipolyse sein. Zur Analyse der TAG *de novo* Synthese wurden die analysierten Zelllinien WT, PEX19^{-/-} und PEX19^{-/-}PEX19_{C296S} über Nacht mit exogen zugeführtem Oleat (Ölsäure, 18:1) behandelt, welches hauptsächlich in TAG C52:2 aufgenommen wurde (Abbildung 54 A). Wie in Abbildung 54 B ersichtlich, stieg die Menge an TAG C52:2 in WT-Zellen nach der Behandlung mit Oleat stärker an als in den beiden PEX19-Zelllinien, was vermuten ließ, dass die TAG-Synthese in letztgenannten Zelllinien unter diesen Bedingungen beeinträchtigt war. Basierend darauf, dass die TAG-Spiegel im stationären Zustand in PEX19^{-/-}- und PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zellen im Vergleich zu WT-Zellen signifikant erhöht waren (Abbildung 53 A), was sich auch anhand der unterschiedlichen Startpunkte in Abbildung 54 B äußerte, wurde weiterführend untersucht, ob eine maximale Speicherkapazität für TAG in Lipidtropfen existiert. Übereinstimmend wurden nach der Oleatbehandlung vergleichbare TAG C52:2-Spiegel in WT- und PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zellen detektiert, was andeutete, dass PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zellen eine unbeeinträchtigte TAG-Speicherkapazität besitzen und die vermeintlich reduzierte TAG-Synthese einen indirekten Effekt des Erreichens dieser maximalen Speicherkapazität darstellte. Dies wurde zudem anhand des Δ_{norm} -Wertes deutlich, welcher in WT-Zellen 864 und in PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zellen 823 betrug.

Der Δ_{norm} -Wert lag in PEX19^{-/-}-Zellen mit 467 deutlich unter dem der anderen beiden Zelllinien und nach der Oleatbehandlung wurde circa 40 % weniger TAG C52:2 im Vergleich zu WT-Zellen detektiert. Dies deutete an, dass das Defizit an PEX19 eine signifikante Reduzierung der TAG-Synthese unter diesen Bedingungen vermittelte. Ähnliche Beeinträchtigungen in der TAG-Synthese in PEX19^{-/-}-Zellen resultierten aus der Quantifizierung aller zehn analysierten TAG-Spezies (Abbildung 54 D-E), was ausschloss, dass C18:1 in weitere Spezies gebunden wurde. Zusammenfassend wiesen diese Daten darauf hin, dass die Abwesenheit von PEX19 und das damit verbundene Fehlen von Peroxisomen unter anabolen Bedingungen durch exogene Zugabe von Oleat eine reduzierte TAG-Synthese bedingt. Durch die Expression der nicht-farnesylierten Variante PEX19_{C296S} wurde die peroxisomale Funktion unter diesen Bedingungen wiederhergestellt und der Beeinträchtigung im TAG-Anabolismus entgegengewirkt.

Ein Grund für die beobachtete reduzierte TAG *de novo* Synthese in PEX19^{-/-}-Zellen unter anabolen Bedingungen könnte neben einer beeinträchtigten Aufnahme der exogen verabreichten Ölsäure sein, dass diese nicht primär in den TAG-Metabolismus eingeht. Um dies beurteilen zu können, wurden unterschiedliche Carnitinspezies nach Behandlung der drei Zelllinien mit Oleat mittels *Lipidomics*-Ansatz analysiert. Neben Acetyl-Carnitin (C2), welches sowohl in PEX19^{-/-}- als auch in PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zellen im Vergleich zu WT-Zellen signifikant erhöht war, akkumulierte C18:1 in PEX19^{-/-}-Zellen stärker als in PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zellen (Abbildung 54 F). Dies ließ zum einen eine erhöhte β -Oxidation in beiden PEX19-Zelllinien im Vergleich zu WT-Zellen vermuten, da C2 durch die β -Oxidation geradzahligter Fettsäuren entsteht, und zum anderen schien in Abwesenheit von Peroxisomen in PEX19^{-/-}-Zellen mehr Ölsäure in die mitochondriale β -Oxidation transportiert zu werden, was anhand der im Vergleich zu WT- und PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zellen signifikant erhöhten C18:1-Spiegel in PEX19^{-/-}-Zellen deutlich wurde (Abbildung 54 F).

Zusammenfassend konnte ausgeschlossen werden, dass die initial beobachtete Akkumulierung von Lipidtropfen und TAG in PEX19^{-/-}- und PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zellen in einer gesteigerten TAG-Synthese begründet ist, sondern eher mit der Speicherfähigkeit der Neutrallipide zusammenhängen. Zur Analyse einer potenziell zugrundeliegenden reduzierten TAG-Hydrolyse wurden die Zelllinien durch ein Wachstum über Nacht unter 0,1 % FCS und Anwesenheit von Triacsin C, einem selektiven Inhibitor für die Langkettige-Fettsäure-Acyl-CoA-Synthetase, katabolen Bedingungen ausgesetzt. Dies bedingte in den drei Zelllinien eine Reduzierung der TAG-Spiegel um circa 73 % im Vergleich zu den Spiegeln unter stationären Bedingungen zum Startzeitpunkt (Abbildung 54 G). Ähnlich zu den initialen Erkenntnissen, dass PEX19^{-/-}- und PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zellen höhere TAG-Spiegel im Vergleich zu WT-Zellen aufwiesen, waren die absoluten Mengen an TAG nach Triacsin C-Behandlung in PEX19^{-/-}- und PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zellen circa 70 % höher im Vergleich zu denen in WT-Zellen (Abbildung 54 H). Dies lässt vermuten, dass die Lipolyse *per se* in PEX19^{-/-}- und PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zellen nicht beeinträchtigt ist. Darüber hinaus zeigte die Analyse der TAG-Subgruppen auf, dass ähnliche Spezies in PEX19^{-/-}- und PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zellen akkumulieren (Abbildung 54 I-L).

Die Ergebnisse, die zusammenfassend eine Akkumulierung von TAG in PEX19^{-/-}-Zellen im Vergleich zu WT-Zellen verdeutlichten und eine Beeinträchtigung in der Verarmung der Neutrallipidspeicher unter katabolen Bedingungen aufzeigten, lassen eine spezifische und Peroxisomen-unabhängige Funktion von PEX19 im Metabolismus von Neutrallipiden vermuten, deren Aufklärung ein Ziel weiterer Forschung darstellen sollte.

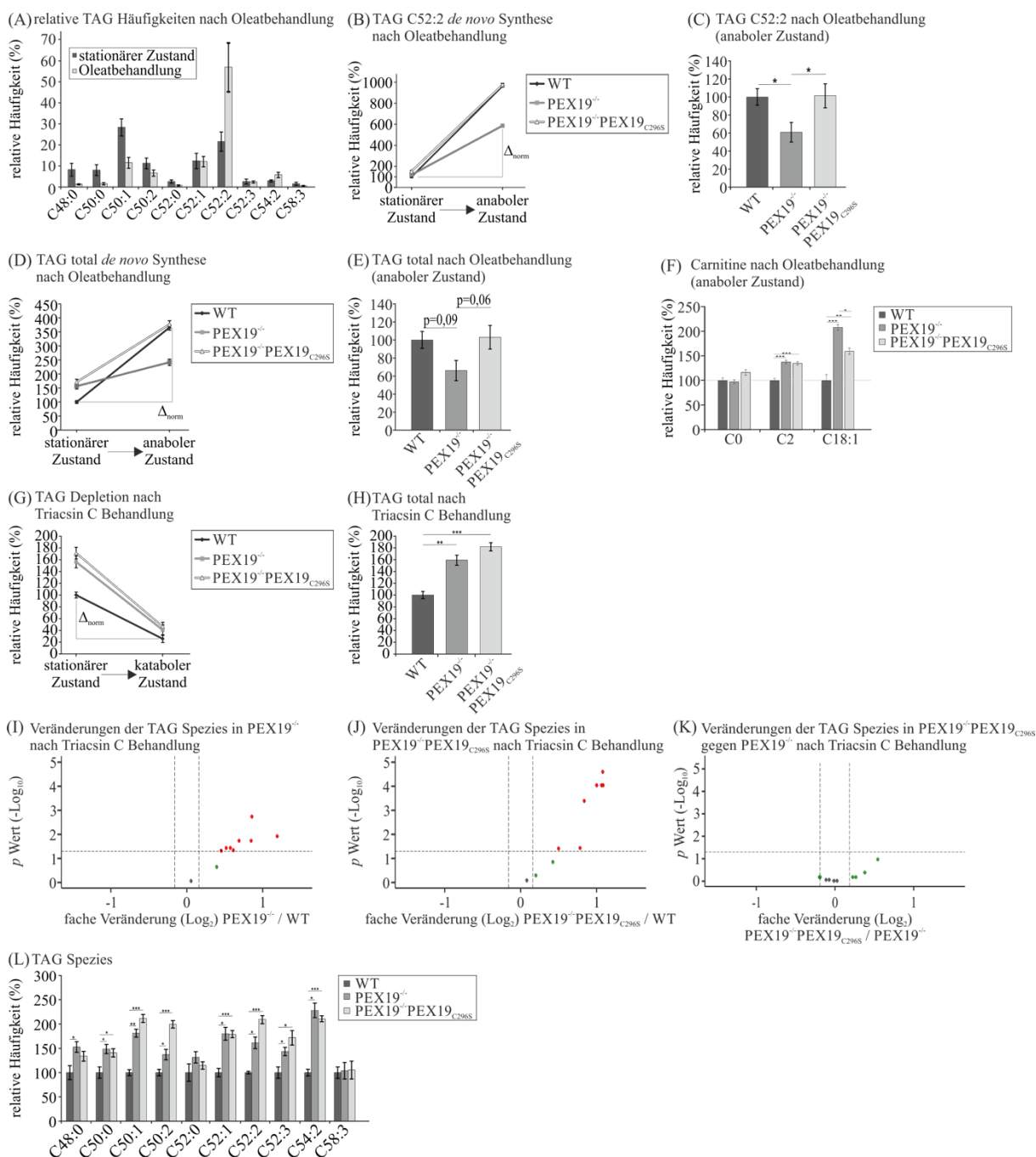


Abbildung 54: De novo TAG-Anabolismus nach Behandlung mit Oleat sowie TAG-Katabolismus nach Triacsin C-Behandlung. (A) Die exogen zugeführte Ölsäure wird überwiegend in die TAG-Spezies C52:2 eingebaut, was sich anhand der *Lipidomics*-Ergebnisse der zehn analysierten TAG-Spezies in WT-HeLa-Zellen vor und nach Oleatbehandlung zeigt. (B-F) Durch Inkubation der Zellen für 18 Stunden mit Oleat-versetztem 10 %-FCS-Medium wurden diese vom stationären in einen anabolen Zustand versetzt und die Bildung von Lipidtröpfchen induziert (n = 5 je Zelllinie; technische Triplikate). (B) Die TAG C52:2 *de novo* Synthese in WT-, PEX19^{-/-}- und PEX19^{-/-}PEX19^{C296S}-Zellen ist in einem Liniendiagramm dargestellt, in welchem der stationäre Zustand als Start- und der anabole Zustand als Endpunkt definiert sind, wobei der Spiegel an TAG C52:2 in WT-Zellen unter stationären Bedingungen als 100 % definiert wurde. Das Verhältnis zwischen der Menge an C52:2 unter anabolen Bedingungen und der unter stationären Bedingungen ohne Oleatbehandlung definiert die relative C52:2 *de novo* Synthese, die in WT-Zellen 9,6, in PEX19^{-/-}-Zellen 4,9 und in PEX19^{-/-}PEX19^{C296S}-Zellen 6,4 betrug. Die absolute C52:2 *de novo* Synthese wurde durch Δ_{norm} visualisiert und durch Berechnung der Differenz der C52:2-Menge zwischen anabolen und stationären Bedingungen quantifiziert. Sie betrug für WT-Zellen 864, für PEX19^{-/-}-Zellen 467 und für PEX19^{-/-}PEX19^{C296S}-Zellen 823. (C) Relative Häufigkeit von TAG C52:2 nach Oleatbehandlung in PEX19^{-/-}- und PEX19^{-/-}PEX19^{C296S}-Zellen im Vergleich zu WT-Zellen (100 %). (D) Gesamt-

TAG *de novo* Synthese nach Oleatbehandlung. Der Aufbau des Diagramms ist analog zu (B). (E) Gesamt TAG-Spiegel nach Oleatbehandlung. Der Aufbau des Diagramms ist analog zu (C). (F) Relative Häufigkeit der Carnitinspezies C0, C2 und C18:1 nach Oleatbehandlung in PEX19^{-/-}- und PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zellen jeweils im Vergleich zu WT-Zellen (100 %). (G-L) Die drei analysierten Zelllinien wurden durch Inkubation in Medium mit 0,1 % FCS und in Anwesenheit von Triacsin C für 18 Stunden katabolen Bedingungen ausgesetzt und eine *Lipidomics*-Analyse der TAG-Spezies durchgeführt (n = 8 je Zelllinie; technische Triplikate). (G) TAG-Depletion nach Triacsin C-Behandlung in WT-, PEX19^{-/-}- und PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zellen dargestellt als Liniendiagramm, in welchem der stationäre Zustand als Start- und der katabole Zustand als Endpunkt definiert sind, wobei der Spiegel an TAG in WT-Zellen unter stationären Bedingungen als 100 % definiert wurde. Die relative TAG-Depletion nach Triacsin C-Behandlung betrug 74,4 % in WT-, 73,9 % in PEX19^{-/-}- und 72,9 % in PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zellen. Δ_{norm} visualisiert die absolute TAG-Depletion, berechnet pro Zelllinie als Differenz der TAG-Spiegel unter stationären Bedingungen vor Triacsin C-Behandlung und TAG-Spiegel zum katabolen Zustand. Sie beträgt 74 für WT-Zellen, 116 für PEX19^{-/-}- und 125 in PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zellen. (H) Relative Häufigkeit der Gesamt-TAG-Spiegel nach Triacsin C-Behandlung in PEX19^{-/-}- und PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zellen im Vergleich zu WT-Zellen (100 %). (I-K) Volcano Plots der TAG-Subspezies-Analyse. Dargestellt sind Veränderungen in PEX19^{-/-}-Zellen (I) und PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zellen (J) jeweils im Vergleich zu WT-Zellen sowie Veränderungen zwischen PEX19^{-/-}- und PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zellen (K). (L) Säulendiagramm zur Darstellung der relativen Häufigkeit der TAG-Spezies in WT-, PEX19^{-/-}- und PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zellen. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Sterne stellen die statistische Signifikanz dar, wobei *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01 und ***p ≤ 0,001 gelten. Die im Volcano Plot dargestellten Signifikanzwerte wurden mittels ungepaartem Student-t-Test berechnet, während die statistische Analyse der Gesamt-Lipid-Vergleiche zwischen den drei analysierten Zelllinien mittels ANOVA und folgendem Post-Hoc-Test durchgeführt wurde. Abbildung verändert nach (LYSCHIK et al., 2022).

Um eine Heterogenität hinsichtlich der klonalen PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie ausschließen zu können, wurden die Hauptergebnisse dieser Studie in zwei unterschiedlichen Klonen dieser Zelllinie durchgeführt. Die auf diese Weise reproduzierten Daten sind in Abbildung 55 dargestellt.

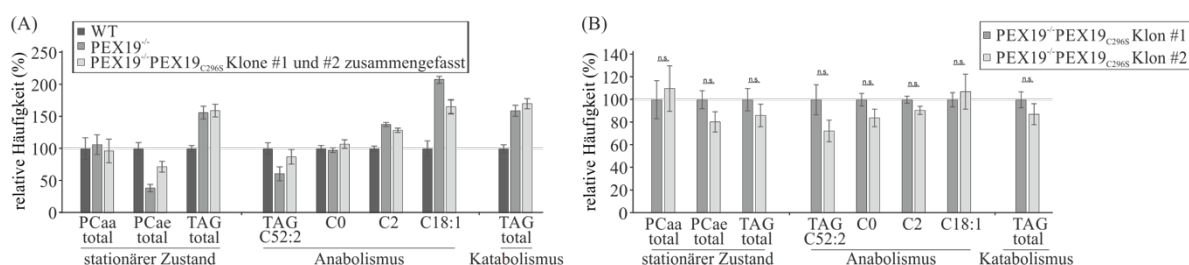


Abbildung 55: Vergleich zweier unterschiedlicher Klone der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie. (A) Die Hauptergebnisse der *Lipidomics*-Analyse hinsichtlich stationären Zustandes, Anabolismus und Katabolismus konnten als durchschnittliche Daten zweier verschiedener Klone der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie im Vergleich zu WT- und PEX19^{-/-}-Zellen reproduziert werden. (B) Hinsichtlich der Hauptergebnisse der *Lipidomics*-Analyse sind die beiden verschiedenen Klone der PEX19^{-/-}PEX19_{C296S}-Zelllinie nicht voneinander unterscheidbar. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Die statistischen Analysen wurden mittels ANOVA und folgendem Tukey-Post-Hoc-Test (A) oder ungepaartem Student-t-Test durchgeführt (B). Abbildung verändert nach (LYSCHIK et al., 2022).

5 Diskussion

5.1 Mechanistischer Zusammenhang zwischen Vitamin D und der Alzheimererkrankung

5.1.1 Die Relevanz von Vitamin D für neuronale Funktionen

Die zentrale Relevanz von Vitamin D für die Kalzium- und Phosphathomöostase und damit verbundene Erkrankungen wurde bereits einleitend dargestellt (Kapitel 2.2.1). Darüber hinaus wurde auf molekularer Ebene beschrieben, dass Vitamin D, teilweise über seine VDR-vermittelte Expressionswirkung, Einfluss auf unterschiedliche zelluläre Prozesse, wie beispielsweise die mitochondriale Funktion, oxidativen Stress, Autophagie oder Inflammation ausüben kann.

In Bezug auf die mitochondriale Funktion resultierte eine gehemmte *VDR*-Genexpression in der Keratinozytenzelllinie HaCaT in einer gesteigerten respiratorischen Aktivität, was sich anhand eines Anstiegs des mitochondrialen Membranpotenzials äußerte. Einhergehend war die Transkription einiger Atmungskettenkomponenten, die an die oxidative Phosphorylierung gekoppelt sind (*COX2*, *COX4*, *MT-ATP6*, *ATP5B*), erhöht. Auf Grund dessen, dass die Atmungskette eine wichtige Quelle reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) ist (DROSE, BRANDT, 2012), wurde als Folge des respiratorischen Ausbruchs eine Zunahme der ROS-Spiegel detektiert (RICCA et al., 2018). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurde beschrieben, dass eine Behandlung von HaCaT-Zellen mit Vitamin D₃ die Expression von *COX2* und *COX4* wiederum reduzierte (CONSIGLIO et al., 2015). Bezüglich der Alzheimererkrankung stellt oxidativer Stress einen Risikofaktor auf molekularer Ebene dar und ist zudem auch in die Pathologie dieser neurodegenerativen Erkrankung involviert. Dies liegt darin begründet, dass hippokampale Neurone sehr anfällig gegenüber oxidativem Stress sind und eine große Menge an Glutathion zur Eliminierung freier Radikale benötigen (FERNANDEZ-FERNANDEZ et al., 2018). ROS, hauptsächlich Hydroxylradikale (HO·) und Hydroperoxyl (HO₂·), können den nicht-enzymatischen Prozess der Lipidperoxidation induzieren, der zur Alzheimerpathogenese, deren Prozesse an oder in biologischen Membranen stattfinden, beiträgt (AYALA et al., 2014). In diesem Kontext ist zu erwähnen, dass speziell die Bindung von ω-3 PUFA in Phospholipide in Anwesenheit von oxidativem Stress ein Risiko darstellt, da diese Fettsäuren auf Grund ihrer hohen Anzahl an Doppelbindungen anfällig für Lipidperoxidation sind (ZALOGA, 2021). Eine weitere Lipidklasse, deren Mangel auf Grund ihrer wichtigen Funktion im Gehirn als strukturelle Komponente von beispielsweise synaptischen Membranen eng mit der Alzheimererkrankung in Verbindung steht, sind die Plasmalogene (SENANAYAKE, GOODENOWE, 2019). Auf struktureller Ebene macht ihre Vinyl ether-Bindung die Plasmalogene anfällig für Sauerstoff- und Hydroxylradikale, weshalb ihnen anti-oxidative Eigenschaften zukommen (STADELMANN-INGRAND et al., 2001). *In vivo* lieferte die Detektion signifikant erhöhter Konzentrationen an oxidierten Lipiden und 4-Hydroxy-Nonenal (HNE) in humanen *post mortem* Hirnproben von Alzheimerpatienten im Vergleich zu Individuen ohne Demenz Hinweise für einen Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und der Alzheimerpathologie (GRIMM et al., 2016a).

Ein wichtiger Prozess, der es gesunden Zellen erlaubt funktionsbeeinträchtigte Organellen, wie beispielsweise alternde Mitochondrien, deren Fähigkeit ATP zu erzeugen ab- und deren ROS-Produktion zunimmt, ist die Autophagie.

In der Literatur ist eine Vielzahl an Hinweisen für eine Rolle von Vitamin D bei der Aufrechterhaltung der Autophagie zu finden. Diese wird vermutlich darüber vermittelt, dass Vitamin D durch Regulierung der Kalziumspiegel in der Lage ist die Autophagie zu fördern (BERRIDGE, 2017). Hinsichtlich der Alzheimererkrankung wurden Beeinträchtigungen der Autophagie in frühen Krankheitsstadien beschrieben. Darüber hinaus spielt dieser Degradationssignalweg für unnatürliche Proteinaggregate eine wichtige Rolle in der Generierung und dem Metabolismus von A β , weshalb Autophagie-Modulatoren als potenzielle therapeutische Kandidaten für die Alzheimererkrankung erforscht werden (LI et al., 2017).

Neben diesen neuroprotektiven Eigenschaften werden auch anti-inflammatorische Einflüsse von Vitamin D vermutet (YIN, AGRAWAL, 2014). In einer aktuellen Covid-19-Studie deckten Chauss *et al.* einen Mechanismus auf, über welchen Vitamin D die T-Zell-bedingte Inflammation reduziert. Vitamin D war dabei in der Lage, den Übergang der pro- in die anti-inflammatorische Phase von Th1-Zellen nach überstandener Infektion zu beschleunigen. Dies ist gerade im Hinblick auf Covid-19-Patienten von Wichtigkeit, da in diesen die pro-inflammatorische Phase der Th1-Zellen konstitutiv aktiviert ist. Der in diesem Zusammenhang beschriebene positive Einfluss einer Vitamin D-Supplementierung sollte weiterführend in klinischen Studien validiert werden (CHAUSS et al., 2022). Hinsichtlich der Alzheimererkrankung spielt die Neuro-Inflammation eine wesentliche Rolle, was beispielsweise daran deutlich wird, dass A β -Oligomere an Mikro- und Astroglia-Rezeptoren binden und dadurch eine Immunantwort auslösen können, in deren Zusammenhang inflammatorische Mediatoren freigesetzt werden, die folglich zur Progression der Alzheimererkrankung beitragen (HENEKA et al., 2015). Für das Zytokin Interleukin-1 β (IL-1 β), welches in die Initiierung inflammatorischer Antworten involviert ist (DINARELLO, 2011) und in *post mortem* Hirnproben von Alzheimerpatienten, speziell im frontalen Kortex und Hippocampus, als erhöht detektiert wurde (CACABELOS et al., 1994), konnte in humanen Neuroblastomzellen gezeigt werden, dass verschiedene Vitamin D-Analoga (Maxacalcitol, Calcipotriol, Alfacalcidol) in der Lage sind, die IL-1 β -Spiegel signifikant zu reduzieren (GRIMM et al., 2017b). Darüber hinaus wurde auch für Vitamin D₂ berichtet, dass es A β ₂₅₋₃₅-induzierte pro-inflammatorische Zytokine, wie IL-1 β , IL-6 oder TNF α , mildert (RAHA et al., 2016). Diese Vitamin D-vermittelten Effekte scheinen sich nicht nur auf pro-inflammatorische Zytokine zu beschränken, wie die Steigerung der Expression des neuroprotektiven IL-34 bedingt durch Calcitriol auf zellulärer Ebene vermuten lässt (ZHANG et al., 2017a). Diese Ergebnisse stärken einen potenziellen Zusammenhang zwischen Vitamin D und der Alzheimer-relevanten Neuro-Inflammation.

Zusätzlich zu diesen Beobachtungen wird die angenommene wichtige Rolle des Secosteroids Vitamin D in neuronalen Prozessen auch dadurch gestärkt, dass beispielsweise durch den Nachweis von Intermediaten und Produkten des Vitamin D-Metabolismus in humaner Cerebrospinalflüssigkeit (BALABANOVA et al., 1984) schon früh belegt wurde, dass Vitamin D und seine Metabolite in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren. Des Weiteren wird auf Grund der Anwesenheit der metabolisierenden Hydroxylasen im Gehirn vermutet, dass die aktive Form dieses Hormon-ähnlichen Secosteroids im menschlichen Gehirn synthetisiert werden kann. Die zusätzliche Existenz des VDR in neuronalen und Glia-Zellen lässt außerdem die Vermutung eines Einflusses von Vitamin D auf die Funktion des zentralen Nervensystems zu (EYLES et al., 2005).

Einhergehend damit beobachtete neben diesen präklinischen molekularbiologischen Analysen auch eine Vielzahl klinischer Studien eine Assoziation zwischen kognitiven Beeinträchtigungen und einer Vitamin D-Hypovitaminose (ANNWEILER, 2017; ANNWEILER et al., 2009; DICKENS et al., 2011; ETGEN et al., 2012; GALL, SZEKELY, 2021; LEMIRE et al., 2018; SULTAN et al., 2020; VAN DER SCHAFT et al., 2013). Auch hinsichtlich neurodegenerativer Erkrankungen und dadurch bedingter Formen der Demenz ist ein Einfluss von Vitamin D durch die einheitliche Datenlage epidemiologischer Studien bereits beschrieben worden. Über die letzten Jahre hinweg wurden verringerte Vitamin D₃-Konzentrationen einheitlich mit einem wesentlich erhöhten Risiko, an Demenzen aller Art sowie Alzheimer zu erkranken, assoziiert (AFZAL et al., 2014; BALION et al., 2012; BIVONA et al., 2021; CHAI et al., 2019; LITTLEJOHNS et al., 2014). Ein Überblick über die in diesem Zusammenhang durchgeführten klinischen Studien sowie Tier- und Zellkulturstudien, welche Hinweise für diese Korrelationen liefern, ist beispielsweise (LAUER et al., 2019) zu entnehmen. Kontroverser gestaltet sich allerdings die Publikationslage bezüglich der im Zusammenhang mit Vitamin D durchgeführten Interventionsstudien. Auf mögliche Ursachen hierfür, die im jeweiligen Studiendesign begründet sein könnten, wird am Ende des folgenden Abschnitts eingegangen.

Um den potenziell zugrundeliegenden Zusammenhang zwischen dem Vitamin D-Status und dem Auftreten sowie der Progression der Alzheimererkrankung zu adressieren, gelten RCTs in der medizinischen Forschung als Methode der Wahl. Hierbei handelt es sich um ein Studiendesign, bei welchem die Zuordnung der Teilnehmer zu der entsprechenden Interventionsgruppe randomisiert, also anhand des Zufallsprinzips, erfolgt. Die Bezeichnung der Kontrollstudie basiert auf dem Inkludieren eines Teilnehmerkollektivs, welches beispielsweise die Vitamin D-Intervention erhält und der gleichzeitigen Anwesenheit eines Kollektivs, das entweder keine oder eine Kontroll-Supplementierung verabreicht bekommt.

In einer kürzlich veröffentlichten RCT berichteten Kang *et al.*, dass die Supplementierung von 2000 Internationalen Einheiten (*International Units*, IU) 25(OH)-Vitamin D₃ (Cholecalciferol) pro Tag in Studienteilnehmern mit dunklem Hauttyp nach zwei bis drei Jahren in einer tendenziell verbesserten kognitiven Leistung resultierte. Die mittlere Differenz der jährlichen Verfallsgeschwindigkeit betrug zwischen Vitamin D₃- und Placebo-supplementierten Teilnehmern 0,04 (95 % Konfidenzintervall: 0,01-0,08). Die Studie inkludierte Teilnehmer, die älter als 60 Jahre und nicht von einer kardiovaskulären Krankheit oder eine Krebserkrankung betroffen waren (KANG et al., 2021).

Im Hinblick auf einen potenziell positiven Effekt einer Vitamin D-Intervention für Alzheimerpatienten demonstrierte eine aktuelle RCT von Jingya Jia *et al.*, dass die 12-monatige Supplementierung von 800 IU Vitamin D₃ pro Tag sowohl die kognitive Funktion als auch die Alzheimer-assoziierten Biomarker im Blut positiv beeinflusst. Im Vergleich zu Teilnehmern, die Kapseln mit Stärkegranulat als Placebo verabreicht bekamen, wurden bei Vitamin D₃-supplementierten Alzheimerpatienten signifikante Verbesserungen in verschiedenen Kognitionsparametern wie Informationsverarbeitung, Arithmetik, Ziffernsparne, Wortschatz, Blockaufbau oder Bildanordnung detektiert. Darüber hinaus resultierte die tägliche orale Aufnahme von Vitamin D₃ über ein Jahr in signifikant ($p < 0,001$) verbesserten Plasmaspiegeln der Alzheimerpathologie-assoziierten Biomarker A β ₄₂, APP, BACE1, APP-mRNS und BACE1-mRNS (JIA et al., 2019). Gerade hinsichtlich RCT, die sich mit Vitamin D beschäftigen, sollte beachtet werden, dass Studienteilnehmer inkludiert werden, deren Serum-Calcidiolkonzentrationen nicht über denen des Bevölkerungsdurchschnitts liegen.

Außerdem sollten die verabreichten Vitamin D-Konzentrationen nicht zu niedrig gewählt und weitere Vitamin D-Quellen ausgeschlossen werden. Außerdem sollte die Auswertung nicht hinsichtlich der verabreichten Dosis an Vitamin D, sondern anhand der basierend auf dem Ausgangswert durch Supplementierung erreichten Calcdiol-Serumkonzentration erfolgen (GRANT et al., 2022).

Neben randomisierten Kontrollstudien dient die Methode der Mendelschen Randomisierung (MR), die auf genetische Assoziationen fokussiert, der Analyse eines kausalen Zusammenhangs zwischen einer Hypovitaminose D und der Alzheimererkrankung. Bei dieser nicht-experimentellen Herangehensweise wird der Einfluss von Vitamin D auf die Alzheimerpathologie anhand möglicher genetischer Variationen analysiert. Eine diesjährige Metaanalyse von Usategui-Martin *et al.* zielte auf die Analyse der Antwort auf eine Vitamin D-Supplementierung hinsichtlich der Polymorphismen ApaI (rs7975232), BsmI (rs15444410), TaqI (rs731236) und FokI (rs10735810) ab. Die Evaluierung von acht Studien mit insgesamt 1038 Teilnehmern demonstrierte, dass der TaqI- und der FokI-Polymorphismus mit einer verbesserten Antwort auf die Supplementierung assoziiert sind (USATEGUI-MARTIN et al., 2022). Darüber hinaus identifizierten Larsson *et al.* in ihrer kürzlich publizierten MR-Studie sieben Einzelnukleotid-Polymorphismen (*Single Nucleotide Polymorphisms*, SNP), die in Verbindung mit den Serumkonzentrationen an 25(OH)-Vitamin D₃ stehen, als invers mit der Alzheimererkrankung assoziiert. Dabei erreichte die Assoziation bei zwei dieser SNPs (rs3755967 und rs17216707) das Signifikanzniveau (LARSSON et al., 2018). In einer diesjährig publizierten explorativen Querschnittsstudie an 100 Patienten mit kognitiven Beeinträchtigungen im Vergleich zu 76 kognitiv gesunden Individuen wurde beobachtet, dass Teilnehmer mit positiven Alzheimer-assoziierten Biomarkern trotz ausreichender Serumspiegel einen niedrigen Liquorspiegel an 25(OH)-Vitamin D₃ aufweisen. Dieser wurde zwar nicht von einem der vier analysierten VDR-Polymorphismen (FokI, BsmI, ApaI und TaqI) beeinflusst, jedoch wurde beschrieben, dass TaqI- und BsmI-homozygote Genotypen von einem erhöhten Risiko der Entwicklung eines kognitiven Verfalls betroffen sein könnten (SOARES et al., 2022). Zusammenfassend unterstreichen die Ergebnisse der MR-Studien ebenfalls eine wichtige Rolle von Vitamin D in der Alzheimererkrankung, die zukünftig weiter aufgeklärt werden sollte.

Auf molekularer Ebene ist, im Vergleich zu der Vielzahl an klinischen Studien im Zusammenhang mit dem Secosteroid Vitamin D, jedoch noch nicht ausreichend erforscht, über welche Mechanismen Vitamin D diesen positiven Einfluss auf die Prozesse der Alzheimerpathologie ausüben könnte. Dabei wäre gerade die Aufklärung der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen von entscheidender Bedeutung, um beurteilen zu können, ob es sich bei der Vitamin D-Hypovitaminose um einen Grund und somit einen Risikofaktor der Alzheimererkrankung oder aber um eine Konsequenz dieser neurodegenerativen Erkrankung handelt, die potenziell durch begleitende Änderungen der Ernährungs- und Verhaltensweisen vermittelt wird.

Einen ersten Hinweis für molekulare Prozesse, über welche Vitamin D seinen Einfluss auf die neuronale Funktion ausüben könnte, lieferte eine frühe Studie von Sutherland *et al.*, die eine Verbindung zwischen Vitamin D und der Alzheimererkrankung auf molekularer Ebene aufzeigte. Diese berichtete, dass die Menge an *VDR*-mRNS in hippokampalen CA1 und CA2 pyramidalen Zellen von Alzheimerpatienten im Vergleich zu Huntington-Erkrankung-betroffenen Patienten verringert waren.

Als Limitierungen dieser Studie muss berücksichtigt werden, dass lediglich Hirnproben von vier Alzheimer- und vier Huntingtonpatienten analysiert wurden. Zudem dienten Proben von Huntingtonpatienten und nicht von gesunden Individuen als relativer Vergleich (SUTHERLAND et al., 1992). Dennoch ließen bereits diese frühen Ergebnisse eine VDR-vermittelte transkriptionsregulatorische Wirkungsweise von Vitamin D auf Alzheimer-assoziierte Prozesse im Gehirn vermuten.

Basierend auf diesen Indizien und der suggerierten neuroprotektiven Rolle von Vitamin D, war das Ziel dieser Studie in der Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen und damit eines potenziellen kausalen Zusammenhangs zwischen Vitamin D sowie therapeutisch eingesetzten Analoga und der APP-Prozessierung, einem wichtigen Prozess der Alzheimerpathologie, definiert.

5.1.2 Der Einfluss von Vitamin D und seinen Analoga auf die molekularen Mechanismen der Amyloid- β -Pathologie

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit hinsichtlich des potenziellen Einflusses von Vitamin D und seinen therapeutisch eingesetzten Analoga Maxacalcitol, Calcipotriol, Alfacalcidol, Paricalcitol und Doxercalciferol auf die molekularen Mechanismen der Alzheimerpathologie in den Kontext der aktuellen Literatur eingeordnet.

In einer von der Arbeitsgruppe Experimentelle Neurologie bereits 2014 publizierten Studie wurde ein möglicher Einfluss von Vitamin D auf die Prozessierung von APP anhand von zellulären und murinen Modellen einer milden bis moderaten Hypovitaminose im Bereich von 20 - 30 %, was dem physiologischen Vitamin D-Mangel in der älteren Bevölkerung entspricht (BUELL et al., 2010), analysiert. Bereits unter diesen milden Bedingungen der Hypovitaminose wurden erhöhte Mengen an A β -Peptiden, bedingt durch eine erhöhte β -Sekretase-vermittelte Prozessierung von APP sowie eine gleichzeitig verringerte A β -Degradation beschrieben. Einhergehend damit bedingte die Supplementierung von 25(OH)-Vitamin D₃ *in vitro* korrespondierend gegenteilige Effekte (GRIMM et al., 2014). Diese Ergebnisse verdeutlichen zum einen die molekularen Mechanismen, über welche Vitamin D seinen positiven Einfluss auf die Alzheimererkrankung ausüben könnte und zum anderen lassen sie vermuten, dass eine Supplementierung dieses Secosteroids positive Effekte im Rahmen der Alzheimerprävention hervorrufen könnte.

Die Analyse potenziell ähnlicher positiver Einflüsse von therapeutisch eingesetzten Vitamin D-Analoga war ein Ziel der vorliegenden Arbeit, weshalb die in die Studie inkludierten Analoga im Folgenden kurz vorgestellt werden. Bei Maxacalcitol handelt es sich um ein 1,25-hydroxyliertes Vitamin D₃-Analog, welches auf Grund dessen, dass es ein Sauerstoff- anstatt eines Kohlenstoffatoms an Position 22 der Seitenkette trägt (Abbildung 56), weniger kalzämisch ist und gleichzeitig eine hohe Potenz der Parathormon-Unterdrückung besitzt, zur Behandlung von sekundärem Hyperparathyreoidismus und Psoriasis eingesetzt wird (BROWN et al., 1989; MURAYAMA et al., 1986). Bei Calcipotriol handelt es sich um ein 1,24-hydroxyliertes Vitamin D₃-Analog und um das erste zur Behandlung von Psoriasis zugelassene synthetische Derivat, da es die terminale Differenzierung proliferierender Keratinozyten in ähnlicher Weise wie Calcitriol induziert (KRAGBALLE, WILDFANG, 1990) und lediglich eine minimale kalzämische Aktivität aufweist (KRAGBALLE, 1992).

Alfacalcidol ist ein 1-hydroxyliertes Vitamin D₃-Analog, dessen Vitamin D₂-Gegenstück das ebenfalls 1-hydroxylierte Doxercalciferol ist, und welches zur Behandlung von Osteoporose, Osteomalazie und Rachitis eingesetzt wird (BROWN, 2001). Doxercalciferol, welches ebenso wie Alfacalcidol *in vivo* aktiviert werden muss, ist in der Lage den Parathormonspiegel zu senken (COBURN et al., 2004) und daher in die Therapie von sekundärem Hyperparathyreoidismus inkludiert (TAN et al., 1997). Bei dem zweiten Vitamin D₂-Analog Paricalcitol, welches 1,25-hydroxyliert ist und dem das exozyklische Kohlenstoffatom an Position 19 fehlt, handelt es sich um das erste für die Behandlung von sekundärem Hyperparathyreoidismus zugelassene Vitamin D-Derivat (BROWN, SLATOPOLSKY, 2008; COYNE et al., 2006). Anhand dieser vielfältigen Wirkungsspektren wird deutlich, dass der Auswahl des wirksamsten Vitamin D-Analoges im Zuge individualisierter Therapieansätze eine wichtige Rolle zukommen kann (MAZZAFERRO et al., 2014).

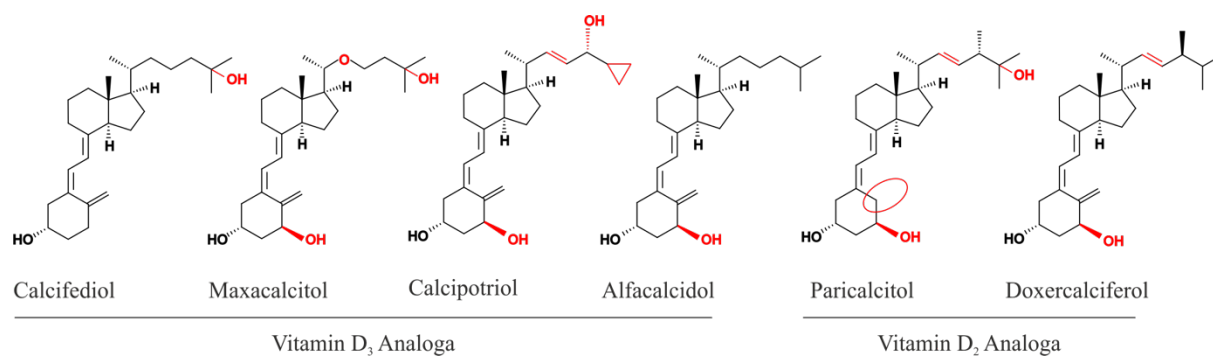


Abbildung 56: In der vorliegenden Arbeit analysierte Vitamin D-Analoga. Chemische Strukturen der in der vorliegenden Arbeit zur Analyse potenzieller Einflüsse auf die molekularen Mechanismen der Alzheimererkrankung selektierten und therapeutisch eingesetzten Vitamin D₃- und D₂-Analoga Maxacalcitol, Calcipotriol, Alfacalcidol, Paricalcitol und Doxercalciferol. Strukturelle Unterschiede sind in rot oder durch Kreise hervorgehoben. Abbildung verändert nach (GRIMM et al., 2017b).

Hinsichtlich der Selektivität, Spezifität und Potenz der analysierten Analoga sind vier Proteine von besonderer Wichtigkeit, da über diese die molekularen Interaktionen gewährt werden: der VDR, der Membranrezeptor, das Serum-Vitamin D-bindende Protein (DBP) und die 24-Hydroxylase. Während über den VDR die transkriptionsregulatorischen Eigenschaften von Vitamin D vermittelt werden (Kapitel 2.2.1), sind Zelloberflächenrezeptoren für die nicht-expressionsvermittelten Wirkungen dieses Secosteroids wichtig. Das metabolisierende Enzym 24-Hydroxylase ist in der Lage, Calcitriol und manche Analoga zu inaktivieren, aber auch stabile Metabolite anderer Analoga zu produzieren und so deren biologische Aktivität zu gewährleisten. Das Transportprotein DBP spielt eine wichtige Rolle, da es die Aufnahme von Vitamin D und Analoga in die Zelle kontrolliert (BROWN, 2001). Strukturelle Modifizierungen in den Vitamin D-Analoga können dabei modulierend auf diese Interaktionen wirken und ein einzigartiges biologisches Wirkungsprofil für jedes Analog schaffen, was die Synthese von Analoga mit selektiven therapeutischen Eigenschaften erlaubt (LEYSENS et al., 2014).

Hinsichtlich der VDR-Interaktion ist für die funktionelle Aktivität der Vitamin D-Analoga essenziell, dass sie mit einer ausreichend hohen Affinität an diesen Rezeptor binden und eine Konformationsänderung induzieren (BROWN, 2001; BROWN, SLATOPOLSKY, 2008).

In diesem Kontext wurde beschrieben, dass es keinen linearen Zusammenhang zwischen Bindungsaffinität und biologischer Aktivität gibt, was beispielsweise daran verdeutlicht wurde, dass Analoga mit einer 20-Epi-Stereochemie eine stärker ausgeprägte biologische Aktivität besitzen als basierend auf ihrer VDR-Bindungsaffinität erwartet. Begründet werden könnte dies mit einer stärkeren VDR-RXR-Komplexbildung und somit gesteigerten DNS-Bindung am Zielgen, die durch eine unterschiedliche Konformationsänderung im Vergleich zu Calcitriol vermittelt sein könnte (PELEG et al., 1995).

Das DBP, welches in der Lage ist, alle natürlich vorkommenden Vitamin D-Metabolite zu binden, benötigt im Gegensatz zum VDR keine 1-Hydroxylgruppe, seine Affinität kann jedoch durch Veränderungen in der Vitamin D-Seitenkette beeinflusst werden. Aus pharmazeutischer Sicht scheint die DBP-Affinität der Vitamin D-Analoga eine entscheidende Rolle in der Gewebselektivität zu spielen. Zu einem überwiegenden Anteil resultierten in diesem Kontext die Modifizierungen in einer reduzierten Interaktion zwischen Analog und DBP, was einerseits bedingt, dass das Analog schnell aus der Blutzirkulation entfernt wird, aber andererseits einen erhöhten Zugang in die Zielzelle gewährleistet. Dieser pharmakokinetische Mechanismus der Selektivität wurde beispielsweise für das Vitamin D-Analog 22-Oxa-1,25(OH)₂D₃ (OCT) beschrieben. In Ratten war die DBP-Bindungsaffinität für OCT im Vergleich zu der von 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ um das circa 500-fache reduziert (OKANO et al., 1989), was bedingte, dass OCT schnell aus der Blutzirkulation entfernt wurde und nur geringe Spitzenwerte nach der Injektion auslöste (BROWN et al., 1993; KOBAYASHI et al., 1991). Neben diesen niedrigen Spitzenwerten im Blut, waren die Spitzenwerte im Darm und der Nebenschilddrüse größer als die von 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ (KOBAYASHI et al., 1991). Am Beispiel von Calcipotriol, was zur Therapie von Psoriasis angewendet wird, wird deutlich, dass eine geringe DBP-Affinität für die reduzierte Absorption von Vitamin D-Analoga durch die Haut verantwortlich sein könnte. Calcipotriol hat eine nur geringe DBP-Affinität, weshalb nur kleinste Mengen dieses äußerlich angewendeten Analogons in die Blutzirkulation aufgenommen werden, was den Vorteil hat, dass größere Mengen auf die psoriatischen Läsionen aufgetragen werden können, ohne das Risiko einer Hyperkalzämie zu erhöhen (BINDERUP, 1993). Für manche Analoga, wie beispielsweise Paricalcitol, scheinen andere Mechanismen für die Selektivität verantwortlich zu sein, da dieses Analog sich in der DBP-Affinität nicht von 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ unterscheidet (BROWN et al., 1997).

Die 24-Hydroxylase wirkt über die metabolische (In-) Aktivierung der Analoga auf deren selektive Aktivität. Die während der zellulären Metabolisierung entstehenden Seitenketten-Spaltungsprodukte sind zwar inaktiv, jedoch behalten Intermediär-Metabolite weiterhin biologische Aktivität (BROWN, 2001). Die synthetischen Analoga sind meist in der Seitenkette des Moleküls verändert, was die Metabolismus-Rate und somit die Aktivität beeinflussen kann. In diesem Kontext berichtete eine *in vitro* Studie, welche 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ und Analoga hinsichtlich ihrer anti-proliferierenden Wirkung analysierte, dass die Anwesenheit eines 24-Hydroxylase-Inhibitors die mediane effektive Dosis für jedes Analogon reduzierte, wobei die Unterschiede im Grad der Reduzierung vermutlich auf verschiedene Katabolismus-Raten durch die 24-Hydroxylase zurückzuführen sind (ZHAO et al., 1996). Weiterführend wurde für zwei andere Analoga, die ähnliche VDR-Affinitäten wie 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ aufwiesen, beobachtet, dass diese Analoga höhere Aktivitäten im Vergleich zu 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ besitzen.

Dies könnte zumindest partiell auf verringerte Metabolismus-Raten und die Akkumulierung aktiver Intermediate der Analoga zurückgeführt werden (DILWORTH et al., 1994; HANSEN, MAENPAA, 1997; SHANKAR et al., 1997). Auf diese Unterschiede im Katabolismus könnten darüber hinaus auch Zell-spezifische Effekte der Vitamin D-Analoga zurückgeführt werden (BROWN, 2001).

Über das vierte Protein, den Zelloberflächenrezeptor, welchem in diesem Kontext eine entscheidende Rolle zukommt, werden unter anderem die unmittelbaren Effekte von Calcitriol auf den Kalziumtransport vermittelt (LUCAS et al., 1989). Die Liganden-Spezifität für Membranrezeptoren unterscheidet sich dabei von der des VDR (NORMAN et al., 1999; ZHOU et al., 1992).

5.1.2.1 Der Effekt von Vitamin D und seinen Analoga auf die A β -Spiegel

Aufbauend auf diesen Erkenntnissen sollte in dieser Arbeit analysiert werden, ob therapeutisch eingesetzte Vitamin D₂- und D₃-Analoga ebenfalls anti-amyloidogene Eigenschaften besitzen und ob sich diese zwischen den einzelnen Analoga unterscheiden. Es wurde sich für die Vitamin D₃-Analoga Maxacalcitol, Calcipotriol und Alfacalcidol sowie die Vitamin D₂-Analoga Paricalcitol und Doxercalciferol entschieden, da diese, wie zuvor beschrieben, therapeutische Verwendung finden und sich in ihrer Struktur auf Grund ihrer Hydroxylierung am ersten Kohlenstoffatom von Calcifediol unterscheiden. Dies macht sie von der Aktivität der 1-Hydroxylase unabhängig und somit für die Verabreichung an niereninsuffiziente Patienten interessant. Auf Grund dessen, dass sich die analysierten Vitamin D-Analoga in ihren pharmakologischen Wirkungen sowie Nebeneffekten voneinander unterscheiden und spezifische Charakteristika aufweisen, könnten sie im Zuge individualisierter Medizin gezielt eingesetzt werden (Kapitel 5.1.2). Basierend darauf war ein Ziel der vorliegenden Arbeit in der experimentellen Analyse definiert, die Aussagen darüber zulässt, ob sich die Vitamin D₂- und D₃-Analoga hinsichtlich ihrer potenziellen positiven Effekte auf die molekularen Mechanismen der Alzheimerpathologie voneinander unterscheiden.

In Übereinstimmung mit dem berichteten erhöhten Spiegel an A β unter einem milden bis moderaten Vitamin D-Mangel resultierte die Behandlung humaner Neuroblastomzellen mit Calcifediol in auf 55,1 % verringerten A β -Mengen. Auch die Vitamin D₃-Analoga Maxacalcitol, Calcipotriol und Alfacalcidol sowie die Vitamin D₂-Analoga Paricalcitol und Doxercalciferol reduzierten die A β -Spiegel signifikant, wobei keine Unterschiede in den Effektstärken zwischen den einzelnen Analoga detektiert wurden. Als potenzielle Limitierung der A β -Detektion muss erwähnt werden, dass unter den beschriebenen experimentellen Bedingungen die A β -Menge quantifiziert wurde, wie dies in der Fachliteratur üblich ist (IINO et al., 2021; MUKHERJEE et al., 2021). In der Pathophysiologie der Alzheimererkrankung kommt jedoch den A β -Oligomeren eine immer entscheidendere Relevanz zu (ASHE, 2020; CLINE et al., 2018). Bei den in der Histologie als Alzheimer-Merkmal herangezogenen A β -Plaques handelt es sich um eine Begleiterscheinung der A β -Pathologie, die sich in Form angehäufter, überschüssiger A β ₄₂-Peptide äußert (KATZMARSKI et al., 2020). Die synaptische Plastizität, und damit die Kognition, werden hingegen von A β -Oligomeren negativ beeinflusst, was die Korrelation zwischen A β -Oligomeren und der Kognition erklären könnte (HONG et al., 2016; ORTIZ-SANZ et al., 2020; SHA et al., 2022).

Eine weitere Limitierung ist die eingesetzte Konzentration von 100 nM an Calcifediol oder Analoga, welche im Zellkultursystem zur einheitlichen Bindung und Aktivierung des VDR durch alle analysierten Vitamin D-Analoga in ähnlichem Maße geführt haben könnte, sodass potenziell unterschiedliche transkriptionsregulatorische Effekte einzelner Analoga überdeckt worden sein könnten.

Eine ähnliche Reduzierung von A β ₄₀- und A β ₄₂-Peptiden um circa 50 % wurde *in vivo* von Yu *et al.* in ihren Studien an transgenen A β PP-Mäusen beobachtet, welche für fünf Monate mit einer Vitamin D-angereicherten Diät gefüttert wurden. Bei A β PP-Mäusen handelt es sich um ein murines Alzheimermodell, welches innerhalb der ersten vier Lebensmonate spontan amyloide Plaques entwickelt. Die Fütterung einer Vitamin D-angereicherten Diät resultierte dabei in einer verringerten Anzahl an amyloiden Plaques (YU *et al.*, 2011). Neben der A β -verringern Eigenschaft wurde Vitamin D auch zugeschrieben, in SH-SY5Y-Zellen gegen die A β -induzierte Zytotoxizität wirken zu können, was auf eine Beteiligung von Sphingolipiden, die eine wichtige und komplexe Rolle in der Regulierung des Zellschicksals spielen, zurückgeführt wurde. Die aktive 1,25-Dihydroxy-Form von Vitamin D₃ revertierte dabei die A β ₁₋₄₂-bedingte Reduzierung im Sphingosin-1-Phosphat-(S1P-) / Ceramid-Verhältnis (PIERUCCI *et al.*, 2017). Bereits in frühen Stadien der Alzheimererkrankung bedingen Änderungen in den Aktivitäten der Sphingosin-1-Phosphat-synthetisierenden (Sphingosinkinase) und -degradierenden (S1P-Lyase) Enzyme eine Reduzierung der S1P-Spiegel (CECCOM *et al.*, 2014; COUTTAS *et al.*, 2014). Auch den Ceramiden kommt in der Alzheimerpathogenese eine entscheidende Rolle zu (MIZUNO *et al.*, 2016) und sowohl in krankheitsspezifischen Zell- und Tiermodellen als auch in Alzheimerpatienten wurden erhöhte Ceramidspiegel detektiert. Der bezogen auf die Krankheitsprogression frühe Anstieg der Ceramidspiegel im Gehirn von Alzheimerpatienten, speziell im frontalen und temporalen Kortex (FILIPPOV *et al.*, 2012; HAN *et al.*, 2002), ist dabei an eine Reduzierung der SM-Spiegel gekoppelt (HE *et al.*, 2010). Auf molekularer Ebene stabilisieren Ceramide die β -Sekretase-vermittelte APP-Prozessierung (PUGLIELLI *et al.*, 2003) und erhöhte Ceramid-Spiegel fördern neben der Lipidperoxidation unter anderem auch oxidativen Stress sowie mitochondriale Dysfunktion (SISKIND, 2005). In einer aktuellen Studie berichten Lin *et al.* von einem weiteren molekularen Mechanismus, über welchen Vitamin D die A β -induzierte Toxizität lindern könnte. In SH-SY5Y-Zellen, die zur Induzierung der Toxizität mit A β ₂₅₋₃₅ behandelt wurden, resultierte der Zusatz von 1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃ in der Modulierung der A β -induzierten reaktiven Sauerstoffspezies, Apoptose und Tau-Protein-Hyperphosphorylierung. Des Weiteren führten die Autoren diese neuroprotektiven Eigenschaften auf eine Wechselwirkung von Vitamin D mit der Signalkaskade des Glia-Zelllinien-abgeleiteten neurotrophen Faktors (GDNF) zurück (LIN *et al.*, 2020).

In Übereinstimmung mit diesen Daten bedingte die Vitamin D₃-Behandlung primärer Kortikal-Neurone, die für 72 Stunden A β ₁₋₄₂ ausgesetzt waren, eine Verbesserung der A β -induzierten und mit oxidativem Stress assoziierten Veränderungen. So wurden die A β -medierte Erhöhung von Lipidperoxidationsprodukten in Anwesenheit von Vitamin D₃ umgekehrt und sowohl die Spiegel an enzymatischen (Glutathion-S-Transferase) als auch die an nicht-enzymatischen Antioxidantien (Glutathion) signifikant erhöht. Zusätzlich resultierte die simultane Behandlung mit Vitamin D₃ in signifikant erhöhten Spiegeln des Nervenwachstumsfaktors (*nerve growth factor*, NGF), welcher für die neuronale Proliferation und das neuronale Überleben essenziell ist (ALAMRO *et al.*, 2020).

Im Kontext der Vitamin D-mediierten Zunahme an Glutathion ist zu erwähnen, dass Glutathion eine inhibierende Wirkung auf die SMase-Aktivität besitzt und somit die SM-Spiegel erhöht (TSYUPKO et al., 2001). Dies könnte einen zusätzlichen Mechanismus darstellen, über welchen Vitamin D die zuvor beschriebenen Ceramid-Spiegel-senkende Wirkung vermittelt.

5.1.2.2 Der Effekt von Vitamin D und seinen Analoga auf die amyloidogene Prozessierung von APP

Im folgenden Abschnitt werden die Resultate der Analyse derjenigen Mechanismen, die dem reduzierten A β -Gehalt in Anwesenheit von Vitamin D oder seinen Analoga zugrunde liegen könnten, aufgeführt. Allgemein können die beobachteten Effekte der Secosteroid-Varianten auf die A β -Spiegel dabei durch Beeinflussung des A β -Anabolismus und Katabolismus vermittelt werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit verdeutlichen, dass Vitamin D und seine Analoga ihre positive Wirkung gegenüber der A β -induzierten neuronalen Toxizität darüber hervorrufen, dass sie die Menge an sezernierten A β -Peptiden durch eine Verminderung der amyloidogenen APP-Prozessierung sowie einer gleichzeitigen Steigerung der A β -Degradation reduzieren.

Die beeinträchtigte Prozessierung von APP wurde dabei durch direkte Effekte der Vitamin D-Analoga auf die β -Sekretase sowie eine verminderte *BACE1*-Genexpression und einen reduzierten BACE1-Proteingehalt bedingt. In Bezug auf die transkriptionsregulatorischen Eigenschaften von Vitamin D sollte berücksichtigt werden, dass Calcidiol und Calcitriol zwar beide in der VDR-Liganden-Bindungstasche an derselben Position binden (LOU et al., 2010), jedoch Calcidiol in schwächerer Ausprägung im Vergleich zu der dihydroxylierten Vitamin D₃-Form Calcitriol (BRUMBAUGH, HAUSSLER, 1974). Inwieweit sich die nachgeschaltete Expressionswirkung über den VDR zwischen Calcidiol und Calcitriol unterscheidet, ist Gegenstand aktueller Forschung. Eine globale Genexpressionsanalyse an humanen und murinen Primärzellen detektierte individuelle Wirkungen von 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ in Gegenüberstellung zu 25(OH)-Vitamin D₃, die sowohl physiologische als auch pathologische Prozesse, wie beispielsweise den Zellzyklus, Gentranskription, Immunmodulierung oder die Epigenetik, beeinflussen (TUOHIMAA et al., 2013). Im Gegensatz dazu berichteten Fawaz *et al.* in diesem Zusammenhang, dass sowohl 25(OH)-Vitamin D₃ als auch 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ die Th17-Effektorantworten modulieren und die regulatorische Funktion von CD4⁺ T-Zellen verbessern (FAWAZ et al., 2016). Auch in murinen sich differenzierenden Myoblasten wurde beobachtet, dass sowohl Calcitriol als auch Calcidiol eine zelluläre Antwort in Form einer stimulierten *Vdr*-Expression bedingen. Diese Ergebnisse verdeutlichen darüber hinaus, dass auch die Skelettmuskulatur ein direktes Ziel von Vitamin D-Metaboliten ist und diese auch metabolisieren kann (VAN DER MEIJDEN et al., 2016).

Hinsichtlich der Vitamin D-Analoga Maxacalcitol, Calcipotriol, Alfacalcidol, Paricalcitol und Doxercalciferol mit therapeutischem Potenzial wird davon ausgegangen, dass sie ebenfalls an den VDR binden und Konformationsänderungen induzieren, die funktionell aktiv sind. Während für die natürlichen Vitamin D-Metabolite eine allgemeine Beziehung zwischen Bindungsaffinität und biologischer Aktivität besteht, scheinen manche Analoga eine höhere Aktivität zu besitzen als basierend auf ihrer VDR-Affinität anzunehmen.

Dies wurde beispielsweise für Analoga mit einer 20-Epi-Stereochemie, was bedeutet, dass ihre Methylgruppe am C20 in einer nicht der natürlichen Orientierung entsprechenden Orientierung vorliegt, beschrieben. Diese Beobachtung könnte durch die Vermittlung einer stabileren Bindung des VDR an RXR durch unterschiedliche Änderungen der VDR-Konformation im Vergleich zu Calcitriol begründet werden. Dies könnte wiederum eine stärkere Bindung des VDR-RXR-Heterodimers an DNS-Elemente bedingen, welche die gesteigerten Aktivitäten der Analoga erklären würde. In der Art der Vitamin D- oder Analoga-induzierten VDR-Konformationsänderung könnten somit auch die selektiven Wirkungen einzelner Metabolite oder Analoga in der therapeutischen Verwendung begründet liegen (BROWN, 2001). Eine Auswirkung auf unterschiedliche Zielgene abhängig des therapeutisch eingesetzten VDR-Agonisten wurde auch in einer kürzlich publizierten klinischen Studie deutlich, in welcher Maxacalcitol eine abschwächende Wirkung auf den pathologischen Verlauf von linksventrikulärer Hypertrophie zugesprochen wurde, während Paricalcitol das Fortschreiten des Krankheitsverlaufes nicht unterdrücken konnte (INOUE et al., 2021).

Neben den beobachteten transkriptionellen Effekten konnte nicht ausgeschlossen werden, dass der verringerte BACE1-Proteingehalt auf eine veränderte BACE1-Proteinstabilität in Anwesenheit der Vitamin D-Analoga zurückgeführt werden könnte. Die molekulare Stabilität von BACE1 wird unter anderem über die Acetylierung von Lysin-Resten im Lumen des endoplasmatischen Retikulums gewährleistet, welche dann im Lumen des Golgi-Apparates, wenn das Protein vollständig gereift ist, deacetyliert wird (COSTANTINI et al., 2007). Während die Acetylierung die BACE1-Proteinstabilität vermittelt, fördert die Ubiquitinierung von BACE1 dessen lysosomale Degradation (KANG et al., 2012; KANG et al., 2010; KOH et al., 2005). Darüber hinaus kann BACE1 auch über das Ubiquitin-Proteasom System (UPS) abgebaut werden, was in Studien mit dem Proteasom-Inhibitor Lactacystin, durch dessen Behandlung die BACE1-Proteindegradation in Zeit- und Dosis-abhängiger Weise inhibiert wurde, beobachtet wurde (QING et al., 2004). Weiterführend demonstrierten die Autoren, dass das Neuronenspezifische, de-ubiquitinierende Enzym Ubiquitin C-terminale Hydrolase L1 (UCHL1) wesentlich in die proteasomale BACE1-Degradation involviert ist, indem es diese beschleunigt und so Einflüsse auf die APP-Prozessierung und damit die A β -Produktion ausübt (ZHANG et al., 2012). Ein regulierender Effekt von 1,25-Dihydroxyvitamin-Vitamin D₃ auf einige Proteasen und Protease-Inhibitoren wurde bereits beschrieben. So konnte beispielsweise eine durch 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ induzierte Expression des Cysteinprotease-Inhibitors Cystatin D oder ein modulierender Einfluss dieser aktivierten Vitamin D₃-Form auf die Funktion des Ubiquitin-Proteasom-Systems detektiert werden (ALVAREZ-DIAZ et al., 2010).

In Übereinstimmung brachte eine Transkriptomanalyse an Nachkommen von Vitamin D-Mangel-Ratten Veränderungen in Genen, die in den Proteinkatabolismus involviert sind, hervor (MAX et al., 2014). Basierend auf diesen Erkenntnissen, dass Vitamin D in der Lage ist, die proteasomale Degradation von BACE1 zu beeinflussen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch dieser molekulare Einfluss von Vitamin D den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit teilweise zugrunde liegen könnte. Bisher ist in der Literatur noch nicht ausreichend darüber bekannt, ob diese auf die BACE1-Spiegel abzielenden Mechanismen neben Vitamin D selbst auch von Vitamin D-Analoga beeinflusst werden. Eine aktuelle Studie berichtete in diesem Zusammenhang von einer beschleunigten lysosomalen BACE1-Degradation in Paricalcitol-behandelten APP/PS1-transgenen Mäusen.

Die intraperitoneale Injektion von Paricalcitol jeden zweiten Tag über 15 Wochen hinweg bewirkte, übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Arbeit, eine reduzierte A β -Produktion und zusätzlich einen verminderten neuronalen Verlust im transgenen Alzheimermausmodell. Außerdem förderte Paricalcitol den Transport von BACE1 zu den späten Endosomen, was die lysosomale BACE1-Degradation erhöhte (FAN et al., 2019).

In Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen berichteten Briones *et al.* eine 24 %-ige Verringerung des BACE1-Proteingehalts in Ratten, die mit Vitamin D supplementiert wurden (BRIONES, DARWISH, 2012). Zudem bedingte eine siRNS-vermittelte Runterregulierung des VDR in E16 primären kortikalen Neuronen von Ratten erhöhte mRNA- und Proteinmengen von BACE1, was in erhöhten intrazellulären A β_{1-42} -Konzentrationen resultierte (GEZEN-AK et al., 2017). Im Einklang damit detektierten Fan *et al.* kürzlich eine gesteigerte BACE1-Expression in transgenen APP/PS1-Alzheimermodellmäusen, die für 13 Wochen mit einer Vitamin D-Mangeldiät gefüttert wurden (FAN et al., 2020).

Interessanterweise induzierte in dieser Arbeit die *ex vivo* Supplementierung von Vitamin D zu sowohl Vitamin D-Mangel- als auch zu WT-Hirnhomogenaten eine verminderte β -Sekretase-vermittelte Spaltung von APP. Dies lässt vermuten, dass sowohl hypovitaminose als auch Patienten mit suffizientem Vitamin D-Spiegel von einer Supplementierung dieses Secosteroids profitieren könnten.

Neben den Effekten von Vitamin D und seinen Analoga auf die β -Sekretase wurde auch eine signifikant reduzierte Aktivität der γ -Sekretase in Anwesenheit der analysierten Analoga detektiert. Einhergehend damit war die Expression von Nicastrin, welches für die Reifung des γ -Sekretasekomplexes essenziell ist (DRIES, YU, 2008; TAKASUGI et al., 2003), Vitamin D-bedingt signifikant reduziert. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen berichtete eine Studie an E16 primären kortikalen Neuronen der Ratte, die durch Reduzierung der Expression des *VDR*-Gens die genregulatorischen und nicht-transkriptionsregulatorischen Einflüsse von Vitamin D auf die Amyloidpathologie analysierte, ähnliche Ergebnisse. Die Effekte dieser *VDR*-Beeinträchtigung zielten auf Proteinbestandteile der Sekretasen des A β -Metabolismus ab. So wurden unter anderem erhöhte Mengen an *NCSTN*-mRNS detektiert (GEZEN-AK et al., 2017).

Neben diesen transkriptionsregulatorischen Eigenschaften von Vitamin D lieferte die Beobachtung, dass sich der VDR in der neuronalen Plasmamembran in Ko-Lokalisation mit APP, ADAM10 oder Nicastrin befindet, Hinweise dafür, dass dem VDR auch eine komplexe nicht-transkriptionsregulatorische Rolle in der Amyloidpathologie zukommt (DURSUN, GEZEN-AK, 2017).

Der β - und γ -Sekretase-vermittelten APP-Prozessierung steht im A β -Anabolismus die nicht-amyloidogene Prozessierung gegenüber, die durch die α -Sekretase mediiert wird. Die detektierten reduzierten A β -Spiegel in Anwesenheit von Vitamin D oder den analysierten Analoga könnten daher auch durch eine gesteigerte α -Sekretase-Spaltung von APP bedingt worden sein. Der beobachtete Effekt der Vitamin D-Analoga auf die nicht-amyloidogene Prozessierung war im Vergleich zu dem auf die amyloidogene Prozessierung jedoch weniger einheitlich. Lediglich die Inkubation mit Calcifediol und Paricalcitol resultierte in einer gesteigerten nicht-amyloidogenen Spaltung von APP.

Gezen-Ak *et al.* beobachteten im Rahmen ihrer zuvor bereits erwähnten Studie an kortikalen Neuronen mit reduzierter *VDR*-Expression erhöhte mRNS und Proteinmengen der α -Sekretase ADAM10 (GEZEN-AK *et al.*, 2017). Die Behandlung mit der aktivierten Form von Vitamin D₃, Calcitriol, bewirkte in HL-1-Zellen, die von Vorhof-Myokardzellen der Maus abstammen, eine signifikant gesteigerte ADAM10-Genexpression und -Aktivität. In diesem Zusammenhang wurde deutlich, dass die Hochregulierung von ADAM10 in reduzierten Mengen an Rezeptoren für fortgeschrittene Glykationsendprodukte (*receptor for advanced glycation end products*, RAGE) resultiert und somit zu einer verringerten Apoptose von Kardiomyozyten als Folge einer ischämischen Reperfusion führt (LEE *et al.*, 2017). Übereinstimmend damit detektierten Tippmann *et al.* eine Steigerung der *ADAM10*-Promotoraktivität in SH-SY5Y-Zellen, die für 48 Stunden mit Calcitriol behandelt wurden (TIPPMANN *et al.*, 2009). Neben der bereits angesprochenen Ko-Lokalisation des VDR und ADAM10 (DURSUN, GEZEN-AK, 2017), bedingte eine Behandlung mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in kultivierten humanen aortischen glatten Muskelzellen die Translokation von ADAM10 vom Zytoplasma zur Plasmamembran (YANG *et al.*, 2015). Zusammenfassend ist festzuhalten, dass es in der Literatur in bestimmten Zelllinien und -Typen, wie beispielsweise Kardiomyozyten, bereits Hinweise dafür gibt, dass Calcitriol Einflüsse auf ADAM10 ausüben kann. Auf Grund dessen, dass weitere Metalloproteinasen (MMP) der ADAM-Familie als α -Sekretasen identifiziert wurden (ALLINSON *et al.*, 2004; BUXBAUM *et al.*, 1998; KOIKE *et al.*, 1999), sind zusätzliche Studien an 25(OH)-Vitamin D₃- oder Analoga-supplementierten, Vitamin D Mangel- oder VDR-defizienten Zellen notwendig, um einen potenziellen Einfluss von Vitamin D oder seiner Analoga auf die α -Sekretase-vermittelte Prozessierung von APP aufzuklären.

5.1.2.3 Der Effekt von Vitamin D und seinen Analoga auf die Neprilysin-vermittelte A β -Degradation

Neben dem A β -Anabolismus wird auch eine beeinträchtigte A β -Degradation vermutet, zur sporadischen Form der Alzheimererkrankung beizutragen. In dieser Arbeit bedingten Vitamin D und die analysierten Analoga sowohl in murinen Neuroblastomzellen als auch in Proben von Vitamin D-Hypovitaminose-Maushirnen eine signifikante Zunahme der A β -Degradation.

Die detektierten Erhöhungen in der *NEP*-Expression und Neprilysin-Aktivität in Anwesenheit der Vitamin-Analoga deuten an, dass das A β -degradierende Enzym Neprilysin durch Vitamin D und seine Analoga beeinflusst wird. Übereinstimmend damit berichteten auch Briones *et al.* signifikant erhöhte Konzentrationen an Neprilysin *in vivo* anhand 20 Monate alter Ratten, denen 42 Internationale Einheiten 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ pro Kilogramm Körpergewicht über 21 Tage subkutan injiziert wurden. Die Vitamin D-Supplementierung bedingte die signifikante Abnahme der A β -Oligomerisierung im Hippocampus der Ratten (BRIONES, DARWISH, 2012). Auch frühere Studien an nicht-neuronalen Zellmodellen lieferten Hinweise für eine Vitamin D-abhängige Regulierung der Expression sowie der Aktivität von Neprilysin (HOWELL *et al.*, 1993; INDIG *et al.*, 1990). Die in ihrer Stärke verschiedenen Effekte einzelner Vitamin D-Analoga auf die Spiegel von A β und die A β -Degradation könnten dadurch erklärt werden, dass es sich bei der Analyse um eine Momentaufnahme nach 24-stündiger Inkubation mit Vitamin D beziehungsweise Analogon handelte.

Im Fall von Calcifediol beispielsweise wurde die stärkste Reduzierung der A β -Menge innerhalb der analysierten Vitamin D-Formen detektiert (auf 55 %), was erklären könnte, dass die A β -Degradation in diesem Zustand nicht mehr verstärkt stattfinden muss. Übereinstimmend damit resultierte nach identischen Inkubationsbedingungen die im Vergleich zu den anderen Analoga am schwächsten ausgeprägte Steigerung der A β -Degradation in Calcifediol-behandelten Zellen (um 20 %). Anders verhielt es sich bei Maxacalcitol, denn hier war der A β -Spiegel am wenigsten stark reduziert (auf 78 %), die Degradation von A β jedoch um 65 % erhöht. Zudem wiesen diese Ergebnisse darauf hin, dass der Katabolismus nicht isoliert interpretiert werden sollte, da, wie am Beispiel von Maxacalcitol verdeutlicht, auch Effekte auf den Anabolismus den A β -Spiegel beeinflussen.

Zusammenfassend weisen die in dieser Arbeit gewonnenen Daten pleiotrope Mechanismen nach, durch welche Vitamin D und seine Analoga sowohl den Anabolismus als auch den Katabolismus von A β beeinflussen und die in ihrer Gesamtheit zu signifikant reduzierten A β -Spiegeln führen (Abbildung 57). Zudem untermauern sie die Verbindung zwischen der Alzheimererkrankung und Vitamin D und weisen darauf hin, dass eine Supplementierung dieses Secosteroids oder seiner Analoga positive Auswirkungen in der Prävention der Alzheimererkrankung haben könnte.

5.1.2.4 Vergleich der Effektstärken zwischen Vitamin D und seinen Analoga in ihrer protektiven Wirkung hinsichtlich der Amyloidpathologie

Eine zentrale Fragestellung, die in dieser Arbeit adressiert werden sollte und die von Relevanz für den Einsatz von Vitamin D und seinen Analoga in der individualisierten Medizin ist, war darin definiert, ob sich Calcidiol, die Vitamin D₃-Analoga Maxacalcitol, Calcipotriol und Alfacalcidol sowie die Vitamin D₂-Analoga Paricalcitol und Doxercalciferol in der Ausprägung ihrer protektiven Effekte bezüglich der APP-Homöostase voneinander unterscheiden. Im folgenden Abschnitt werden die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit im Hinblick auf diese Fragestellung diskutiert.

In Bezug auf die Reduzierung der Menge an sezerniertem A β wurden für alle analysierten Vitamin D-Analoga vergleichbare Einflüsse beobachtet, lediglich die Effektstärke der zugrundeliegenden Mechanismen unterschied sich partiell. Dies könnte als Indiz dafür interpretiert werden, dass Alzheimerpatienten individuell in unterschiedlichem Ausmaß von den verschiedenen Analoga profitieren könnten. Beispielsweise könnte es sein, dass Patienten mit einer beeinträchtigten A β -Degradation, basierend auf den vorliegenden Ergebnissen, den höchsten Nutzen aus einer Aufnahme der Vitamin D-Analoga Calcipotriol und Maxacalcitol ziehen, da diese die stärksten Effekte auf die Degradation von A β hervorriefen. Hinsichtlich der β - und γ -Sekretase-vermittelten APP-Prozessierung könnten Patienten mit erhöhter amyloidogener Aktivität von allen analysierten Vitamin D-Analoga in ähnlichem Maße profitieren, was durch die einheitliche Datenlage vermutet wird. Diese auf der Evidenzebene der Zellkultur basierenden Hypothesen müssen jedoch zunächst in unterschiedlichen *in vivo* Systemen verifiziert werden.

Allgemein muss zusammenfassend darauf hingewiesen werden, dass die Unterschiede in den Effektstärken sehr gering ausfielen und sich die analysierten Analoga im Hinblick auf die A β -Spiegel alle als vergleichbar protektiv herausstellten. Außerdem wurden keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu einer Supplementierung mit Vitamin D selbst detektiert, was keinen therapeutischen Vorteil der Analoga in Bezug auf die Alzheimererkrankung erkennen lässt.

Daher sollten weitere medizinische Indikationen sowie pharmakologische Aspekte bei der Auswahl des zu verabreichenden Vitamin D-Analogen berücksichtigt werden. Damit verbunden sollten Faktoren wie die Halbwertszeit der einzelnen Analoga im Plasma, die Fähigkeit die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, die VDR-Affinität ebenso wie Resorption, Kompatibilität, Verfügbarkeit und potenzielle Nebenwirkungen beachtet werden (BROWN, 2001; MAZZAFERRO et al., 2014). Vor allem pharmakologische Faktoren sowie die Fähigkeit die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden sind dabei relevanter als die mechanistischen Unterschiede der einzelnen Vitamin D-Analoga. Diese Eigenschaften sollten zukünftig mit Hilfe von *in vivo* Experimenten und klinischen Studien evaluiert werden.

5.1.3 Die Vitamin D-Rezeptor-vermittelte Expressionswirkung von Vitamin D auf Alzheimerpathologie-assoziierte Prozesse

Dieses Kapitel befasst sich mit der Einordnung der Transkriptomanalyse-Ergebnisse von Vitamin D-Hypovitaminose-Mäusen in den Kontext der aktuellen Alzheimerforschung. Die Transkriptomanalyse orientierte sich an den von einer Hypovitaminose D betroffenen Signalwegen, in die die als verändert detektierten Gene involviert sind.

Es wurde bereits einleitend beschrieben, dass es sich bei der Alzheimererkrankung um eine multifaktorielle Erkrankung handelt, bei welcher neben den beiden hauptsächlich pathologischen Merkmalen, den extrazellulären A β -Plaques und den intrazellulären neurofibrillären Bündel, auch weitere wichtige metabolische Prozesse betroffen sind. Zu diesen zählen beispielsweise Neuroinflammation, oxidativer Stress, Lipidhomöostase, G-Protein-vermittelte Signalweiterleitung, Neurogenese und transkriptionelle Regulierung (BERGER et al., 2020; CHIDAMBARAM, CHINNATHAMBI, 2020; GARCIA-VINUALES et al., 2021; IONESCU-TUCKER, COTMAN, 2021; KAO et al., 2020; NUNOMURA, PERRY, 2020; SUNG et al., 2020).

Basierend auf dem protektiven Einfluss von Vitamin D und seinen Analoga auf die molekularen Mechanismen der Amyloidpathologie, detaillierter den reduzierten Anabolismus und gleichzeitig erhöhten Katabolismus von A β , sollte sich im Rahmen dieser Arbeit auf weitere metabolische Prozesse, die von der Alzheimererkrankung betroffen sind, fokussiert werden. Es wurde vorausgehend bereits beobachtet, dass die positiven Auswirkungen auf die A β -Spiegel partiell auf transkriptionsregulatorische Eigenschaften von Vitamin D und seinen Analoga zurückzuführen sind. So wurden beispielsweise die Genexpressionen von *BACE1*, *NCSTN* und *NEP* durch die Anwesenheit der Vitamine verändert.

Auf Grund dessen, dass der VDR, über welchen die Expressionswirkung von Vitamin D vermittelt wird, auch im Gehirn exprimiert wird, sollte weiterführend analysiert werden, ob die Transkription von Genen, die in die vorgehend aufgelisteten Alzheimer-relevanten Prozesse involviert sind, unter den Bedingungen einer milden bis moderaten Vitamin D-Hypovitaminose von circa 23 %, was der Mangelsituation in der älteren Bevölkerung entspricht (ANNWEILER et al., 2010; ANNWEILER et al., 2011), beeinflusst wird. Die Analyse 117 ausgewählter Gene in zwei Mauskohorten und normalisiert gegen vier verschiedene *housekeeping* Gene, um potenziell falsch positive Alzheimer-assoziierte Gene zu exkludieren, resultierte in der Hypovitaminose D-bedingten Veränderung der Transkription von Genen, die der APP-Homöostase, dem oxidativen Stress, der Inflammation, dem Lipidmetabolismus, der Signaltransduktion und der Neurogenese zugeordnet werden können (Abbildung 57).

In den folgenden Kapiteln werden ausschließlich diejenigen Gene diskutiert, die mit einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,1$ verändert waren.

5.1.3.1 Vitamin D-Hypovitaminose und die APP-Homöostase

Hinsichtlich der APP-Homöostase ist bekannt, dass diese hin zu einer erhöhten A β -Plauebildung bei gleichzeitig reduzierter A β -Degradation beeinträchtigt ist (MA et al., 2022; PARONI et al., 2019; ZHANG et al., 2011). Neben einigen anderen Faktoren sind die A β -Spiegel in Alzheimerpatienten auf Grund einer Hochregulierung A β -generierender Enzyme und einer runterregulierten Expression A β -degradierender Enzyme erhöht (HAMPEL et al., 2021a; HOLSINGER et al., 2002; WANG et al., 2010). In dieser Arbeit wurden signifikant reduzierte *Nep*-mRNS Spiegel und signifikant gesteigerte Mengen an *Psm5*-mRNS detektiert. Die reduzierte Expression des für die Zink-Metalloendopeptidase Neprilysin kodierenden Gens *Nep* als Konsequenz der insuffizienten Menge an Vitamin D steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen einer früheren Studie, die eine um 17 % verringerte *Nep*-Expression in Gehirnen von hypovitaminosen Mäusen verglichen zu WT-Maushirnen detektierte (GRIMM et al., 2014). Aus diesem Grund wurde die Analyse der Expression von *Nep*, ebenso wie die von *Park7*, von welchem ebenfalls bereits bekannt war, dass seine Transkription von Vitamin D beeinflusst wird, in diese Arbeit inkludiert, um zu evaluieren, ob die vorliegenden Bedingungen einer 23 %igen Hypovitaminose ausreichend sind, um bekannte transkriptionsregulatorische Veränderungen zu reproduzieren. Dies war im Hinblick darauf, dass sehr wenig über die Rolle von Vitamin D in der Expressionsregulierung im Gehirn bekannt ist, von Wichtigkeit. Durch die Validierung von *Nep* und *Park7* wurde deutlich, dass der gewählte milde bis moderate Vitamin D-Mangel in der Lage ist, die Transkription im Gehirn, und nicht nur in der Leber oder anderen Organen, zu modulieren. Darüber hinaus wurde eine stark verminderte *Nep*-Expression in Mikrogliazellen, die von vierzehn Monate alten PS1/APP-transgenen Mäusen stammen, berichtet (HICKMAN et al., 2008). In einer aktuellen Studie, die Veränderungen der Genexpression im zerebralen Kortex von APP/APLP1/APLP2-dreifach-Knockout Mäusen analysierte, wurde *Nep* als AICD-Zielgen beobachtet (CHA et al., 2022). Zudem wurden die Spiegel an *NEP*-mRNS in einer Metaanalyse als in Alzheimerpatienten verglichen zu Nicht-Alzheimerpatienten signifikant verringert beschrieben (ZHANG et al., 2017b).

In Verbindung mit A β -Plaques kommt es in der Alzheimerpathologie zu einer Akkumulation von aberranten und ubiquitinierten Proteinen (DE VRIJ et al., 2004). Neben der A β -Degradation, an welcher auch NEP beteiligt ist, werden abnormale oder fehlgefaltete Proteine auch durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) degradiert. Beeinträchtigungen dieses Systems führen zur Akkumulation von Proteinen und zu neuronalen Krankheiten wie der Alzheimererkrankung (GADHAVE et al., 2016; LIU et al., 2021; TECALCO-CRUZ et al., 2022). Unter den in dieser Arbeit vorliegenden Bedingungen einer milden bis moderaten Hypovitaminose D war die Expression des Gens *Psm5*, welches für die proteolytische konstitutive Proteasom-Untereinheit Beta 5, die Chymotrypsin-artige Aktivitäten besitzt, kodiert, signifikant gesteigert. Erhöhte Chymotrypsin- und Trypsin- (wird durch die B-Untereinheit B2 kodiert) Aktivitäten wurden in Astrozyten, die für 24 Stunden mit A β 42 behandelt wurden, berichtet (SCHUBERT et al., 2009), was vermuten lässt, dass die Proteasomaktivität im Rahmen der Alzheimerpathologie gesteigert ist.

Zudem wurden Veränderungen der Proteasomfunktion in *post mortem* Hirnproben von Alzheimerpatienten (ABREHA et al., 2018; KECK et al., 2003; KELLER et al., 2000) sowie in verschiedenen Alzheimermausmodellen (ALMEIDA et al., 2006; MLADENOVIC DJORDJEVIC et al., 2021; OH et al., 2005; TSENG et al., 2008) beschrieben. Eine Studie, die sich auf die Analyse der Expression der konstitutiven Proteasom-Untereinheiten in Alzheimermäusen konzentrierte, berichtete übereinstimmend eine gesteigerte $\beta 5$ -(*PSMB5*-) Transkription im Vergleich zu altersgemäßen Kontrolltieren, wobei die Expression in humanen *post mortem* Hirnproben von Alzheimerpatienten verglichen mit gesunden Individuen vermindert war (ORRE et al., 2013).

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit eine signifikant gesteigerte Transkription des Gens *Snca*, welches für das α -Synuclein-Protein kodiert, in murinen Vitamin D-Mangel-Hirnproben detektiert. Es wird vermutet, dass SNCA mit A β interagieren kann und die A β -Aggregation stimuliert (JENSEN et al., 1997; TSIGELNY et al., 2008). Auch in einer aktuellen Studie an Mäusen, die die Pathologien der Alzheimererkrankung und der Lewy-Körper-Demenz rekapituliert (α -Synuclein und APP^{swe}/PS1 Δ E9 exprimierende Mäuse), wurden Wechselwirkungen zwischen α -Synuclein-Pathologie, A β und Neuroinflammation beschrieben (LLOYD et al., 2021). Bezüglich der *in vivo* Situation in Alzheimerpatienten wurde eine gesteigerte *SNCA*-Transkription in peripheren Leukozyten von Alzheimerpatienten im Vergleich zu alters- und geschlechts-gleichen gesunden Individuen berichtet (YOSHINO et al., 2016). Neben dieser Rolle von SCNA in der Alzheimerpathologie wurden auch enge Assoziationen zu den neuropathologischen Kennzeichen der Parkinsonerkrankung sowie der Lewy-Körper-Demenz ausgemacht (LASHUEL et al., 2013; LINNERTZ et al., 2014). Studien an Parkinsonpatienten berichteten von einer negativen Korrelation zwischen den Vitamin D-Konzentrationen und dem Risiko sowie der Schwere der Parkinsonerkrankung. Zudem wurden höhere Vitamin D-Spiegel mit verbesserten kognitiven Funktionen in Parkinsonpatienten in Verbindung gebracht, was die Notwendigkeit zukünftiger Interventionsstudien begründet. Darüber hinaus gibt es Hinweise dafür, dass genetische Polymorphismen im *VDR* in Beziehung zum Risiko, an Parkinson zu erkranken, stehen (LV et al., 2020).

Zusammenfassend weisen die aus der Transkriptionsanalyse muriner hypovitaminoser Hirnproben gewonnenen Daten, welche veränderte Expressionen der Gene *Nep*, *Psmb5* und *Snca* detektierten, darauf hin, dass die APP-Homöostase auf Transkriptionsebene durch einen Mangel an Vitamin D beeinflusst wird. Dieser potenziell kausale und mechanistische Zusammenhang zwischen Hypovitaminose D und beeinträchtigter APP-Homöostase, die als einer der Hauptprozesse in der Alzheimerpathologie gilt, sollte weiterführend mit Hilfe klinischer Studie bestätigt und evaluiert werden.

5.1.3.2 Vitamin D-Hypovitaminose und oxidativer Stress

Zusätzlich zu den Beeinträchtigungen der APP-Homöostase stellt erhöhter oxidativer Stress einen hauptsächlichen Faktor der Alzheimerpathologie dar (EBANKS, CHAKRABARTI, 2022; IONESCU-TUCKER, COTMAN, 2021; SONG et al., 2021a). Unter den in dieser Arbeit gewählten experimentellen Bedingungen wurde eine signifikante Abnahme der *Park7*-Expression in den Hirnproben von Mäusen mit milder bis moderater Vitamin D-Hypovitaminose detektiert.

Das durch *Park7* kodierte, Krebs- und Parkinson-Erkrankung-assoziierte Protein PARK7 agiert als Sensor für oxidativen Stress und ist in neuroprotektive Mechanismen involviert (CLEMENTS et al., 2006; JIN, 2020; SHENDELMAN et al., 2004). In humanen *post mortem* Hirnproben von Alzheimerpatienten wurde eine erhöhte *PARK7*-Expression detektiert (BAULAC et al., 2009). Einhergehend damit berichteten Bader *et al.* in ihrer Massenspektrometrie-basierten *Proteomics*-Analyse der Cerebrospinalflüssigkeit von Alzheimerpatienten erhöhte Spiegel an PARK7 im Vergleich zur Cerebrospinalflüssigkeit von Nicht-Alzheimerpatienten (BADER et al., 2020). Hinsichtlich eines potenziellen Zusammenhangs zwischen oxidativem Stress und Vitamin D wurde berichtet, dass Vitamin D die A β -induzierte Stickoxid-Synthase-Expression VDR-vermittelt verhindern kann (DURSUN et al., 2013). *In vivo* resultierte die Fütterung von Ratten mit einer geringen Menge an Vitamin D (100 IU/kg Futter) in signifikant erhöhten Mengen an PARK7-Protein in Proben der hinteren Hirnrinde im Vergleich zu Ratten, die mit einer Kontroll- (1000 IU/kg Futter) oder hohen Menge an Vitamin D (10.000 IU/kg Futter) gefüttert wurden (KEENEY et al., 2013). Des Weiteren wurde in einer aktuellen Fall-Kontroll-Studie an Patienten der chronisch-obstruktiven Lungenerkrankung (*chronic obstructive pulmonary disease*, COPD) eine Korrelation zwischen pulmonalem PARK7, dem Vitamin D-Rezeptor sowie dem Nrf-2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) beobachtet. Während die Spiegel an PARK7 im Serum und in der Lunge von COPD-Patienten im Vergleich zu gesunden Individuen reduziert waren, konnte auch in der Menge an pulmonalen VDR-positiven Zellkernen eine Abnahme ausgemacht werden (XIANG et al., 2021). Analysen einer Vitamin D-Supplementierung lieferten anhand ihrer Beobachtungen, dass eine dadurch bedingte Aktivierung des VDR in einer hochregulierten *Nrf-2*-Expression resultierte, Hinweise dafür, dass es sich bei Nrf-2 um ein nachgeschaltetes Protein des VDR handelt (DAI et al., 2019).

5.1.3.3 Vitamin D-Hypovitaminose und Inflammation

Die Aktivierung inflammatorischer Signalwege steht in einem Zusammenhang zur Alzheimerpathologie (BOLOS et al., 2017; MCGRATTAN et al., 2019; QIAN et al., 2021b; SHIPPY et al., 2022; SUNG et al., 2020). So wurden beispielsweise kürzlich positive Wirkungen von TREM2 auf A β -Ablagerungen, die A β -abhängige Tau-Pathologie, die kortikale Schrumpfung oder den kognitiven Verfall in Patienten der familiären Alzheimererkrankung beschrieben (MORENAS-RODRIGUEZ et al., 2022). Bei TREM2 handelt es sich um einen zentralen Regulierungspunkt bei der Aktivierung spezialisierter Immunzellen, den Mikroglia, welche im Gehirn zur Bereinigung toxischer Plaques beitragen (PARHIZKAR et al., 2019). Basierend darauf wird die therapeutische Modulierung der TREM2-abhängigen mikroglialen Funktion als mögliche Strategie vermutet, die Progression der Alzheimererkrankung in initialen Erkrankungsstadien zu verlangsamen. In der vorliegenden Arbeit war die Transkription des Gens *Casp4*, welches für das Protein Caspase 4, ein Mitglied der Cystein-Asparaginsäure-Proteasen Familie, kodiert, unter hypovitaminosen Bedingungen signifikant erhöht. Hinsichtlich Alzheimerpathologie ist beschrieben worden, dass die Aktivierung von Caspasen sowie die Caspase-vermittelte Spaltung von APP mit dem A β -induzierten synaptischen Verlust assoziiert ist (PARK et al., 2020). Für den speziellen Fall der Caspase 4 ist bekannt, dass diese in den A β -induzierten Zelltod involviert ist (HITOMI et al., 2004). Zudem wurde in Alzheimermausmodellen eine gesteigerte *Casp4*-Transkription detektiert (KAJIWARA et al., 2016).

Interessanterweise wurde Calcitriol ein ausgleichender Einfluss auf die Inflammation und eine Förderung der A β -Phagozytose *in vitro* zugesprochen (MIZWICKI et al., 2013). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Aktivität der Caspase 4 sowohl durch die Alzheimerpathologie als auch durch Hypovitaminose D beeinflusst werden kann.

Aktuell wurde Vitamin D im Zusammenhang mit Covid-19 als neuroprotektive und neuroreparative Substanz diskutiert. Auf Grund seiner Fähigkeit, die Auswirkungen neuroinflammatorischer Zytokine abzuschwächen, sowie weiterer anti-inflammatorischer und immunmodulatorischer Effekte könnte Vitamin D in der Lage sein, die schädlichen Folgen von Covid-19 im zentralen Nervensystem zu mildern (MENENDEZ et al., 2022). Auch für die neuroinflammatorische Erkrankung Multiple Sklerose wurde ein Zusammenhang zwischen Sonnenlichtexposition und somit Vitamin D-Spiegel und den immunmodulatorischen Effekten, die den Schweregrad der Erkrankung mitbestimmen, berichtet (OSTKAMP et al., 2021).

5.1.3.4 Vitamin D-Hypovitaminose und der Lipidmetabolismus

Neben den bereits diskutierten Prozessen der APP-Homöostase, des oxidativen Stresses sowie der Inflammation, die von der Alzheimerpathologie betroffen sind, scheint diese auch eng mit Veränderungen im Lipidmetabolismus assoziiert zu sein, wie im folgenden Abschnitt diskutiert.

Zusätzlich zu der Tatsache, dass sowohl APP als auch deren prozessierende Enzyme Transmembranproteine sind (DYRKS et al., 1988; HAASS, 2004; HAASS et al., 2012), wurde in der Literatur bereits beschrieben, dass einige Lipidklassen den A β -Anabolismus beeinflussen (GARCIA-VINUALES et al., 2021; GRIMM et al., 2011c; GRIMM et al., 2017a; GRIMM et al., 2013c; GRIMM et al., 2012; HOLMES et al., 2012; RANGACHARI et al., 2018; SIMONS et al., 1998) oder in Alzheimer-*post mortem*-Hirnproben verändert vorlagen (CUTLER et al., 2004; GRIMM et al., 2011a; GRIMM et al., 2011b; HAN et al., 2002; HE et al., 2010; KAO et al., 2020; KATSEL et al., 2007; MOLANDER-MELIN et al., 2005; SODERBERG et al., 1992). Auf die Wechselwirkungen zwischen Alzheimerpathologie und Lipidhomöostase wird in einem späteren Abschnitt der Diskussion (Kapitel 5.1.4) noch detaillierter eingegangen. In dieser Arbeit wurden steigende Einflüsse des Mangels an Vitamin D auf die Expression der beiden Cholesterinhomöostase-assoziierten Gene *Abca1* und *Acat1* in murinen Hirnproben detektiert, wobei die Änderungen in der *Abca1*-Transkription das Signifikanzniveau knapp nicht erreichten. *Abca1* kodiert das Protein ATP-Bindekassette (ABC) Unterfamilie A Mitglied 1, welches eine wichtige Rolle im zellulären Cholesterintransport spielt (CHEN et al., 2022; SCHMITZ, LANGMANN, 2001). In hippokampalen Neuronen von Alzheimerpatienten wurde, übereinstimmend mit den Vitamin D-Mangelbedingungen in der vorliegenden Arbeit, eine gesteigerte Transkription von *ABCA1* detektiert (KIM et al., 2010). Darüber hinaus wurde kürzlich berichtet, dass die ABCA1-vermittelte Cholesterin-Efflux-Kapazität in die Cerebrospinalflüssigkeit in MCI- und Alzheimerpatienten im Vergleich zu kognitiv gesunden Studienteilnehmern reduziert ist. Die Autoren vermuteten basierend auf ihren Daten eine pathophysiologische Rolle des ABCA1-medierten Cholesterintransports in frühen Stadien der Neurodegeneration (YASSINE et al., 2016). Bezüglich eines potenziellen Zusammenhangs zwischen ABCA1 und Vitamin D lieferte die Literatur erste Hinweise, die in Zukunft näher spezifiziert und experimentell adressiert werden sollten.

In einer neueren Querschnittsstudie assoziierten Fujii *et al.* eine hohe Vitaminaufnahme über die Nahrung signifikant mit einer verminderten Methylierung von *ABCA1*. Die Autoren vermuteten, dass die analysierten Vitamine (Vitamin A, β -Carotin, Folsäure, Vitamin C, Vitamin D und Vitamin E) so indirekt ihre protektive Wirkung auf den HDL- (*high density lipoprotein*-) Cholesterin-Metabolismus ausüben könnten (FUJII *et al.*, 2019).

Das Gen *Acat1* kodiert für die Acetyl-CoA-Acetyltransferase 1 (ACAT1). Acetoacetyl-CoA kann weiterführend durch die HMG-CoA-Synthase metabolisiert werden, was in der Entstehung von 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA resultiert, das weiter zu Cholesterin metabolisiert werden kann, welches eng mit der Alzheimerpathologie in Verbindung steht (GRIMM *et al.*, 2013c; SONG *et al.*, 2021b; STAURENGHI *et al.*, 2021). Obwohl das Gehirn nur circa 2 % des Körpergewichtes ausmacht, beinhaltet es 25 % der gesamten Cholesterinmenge (FERINGA, VAN DER KANT, 2021), wobei der Großteil auf Grund der Blut-Hirn-Schranke *de novo* im zentralen Nervensystem synthetisiert wird (VANCE *et al.*, 2005). Auf Grund seiner Rollen in der Membranfluidität, Vesikelbildung und synaptischen Transmission ist Cholesterin für die neuronale Funktion essenziell (BJORKHEM, MEANEY, 2004). Unter physiologischen Bedingungen wird überschüssiges Cholesterin zu Cholesterinestern esterifiziert, welche in Form eines Neutrallipides zusammen mit TAG in Lipidtröpfchen gespeichert werden und deren Gehalt im Gehirn von Alzheimerpatienten erhöht ist (CHAN *et al.*, 2012; ZHANG, LIU, 2015). Während die Cholesterinspiegel im Gehirn positiv mit dem Schweregrad der Alzheimererkrankung korrelieren (CUTLER *et al.*, 2004), wurden innerhalb seniler Plaques in menschlichen Gehirnen gesteigerte Cholesterinmengen detektiert (MORI *et al.*, 2001). Zudem wurde beschrieben, dass erhöhte Spiegel an Cholesterin die A β -Produktion steigern, indem sie die Aktivitäten von β - und γ -Sekretase erhöhen (MARZOLO, BU, 2009), während reduzierte Konzentrationen dieses Lipids die A β -Freigabe sowohl *in vitro* als auch *in vivo* stark reduzieren (BURG *et al.*, 2013; FASSBENDER *et al.*, 2001; GRIMM *et al.*, 2008; REFOLO *et al.*, 2001). Dies könnte mit der Lokalisierung von Cholesterin in speziellen Mikrodomänen (*Lipid Rafts*) zusammenhängen, in welchen die amyloidogenen Sekretasen lokalisiert sind und auf die in einem späteren Kapitel detaillierter eingegangen wird (Kapitel 5.1.4.1). In dieser Arbeit bedingten die reduzierten Vitamin D-Spiegel eine signifikante Zunahme der *Acat1*-Expression in murinen Hirnproben, was in gesteigerten Cholesterin- und letztendlich A β -Konzentrationen resultieren könnte. Hinsichtlich des Alzheimerisikos wurde beschrieben, dass dieses durch hohe Cholesterinspiegel im mittleren Lebensalter um das fast Dreifache erhöht sein kann (PROITSI *et al.*, 2014).

Zudem könnte die gesteigerte *Abca1*-Transkription unter den vorliegenden experimentellen Bedingungen potenziell durch die erhöhte *Acat1*-Expression und damit einhergehend veränderte Cholesterinhomöostase erklärt werden, da Cholesterin selbst in der Lage ist die *Abca1*-Genexpression zu steigern (SCHMITZ, LANGMANN, 2001). Vitamin D wurde auf molekularer Ebene schon früh eine regulierende Rolle auf die Cholesterinsynthese zugesprochen, welche durch dessen Interaktion mit der HMG-CoA-(3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzym A-) Reduktase, dem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym der Cholesterinbiosynthese, vermittelt wird (GUPTA *et al.*, 1989b). Heutzutage zählen cholesterinsenkende Medikamente zu den am häufigsten verschriebenen Pharmaka, wobei 90 % davon Statine ausmachen, für welche einige Nebenwirkungen bekannt sind (PATEL *et al.*, 2022).

Die verschiedenen Statine Atorvastatin, Cerivastatin, Fluvastatin, Lovastatin, Pravastatin, Simvastatin, Rosuvastatin und Pitavastatin reduzieren die Serumkonzentrationen an LDL im Durchschnitt um circa 40 % (SCHACHTER, 2005). In Bezug auf den Einfluss einer Vitamin D-Supplementierung auf den Spiegel an LDL berichtete eine aktuelle Metaanalyse eine standardisierte mittlere Differenz (SMD), welche ein Effektmaß für kontinuierliche Endpunkte darstellt, von -0,12 zwischen Ausgangsniveau und Nachbeobachtung der Vitamin D-Supplementierung, wobei das 95 %-Konfidenzintervall -0,23 bis -0,01 umfasste. In der Metaanalyse wurden 41 RCT-Studien inkludiert, die insgesamt 1699 Vitamin D- und 1735 Placebo-supplementierte Teilnehmer einschlossen (DIBABA, 2019). Eine neuere Metaanalyse von RCT-Studien zur Vitamin D-Supplementierung in Frauen nach der Menopause beschrieb Einflüsse der Intervention auf das mit koronaren Herzerkrankungen assoziierte Lipidprofil in Form von reduzierten Triglyzeridspiegeln, wobei die Effekte von Vitamin D auf die Cholesterinspiegel laut Autoren klinisch vernachlässigbar waren (ZHANG et al., 2022). Diese klinischen Studien müssen jedoch auf Grund der kontroversen Datenlagen, welche beispielsweise durch unterschiedliche Interventionen in Form von verschiedenen Dosen an supplementiertem Vitamin D bedingt werden könnten, vorsichtig interpretiert werden. Jedoch sollten die reduzierenden Einflüsse von Vitamin D auf Triglyzeride und LDL-Cholesterin sowie die steigernden Effekte dieses Secosteroids auf HDL-Cholesterin in künftigen Studien analysiert werden, wobei auch potenzielle Einflüsse therapeutisch eingesetzter Vitamin D-Derivate inkludiert werden sollten. Ziel wäre es, Vitamin D oder Analoga allein oder in Kombination mit weiteren bioaktiven Substanzen zum therapeutischen Einsatz kardiovaskulärer Erkrankungen zu finden, bei denen die Effektstärke der Cholesterinsenkung der Statine-vermittelten Effektstärke entspricht und gleichzeitig die Nebenwirkungen von Statinen umgangen werden könnten. Zusammenfassend weisen die in der vorliegenden Arbeit detektierten Hypovitaminose D-vermittelten Veränderungen von Lipidmetabolismus-assoziierten Genen auf eine weitere, potenziell mechanistische Verbindung zwischen Vitamin D und neurodegenerativen Krankheiten, speziell der Alzheimererkrankung hin. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mittels Massenspektrometrie-basiertem *Lipidomics*-Ansatz weitere Hinweise dafür, dass Vitamin D über Veränderungen der zellulären Lipidhomöostase Einflüsse auf die Alzheimerpathologie ausüben kann, geliefert, welche folgend in Kapitel 5.1.4 diskutiert werden.

5.1.3.5 Vitamin D-Hypovitaminose und die Signaltransduktion

Guaninnukleotid-bindende Proteine (G-Proteine) sind heterotrimere Proteine, die aus $G\alpha$ -, $G\beta$ - und $G\gamma$ -Untereinheiten bestehen und eine Funktion in der Signaltransduktion haben. Sie besetzen auf Grund ihrer Fähigkeit Guanosin-Triphosphat (GTP) zu binden und zu Guanosin-Diphosphat (GDP) zu hydrolysieren eine Schlüsselposition in der Signaltransduktion (MCCUDDEN et al., 2005). In dieser Arbeit wurde unter Hypovitaminose D-Bedingungen eine signifikante Abnahme der *Gnb5*-Expression detektiert. *Gnb5* kodiert für die G-Protein-Untereinheit $\beta 5$, die ein Heterodimer mit der γ -Untereinheit formt und die α -Untereinheit reguliert. In APOE3/4- und APOE4/4-tragenden Alzheimerpatienten wurde ebenfalls eine reduzierte Transkription des G-Protein-Signalmoleküls GNB5 beschrieben (XU et al., 2007).

Basierend darauf, dass G-Protein-gekoppelte Rezeptoren als wichtige potenzielle Angriffspunkte für medikamentöse Behandlungsmöglichkeiten neurodegenerativer Erkrankungen, wie beispielsweise die Alzheimererkrankung, gelten (CHIDAMBARAM, CHINNATHAMBI, 2020; COPENHAVER, KOGEL, 2017; FRANCO et al., 2017; HUANG et al., 2017) und dass G-Protein-vermittelte Signaltransduktionspfade diese Rezeptoren inkludieren, könnte vermutet werden, dass eine Vitamin D-Supplementierung über ähnliche potenziell positive Mechanismen wirken könnte.

5.1.3.6 Vitamin D-Hypovitaminose und die Neurogenese

Auch kognitive Beeinträchtigungen gelten als klinisches Merkmal der Alzheimererkrankung und in diesem Zusammenhang können Beeinträchtigungen der Neurogenese Relevanz für die Progression der Alzheimerpathologie besitzen (BERGER et al., 2020; HAUGHEY et al., 2002; ISAEV et al., 2019; SUNG et al., 2020). In der vorliegenden Arbeit wurde in Maushirnen mit milder bis moderater Vitamin D-Hypovitaminose im Vergleich zu Kontrollproben eine signifikant verringerte Expression des Gens *Plat* detektiert. Das Gen kodiert den gewebespezifischen Plasminogenaktivator (t-PA), welcher Plasminogen zu Plasmin konvertiert und eine wichtige Rolle in der Zellmigration und der Gewebeumgestaltung während der Entwicklung und Regeneration spielt (SAPPINO et al., 1993). Anhand A β -behandelter primärer kortikaler Neurone wurde bereits beschrieben, dass A β -Aggregate, im Gegensatz zu nicht-aggregiertem A β , die mRNA-Menge von *tPA* erhöhten. Zudem wurde in dieser Studie berichtet, dass Plasmin A β degradiert und dessen neurotoxische Wirkung inhibiert (TUCKER et al., 2000). Die in der vorliegenden Arbeit unter Vitamin D-Mangelbedingungen detektierte verminderte *Plat*-Transkription könnte somit ebenfalls zu den bereits für diese Hypovitaminose D-Bedingungen beschriebenen erhöhten A β -Spiegeln (GRIMM et al., 2014) beitragen. Darüber hinaus könnte die verringerte Plasminogenaktivator-katalysierte Proteolyse im neuronalen Gewebe die neuronale Plastizität und die synaptische Reorganisation beeinflussen (SAPPINO et al., 1993), was zu den kognitiven Beeinträchtigungen, die in Vitamin D-Mangel-Patienten beschrieben wurden, beitragen könnte (ANNWEILER et al., 2009; DICKENS et al., 2011; ETGEN et al., 2012; LEMIRE et al., 2018; VAN DER SCHAFT et al., 2013).

Zusammenfassend verdeutlichen die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten, dass Gene, deren Expression durch eine Hypovitaminose beeinflusst wird, auch in verschiedene metabolische Signalwege involviert sind, die für eine physiologische Hirnfunktion wichtig sind und alle einen synergistischen Effekt auf die Alzheimererkrankung besitzen.

5.1.4 Der Einfluss einer Hypovitaminose D auf den Metabolismus Alzheimer-assoziierter Lipide

Die Analyse der transkriptionsregulatorischen Wirkung von Vitamin D auf Prozesse, die mit der Entstehung und Progression der Alzheimererkrankung in Verbindung stehen, lieferte Hinweise darauf, dass diesem Secosteroid eine Rolle im Lipidmetabolismus zukommt. In Hirnproben von Mäusen mit mildem bis moderatem Vitamin D-Mangel war die Expression von Genen, die für Proteine kodieren, welche in den Cholesterin-Metabolismus involviert sind (*Abc1* und *Acat1*), verändert (Kapitel 4.1.2). Im Einklang damit wurde in der Literatur ein wichtiger Einfluss von Vitamin D auf die Regulierung der Lipidhomöostase berichtet (ALISIO et al., 1997; THOMPSON, DELUCA, 1964; TSUTSUMI et al., 1985). Ein Großteil der in diesem Zusammenhang verfügbaren und neueren Studien beschrieb diesen potenziellen Einfluss von Vitamin D auf den Lipidmetabolismus im gastrointestinalen System, im Serum, in der Leber sowie in Nierenzellen oder Nierengewebe (CHALLOUMAS, 2014; CHATTERJEE et al., 2020a; JAHN et al., 2019; MARTINEZ-SENA et al., 2020; WANG et al., 2016). Jedoch ist über eine mögliche Verbindung dieser Art im Gehirn erst wenig bekannt. Dabei ist die Hirn-Lipidhomöostase eine essenzielle Komponente für die Entwicklung neurodegenerativer Krankheiten, wie beispielsweise die Alzheimererkrankung. Auf Grund dessen, dass es sich bei APP, dessen Spaltung in der zerebralen Akkumulierung des neurotoxischen A β zu senilen A β -Plaques resultiert, um ein Typ 1-Transmembranprotein handelt, findet diese Prozessierung in Membranen statt. Darüber hinaus sind die Proteasen, die für die proteolytische Prozessierung verantwortlich sind und als α -, β - und γ -Sekretase bezeichnet werden, membrangebundene Proteine, wobei die γ -Sekretase ihr aktives Zentrum innerhalb der hydrophoben Membrenumgebung besitzt (DYRKS et al., 1988; HAASS, 2004; HAASS et al., 2012). Diese Spaltung von Transmembranproteinen durch Intramembranproteasen, die in der Freisetzung löslicher Proteinfragmente in den Extrazellulärraum sowie in das Zytosol resultiert, wird als regulierte intramembrane Proteolyse (RIP, engl. *regulated intramembrane proteolysis*) bezeichnet und stellt einen wichtigen Signalmechanismus für eine Vielzahl biologischer Prozesse dar (LEE, CH'NG, 2020). Während der RIP werden Typ 1-Transmembranproteine initial durch Sheddasen innerhalb ihrer Ektodomäne gespalten und anschließend innerhalb ihrer Transmembrandomäne durch beispielsweise die γ -Sekretase. Neben APP stellen Notch-Rezeptoren die am besten charakterisierten Substrate für die γ -Sekretase-vermittelte RIP dar (ESCAMILLA-AYALA et al., 2020). Auch für die Rückkopplungs-Inhibierung der Synthese und Aufnahme von Cholesterin spielt die RIP eine essenzielle Rolle (YE, 2020), da Cholesterin die RIP von SREBP (engl. *sterol regulatory element-binding proteins*), einem Hauptregulator der Cholesterin- und Fettsäure-Homöostase in Säugetierzellen (DEBOSE-BOYD, YE, 2018; YE, DEBOSE-BOYD, 2011), inhibieren kann (BROWN, GOLDSTEIN, 2009). Die RIP von SREBP wird durch die beiden Proteasen S1P (engl. *site-1 protease*) und S2P (engl. *site-2 protease*) vermittelt und resultiert darin, dass die N-terminale Domäne von SREBP in den Nukleus gelangt und die Transkription aller Gene für die Cholesterinsynthese und -Aufnahme aktiviert (HORTON et al., 2003).

Basierend auf den Erkenntnissen über eine Verbindung zwischen Vitamin D und der Lipidhomöostase in Organen, wie beispielsweise den Nieren, sowie den Hinweisen für einen transkriptionsregulatorischen Einfluss von Vitamin D auf den Metabolismus von Cholesterin, wurden in der vorliegenden Arbeit mittels semiquantitativem *Lipidomics*-Ansatz potenzielle Veränderungen weiterer Lipidspezies in einem neurozellulären und murinen Modell einer Vitamin D-Hypovitaminose analysiert.

Von diesen Lipidspezies ist bekannt, dass sie von der Alzheimerpathologie betroffen sind. In den folgenden Abschnitten werden die detektierten Einflüsse von Calcitriol, der aktiven Form von Vitamin D₃, auf die Homöostase von Lipiden, denen eine Relevanz in der Alzheimererkrankung zukommt, in den Kontext der aktuellen Literatur eingeordnet.

Hinsichtlich der murinen Proben muss die Analyse der gesamten Hirnhomogenate als potenzielle Limitierung berücksichtigt werden, die keine Unterscheidung zwischen einzelnen Hirnregionen zulässt. An dieser Stelle wird zudem auf die detaillierte Beschreibung der Vor- und Nachteile der angewendeten *Shotgun Lipidomics*-Analyse in Kapitel 3.2.4.3 verwiesen. Die Wahl des *in vitro* Modells fiel auf wildtypische Neuroblastomzellen (SH-SY5Y-Zellen), da circa 95 % aller Alzheimerfälle der sporadischen Form angehören und nur 5 % familiär, genetisch durch Mutationen in den Genen *APP* oder *PS*, bedingt sind (MASTERS et al., 2015). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die Einflüsse bioaktiver Substanzen auf diejenigen Alzheimerpathologie-assoziierten Prozesse analysiert werden, die den Großteil der Alzheimerpatienten betreffen. Aus diesem Grund wurde sich bewusst gegen die Verwendung eines Alzheimer-Zellkulturmodells, wie beispielsweise SH-SY5Y-Zellen, welche stabil APPswe überexprimieren, entschieden. Für Acitretin konnte jedoch gezeigt werden, dass die Supplementierung verschiedener bioaktiver Substanzen *in vivo* auch bei der familiären Form der Alzheimererkrankung Einflüsse auf den Lipidmetabolismus hat.

In der vorliegenden Arbeit wurde sich auf die drei Lipidklassen Phospholipide, Carnitine und Triglyzeride fokussiert, da detaillierte Informationen über einen potenziellen Einfluss von Vitamin D auf diejenigen Lipidspezies, die wichtige Rollen in der zellulären Membran spielen und dadurch die proteolytische Prozessierung von APP beeinflussen oder in den Energiemetabolismus involviert sind, noch nicht erforscht sind. Durch Prozessierung der Daten wurden weiterführend Einblicke in die molekularen Einheiten, wie beispielsweise die Sättigung oder Kettenlänge der an das Rückgrat gebundenen Fettsäuren, ermöglicht.

Im Allgemeinen resultierte ein Mangel an Calcitriol in erhöhten Phospholipidspiegeln sowie in Veränderungen der Lipide, die in den zellulären Energiemetabolismus involviert sind. Im Folgenden werden die, in der vorliegenden Arbeit mittels massenspektrometrischer Analyse detektierten, Hypovitaminose D₃-vermittelten Änderungen in der Lipidhomöostase den Modulationen im Alzheimer-assoziierten Lipidmetabolismus gegenübergestellt und in die aktuelle Literatur eingeordnet. Eine detaillierte Übersicht darüber, wie die Homöostasen der analysierten Lipidklassen mit der neurodegenerativen Alzheimererkrankung assoziiert sind, wird darüber hinaus in Kapitel 5.2 gegeben, worauf an dieser Stelle hingewiesen werden soll.

5.1.4.1 Der Einfluss einer Vitamin D-Hypovitaminose auf Phospholipide

Hinsichtlich Phosphatidylcholinen (PCaa) wurde in Plasmaproben von Alzheimerpatienten ein veränderter PC-Metabolismus detektiert, der sich durch signifikant reduzierte Spiegel der PUFA-gebundenen Spezies PC 16:0/20:5, PC 16:0/22:6 und PC 18:0/22:6 äußerte (WHILEY et al., 2014). Außerdem wurden veränderte Plasma-PCs als mögliche prognostische Biomarker für die Alzheimerprogression diskutiert, da Blasko *et al.* eine signifikante Erhöhung von fünf Phospholipidspezies, auf die an späterer Stelle näher eingegangen wird, in Patienten, die von kognitiver Gesundheit zur Alzheimererkrankung fortschritten, detektierten (BLASKO et al., 2021).

In der vorliegenden Arbeit war die Gesamtmenge an PCaa-Spezies im zellulären Vitamin D-Mangel-Modell signifikant erhöht, was auch *in vivo* durch gesteigerte PCaa-Spiegel in hypovitaminosen Maushirnen verifiziert werden konnte. Interessanterweise wurde eine Zunahme jeder einzelnen, analysierten PCaa-Spezies in den Calcitriol-Mangel-SH-SY5Y-Zellen detektiert, was einen direkten Einfluss von 1,25-dihydroxyliertem Vitamin D₃ auf diese Lipidklasse vermuten lässt.

Des Weiteren teilen diejenigen PCaa-Spezies, die in dieser Arbeit unter Vitamin D-Mangelbedingungen als erhöht beobachtet wurden, strukturelle Ähnlichkeiten mit denen, die Blasko *et al.* in den Plasmaproben von 48 MCI-Patienten verglichen mit gesunden Individuen in ihrer sieben- bis neunjährigen Nachfolgestudie als mögliche Biomarker identifizierten: PCaa C32:1, PCaa C34:1 und PCaa C42:1 in Patienten, die von einer MCI- zu einer Diagnose der Alzheimererkrankung fortschritten (BLASKO *et al.*, 2021), verglichen mit PCaa C34:2, PCaa C34:3, PCaa C42:0 und PCaa C42:1 unter Hypovitaminose D-Bedingungen.

In diesem Kontext soll erwähnt werden, dass mindestens zwei Parameter in jeder Lipidspezies miteinander verglichen werden können, wobei es sich um die Kettenlänge und den Sättigungsgrad handelt. Aus diesem Grund sollten Lipidspezies mit verschiedenen Längen und Saturierungen unterschiedlich betrachtet werden. Jedoch lassen die vorliegenden Ergebnisse vor dem Hintergrund der aktuellen Literaturlage einen direkten Einfluss von Vitamin D auf die Lipidhomöostase, die in die Alzheimerprogression involviert ist, vermuten. Einhergehend mit diesen Hinweisen berichtete eine kürzlich veröffentlichte Studie eine Relevanz des VDR für den Lipidmetabolismus, spezieller die Phospho- und Glycerolipid-Homöostase, in kultivierten humanen Hepatozyten. Die Aktivierung des VDR mittels Calcitriol resultierte in einer signifikant veränderten PC-Homöostase, die sich beispielweise durch gesteigerte PC (16:0/14:1)-Spiegel und gleichzeitig reduzierte Mengen an PC (20:4/20:3) äußerte. Auf Grund dessen, dass manche PC-Spezies nach Calcitriolbehandlung vermehrt und andere vermindert vorlagen, schlussfolgerten die Autoren, dass Vitamin D eine Remodellierung der PC-Gesamtmenge induzieren könnte. Die zusätzlich durchgeführte Transkriptionsanalyse zeigte, dass ein Fünftel derjenigen Gene, deren Expression durch den VDR reguliert werden kann, in Verbindung mit Lipidsignalwegen, wie dem Glycerolipid- oder Phospholipid-Metabolismus oder der Aufnahme von Fettsäuren, steht (MARTINEZ-SENA *et al.*, 2020). In Übereinstimmung damit wurden auch unter den in der vorliegenden Arbeit gewählten experimentellen Bedingungen Effekte der Calcitriolbehandlung auf die Genexpression detektiert. Zur Validierung der Aufnahme von Calcitriol durch die Neuroblastomzellen, wurde die Expression des Gens *IL-34* analysiert. Die bereits beschriebene gesteigerte *IL-34*-Transkription in SH-SY5Y-Zellen nach Behandlung mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (ZHANG *et al.*, 2017a) wurde auch in der vorliegenden Arbeit, abgebildet durch eine 1,5-fach erhöhte Expression im Vergleich zu Lösungsmittel-behandelten Zellen, detektiert. Darüber hinaus wurde in Hirnproben von Mäusen mit einer milden bis moderaten Hypovitaminose D eine veränderte Expression der Lipidmetabolismus-assoziierten Gene *Abca1* und *Acat1* detektiert (Kapitel 4.1.2). Diese transkriptionsregulatorische Wirkungsweise von Vitamin D könnte eine molekulare Perspektive darstellen, durch welche die beobachteten Änderungen der zellulären Lipide vermittelt werden könnten. Aus diesem Grund sollte eine Analyse derjenigen Gene, die in den Metabolismus von unter anderem Phospholipiden, Carnitinen und Triglyzeriden involviert sind, unter An- und Abwesenheit von Vitamin D Gegenstand weiterer Forschung sein.

Darüber hinaus sollten neben diesen potenziellen genregulatorischen Effekten auf die Lipidhomöostase auch nicht-transkriptionsregulatorische Einflüsse von Calcitriol auf zelluläre Membranen, welche bereits beschrieben wurden (ZMIJEWSKI, CARLBERG, 2020), detaillierter aufgeklärt werden.

Der Mangel an Calcitriol bedingte in den SH-SY5Y-Zellen eine signifikante Zunahme derjenigen PCaa-Spezies, die gesättigte Fettsäuren (SFA) enthalten, und gleichzeitig tendenziell reduzierte Spiegel an Spezies, die einfach- und mehrfach-ungesättigte Fettsäuren (MUFA und PUFA) enthalten. Ähnliche Beobachtungen wurden auch in einer kürzlich veröffentlichten Studie gemacht, welche sich auf die Analyse des Fettsäure-Metabolismus in einem Vitamin D-Mangel-Rattenmodell konzentrierte. Übereinstimmend mit den in der vorliegenden Arbeit generierten Daten wurden höhere Gesamt-SFA-Plasmaspiegel sowie verminderte Mengen an MUFA in der Hypovitaminose D-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe detektiert (NANDI et al., 2019). Eine aktuelle Studie, die die diätische Aufnahme von Fetten in mehr als 2000 älteren Erwachsenen analysierte und deren potenziellen Auswirkungen auf die kognitiven Leistungen evaluierte, berichtet, dass mehrfach-ungesättigte Fettsäuren in der Nahrung mit einem verringerten Risiko für kognitive Beeinträchtigungen assoziiert seien. Weiter vermuteten die Autoren, dass diese positive Beziehung zwischen diätetischer Aufnahme von mehrfach-ungesättigten Fettsäuren und kognitiven Beeinträchtigungen teilweise über die Reduzierung von oxidativem Stress vermittelt werden könnte (LIU et al., 2022). Basierend auf diesen Erkenntnissen sollte die Analyse eines möglichen Einflusses von Calcitriol auf die Desaturasen im Gehirn Gegenstand weiterer Forschung sein, was vor allem darin begründet ist, dass die Anwesenheit von gesättigten Fettsäuren die Struktur der Zellmembran beeinträchtigen und ihre Fluidität herabsetzen kann (YANG et al., 2014). Die Membranfluidität ist negativ mit den molekularen Alzheimermechanismen verbunden, was beispielsweise daran deutlich wird, dass eine Anreicherung der zellulären Membran mit PUFA, was eine erhöhte Membranfluidität bedingt, die nicht-amyloidogene Spaltung von APP durch die α -Sekretase fördert (YANG et al., 2011). Somit lassen die gewonnenen Daten vermuten, dass Vitamin D auch durch Beeinflussung des Phospholipidmetabolismus einen generellen Effekt auf die APP-Homöostase haben könnte.

Darüber hinaus stellen Phospholipide eine der Hauptkomponenten von *Lipid Rafts* innerhalb der Zellmembran dar, bei welchen es sich um dynamische Strukturen handelt, die für zelluläre Prozesse wie beispielsweise die Lipid-/Protein-Sortierung, die Signaltransduktion oder die Zelladhäsion relevant sind. Sowohl die strukturelle Integrität als auch die Funktion dieser *Lipid Rafts* sind, zumindest teilweise, von der Phospholipidkomposition abhängig (KAO et al., 2020). Interessanterweise zählen gesättigte Fettsäuren neben Sphingolipiden und Cholesterin zu den charakteristischen Lipiden innerhalb von *Lipid Rafts* (PIKE, 2006). Einhergehend ist das Fettsäureprofil von *Lipid Rafts* durch reduzierte ω -3-PUFA- und MUFA-Spezies charakterisiert (MARIN et al., 2016; MARTIN et al., 2010). Die detektierten erhöhten Mengen an gesättigten Fettsäuren unter Hypovitaminose D-Bedingungen könnten somit auf ein vermehrtes Auftreten von *Lipid Rafts* innerhalb der Membranen hindeuten. Auf Grund dessen, dass in *Lipid Rafts* der Großteil der Proteine, die in die synaptische Transmission involviert sind, sowie die amyloidogenen Sekretasen lokalisiert sind (SEBASTIAO et al., 2013; SEZGIN et al., 2017), könnte die beobachtete Hypovitaminose D-vermittelte Zunahme der Phospholipide mit gesättigten Fettsäuren eine Verschiebung von der nicht-amyloidogenen hin zur amyloidogenen APP-Prozessierung bedingen.

Die amyloidogene Prozessierung findet innerhalb der Membranen dieser Mikrodomänen statt (CHENG et al., 2007; EHEHALT et al., 2003) und die potenzielle Steigerung dieser Art der APP-Spaltung äußert sich in den bereits beschriebenen erhöhten A β -Spiegeln unter Vitamin D-Mangelbedingungen. Auf Grund dessen, dass die Amyloidogenese in Verbindung mit der Lipidkomposition von *Lipid Rafts* steht, sind diese Bereiche der Membran eng mit der Alzheimererkrankung oder anderen neurodegenerativen Krankheiten assoziiert (EL GAAMOUCHE et al., 2016; SCHENGRUND, 2010). In diesem Kontext sollte außerdem erwähnt werden, dass selbst geringe Änderungen in der Lipidhomöostase, wie sie beispielsweise in Folge der Lipid-modulierenden Eigenschaften von Vitamin D in der vorliegenden Arbeit detektiert wurden, mit der APP-Pathologie und somit der Alzheimererkrankung assoziiert werden können (ZINSER et al., 2007). So wurde beispielsweise für Cholesterin beschrieben, dass kleine Steigerungen im Cholesterinspiegel des zentralen Nervensystems die Menge an A β signifikant erhöhen (REFOLO et al., 2000) sowie Einfluss auf die Aktivität der γ -Sekretase nehmen können (WAHRLE et al., 2002). Darüber hinaus wurden *Lipid Rafts* als Plattformen für Interaktionen zwischen A β und ApoE beschrieben und es wurde beobachtet, dass sie die Bildung von A β -Fibrillen auslösen können (KAWARABAYASHI et al., 2004; OKADA et al., 2008). Einhergehend wurden Veränderungen im Sättigungsverhältnis von Phospholipid-Acyllipiden im entorhinalen und frontalen Kortex während frühen Stadien der Alzheimererkrankung detektiert (FABELO et al., 2014; MARIN et al., 2016; MARTIN et al., 2010), was vermuten lässt, dass *Lipid Rafts* das potenzielle Zentrum für einen veränderten Lipidmetabolismus in frühen Krankheitsstadien darstellen. Darüber hinaus könnten *Lipid Rafts* in räumlicher Hinsicht eine Rolle in der Initiierung der inflammatorischen Antwort in Gliazellen spielen, die den Cholesterin- und Sphingolipidmetabolismus involviert (MILLER et al., 2020).

Zusätzlich zur Klasse der Phosphatidylcholine waren auch die Spiegel an PC-Plasmalogenen sowohl in zellulären als auch murinen Hypovitaminose D₃-Proben signifikant erhöht. Auf die physiologische Funktion der Plasmalogene sowie ihre Rolle in der Alzheimerpathologie wird an späterer Stelle detailliert eingegangen (Kapitel 5.2). Übereinstimmend mit den detektierten Unterschieden in den PCae-Spezies, waren auch hier, bedingt durch den Mangel an Calcitriol, die Verhältnisse der Fettsäuren (SFA/MUFA und SFA/PUFA) verändert sowie die Menge an PCae-Spezies, die mittelkettige Fettsäuren enthalten, signifikant reduziert. Diese beobachtete Zunahme an Plasmalogenen könnte auf Grund ihrer anti-neuroinflammatorischen und anti-amyloidogenen Eigenschaften (IFUKU et al., 2012) möglicherweise als Gegenregulierung interpretiert werden, da in der Literatur bereits negative Einflüsse einer insuffizienten Vitamin D-Versorgung auf inflammatorische Prozesse im Gehirn sowie auf den A β -Metabolismus beschrieben sind (GRIMM et al., 2014; YIN, AGRAWAL, 2014).

Lyso-Phosphatidylcholine, welche unter anderem die Transportform von Lipiden repräsentieren, stammen hauptsächlich aus dem Phospholipase A₂-(PLA₂-) medierte Umsatz von Phosphatidylcholinen. Dies ist bei der Interpretation von Veränderungen in Lyso-PC-Spiegeln von Wichtigkeit, denn werden diese beispielsweise in Serumproben detektiert, so lässt sich dies größtenteils auf ihre Funktion im Lipidtransport zurückführen, während Zu- oder Abnahmen in anderen Gewebebeziehungweise Probenarten eher auf eine beeinflusste PLA₂-Aktivität hinweisen könnten. Lyso-PC werden in der Literatur als positiv mit neurodegenerativen und kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert beschrieben (LAW et al., 2019).

So wurde beispielsweise eine Verbindung zu Multipler Sklerose berichtet, welche auf die pro-inflammatorischen Eigenschaften der Lyso-PC zurückgeführt wurde (ZAHEDNASAB et al., 2014). Hinsichtlich Alzheimerpathologie wurde berichtet, dass Lyso-PC die Prozesse der Oligomer-Bildung von A β ₁₋₄₂-Peptiden steigern und so den neuronalen apoptotischen Zelltod erhöhen. Zudem wurde eine Inhibierung der Lyso-PC-Synthese als mögliches therapeutisches Ziel für die Behandlung der Alzheimererkrankung diskutiert (SHEIKH et al., 2015) (Kapitel 5.2). Basierend auf diesen bereits in der Literatur beschriebenen Eigenschaften der Lyso-PC untermauern die, in den zellulären und murinen Hypovitaminose D-Modellen detektierten, gesteigerten Lyso-PC-Spiegel den negativen Einfluss eines Vitamin D-Mangels auf die pathologischen Alzheimerprozesse.

5.1.4.2 Der Einfluss einer Vitamin D-Hypovitaminose auf TAG- und Carnitin-Spezies

Hinsichtlich der Lipide, die in den zellulären Energiemetabolismus und die β -Oxidation involviert sind, wurden in dieser Arbeit Vitamin D-Mangel-bedingte Veränderungen in humanen Neuroblastomzellen detektiert. Mehrere Studien lieferten Hinweise für einen beeinträchtigen Energiemetabolismus, spezieller einen veränderten Glukosemetabolismus, im Gehirn von Alzheimerpatienten (BERGAU et al., 2019; BUTTERFIELD, HALLIWELL, 2019). Basierend darauf könnte vermutet werden, dass auf Grund der verminderten Energiezufuhr durch die Glukoseverwertung die β -Oxidation von Fettsäuren im Alzheimergehirn an Bedeutung gewinnt. Bezüglich einer möglichen Rolle von Vitamin D in diesem Zusammenhang konnte beobachtet werden, dass der mitochondriale Sauerstoffverbrauch durch die Behandlung von menschlichen Skelettmuskelzellen mit 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ gesteigert wird (RYAN et al., 2016). Übereinstimmend damit berichtete eine weitere Studie einen Vitamin D-Mangel-bedingten verminderten Sauerstoffverbrauch sowie eine beeinträchtigte mitochondriale Funktion (DZIK, KACZOR, 2019). Im Einklang mit diesen Ergebnissen wurde unter vorliegenden experimentellen Bedingungen ebenfalls ein reduzierter Sauerstoffverbrauch in SH-SY5Y-Zellen mit vermindertem Vitamin D-Gehalt detektiert. In diesem Kontext könnte der beobachtete signifikante Anstieg der Acyl-Carnitine C18 und C18:1 als potenzielle Akkumulation dieser Lipidspezies als Folge eines eingeschränkten Umsatzes durch die β -Oxidation auf Grund einer beeinträchtigen mitochondrialen Funktion erklärt werden. Dies würde mit den erhöhten C18/C2- beziehungsweise (C16+C18)/C2-Verhältnissen übereinstimmen, welche eine Beeinträchtigung des Fettsäure-Umsatzes in der β -Oxidation andeuten. Diese Interpretation ist auf die Beteiligung der analysierten Carnitinspezies am Carnitin-*Carrier*-System zurückzuführen. Innerhalb dieses Systems katalysiert zunächst die Carnitin-Palmitoyltransferase I (CPTI), die in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist, die *trans*-Esterifizierung der Fettsäuren an die Hydroxylgruppe von L-Carnitin (C0) (MURTHY, PANDE, 1987). Nachfolgend transportiert die Carnitin-Acylcarnitin-Translokase (CACT) diese zuvor entstandenen Acyl-Carnitine (beispielsweise C16 oder C18) über die innere Mitochondrienmembran (ROE et al., 2000). In der mitochondrialen Matrix wird die Fettsäure durch die Carnitin-Palmitoyltransferase II (CPTII) vom Carnitin entfernt und als Acyl-CoA-Fettsäure in der β -Oxidation katabolisiert. Das durch die β -Oxidation geradzahligere Fettsäuren entstehende Acetyl-CoA kann durch die Carnitin-Acetyltransferase (CAT) in Acetylcarnitin (C2) umgewandelt und von der Carnitin-Acylcarnitin-Translokase (CACT) über die mitochondriale Matrix zurück ins Zytosol transportiert werden (MIYAZAWA et al., 1983).

Hinsichtlich der Alzheimerpathologie würde die unter Calcitriol-Mangelbedingungen beobachtete, Beeinträchtigung der β -Oxidation auf Grund der ebenfalls reduzierten Glykolyse (BUTTERFIELD, HALLIWELL, 2019) zu einer weiteren Verschlechterung der Energieversorgung und somit einer Progression der Pathophysiologie führen. Es muss jedoch beachtet werden, dass diese Acyl-Acetylcarnitin-Verhältnisse auf Grund der geringen Halbwertszeiten lediglich eine Momentaufnahme anstatt potenziell akkumulierender Effekte, wie Veränderungen in der Lipidhomöostase, abbilden. Zusätzlich sollte darauf hingewiesen werden, dass die Einflüsse auf Lipide des Energiemetabolismus vorsichtig interpretiert werden sollten, da sie fast ausschließlich *in vitro* detektiert wurden, was vermuten lässt, dass die experimentellen Fütterungsbedingungen und der so induzierte milde Vitamin D-Mangel nicht ausreichend sind, um die auf Zellebene beobachteten Effekte hinsichtlich der mitochondrialen Funktion auch im Mausmodell hervorzurufen. Dass der Effekt des Calcitriolmangels auf den Sauerstoffverbrauch deutlicher ausgeprägt war als der auf die Carnitin-Spezies, könnte darin begründet sein, dass Carnitine als Bestandteile des Carnitin-*Carrier*-Systems zwar eine wichtige Rolle für den Transport von Fettsäuren über die mitochondriale Membran übernehmen, die hauptsächliche Lipidspezies in Mitochondrien jedoch Cardiolipine sind (PENNINGTON et al., 2019), deren Spiegel in Abwesenheit von Calcitriol weiterführend analysiert werden könnten.

Die signifikante Abnahme der Gesamtmenge an Triglyzeriden, welche in Calcitriol-Mangel-SH-SY5Y-Zellen detektiert wurde, steht im Einklang mit der Literatur, da beispielweise eine Studie eine intrazelluläre TAG-Akkumulation nach Aktivierung des VDR durch Calcitriol, was den gegenteiligen Konditionen dieser Arbeit entspricht, in humanen Hepatozyten beobachtete (MARTINEZ-SENA et al., 2020). Zudem lieferte eine weitere Studie Hinweise für eine wichtige Rolle des intestinalen VDR in der systemischen Lipidhomöostase, denn in Mäusen mit *Vdr-Knockout* (*Vdr*^{-/-}-Mäuse) war die Kapazität, TAGs aus dem Blutkreislauf aufzunehmen, reduziert. Außerdem waren diese Mäuse vor einer Diät-induzierten Adipositas und Hepatosteatose, die durch eine übermäßige Akkumulation von TAGs in der Leber bedingt wird, geschützt (JAHN et al., 2019). Diese Beobachtungen stimmen mit denen einer Studie überein, die die Rolle des VDR in der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung, kurz NAFLD, analysierte. Die Autoren detektierten auf Grund der Deletion des VDR einen Schutz gegenüber Fettleber, Dyslipidämie und Insulinresistenz in apoE^{-/-}-Mäusen, die mit einer fettreichen Diät gefüttert wurden. Schlussfolgernd wurde eine therapeutische Inhibierung des VDR in der Leber vorgeschlagen, um positive Effekte hinsichtlich der Steatose in früher NAFLD zu bedingen (BOZIC et al., 2016). Neben dieser transkriptionsregulatorischen Wirkung scheint Vitamin D auch VDR-unabhängige Effekte hinsichtlich der NAFLD zu haben, was beispielsweise an einer kürzlich veröffentlichten Metaanalyse deutlich wird, die berichtet, dass die Supplementierung von Vitamin D in verbesserten anthropometrischen und biochemischen Parametern in NAFLD-Patienten resultierte. So wurden neben signifikant erhöhten HDL-Cholesterinspiegeln beispielsweise Reduzierungen im Körpergewicht und Körpermasse-Index ausgemacht, während die TAG-Spiegel nicht beeinflusst wurden (REZAEI et al., 2021).

Zusammenfassend lassen die vorliegenden Ergebnisse vermuten, dass Vitamin D nicht nur für die umfassende Regulierung einer Vielzahl von Genen verantwortlich ist, sondern auch die Lipidhomöostase in einer Art beeinflusst, die einige Krankheiten und speziell neurodegenerative Krankheiten wie die Alzheimererkrankung betrifft. Zu den vorgeschlagenen Mechanismen, über welche die durch Vitamin D beeinflussten Lipidklassen zur Alzheimerpathologie beitragen könnten, zählen neben der Membranfluidität auch die Bildung von *Lipid Rafts*, die Formierung von A β -Oligomeren, der oxidative Stress sowie der Energiemetabolismus (Abbildung 57).

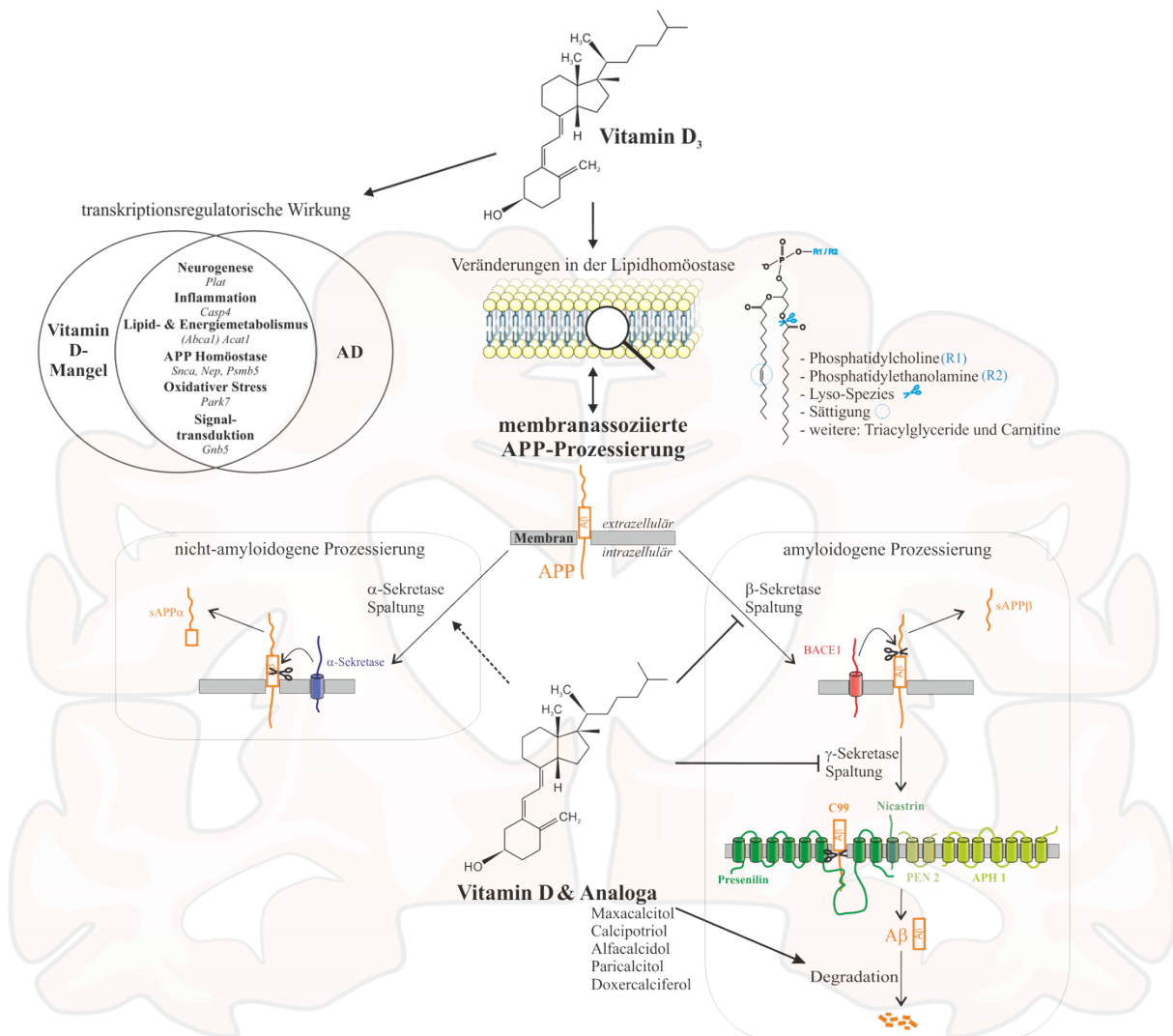


Abbildung 57: Schematisches Modell der pleiotropen Effekte von Vitamin D und seinen Analoga auf die Alzheimerpathologie. Auf transkriptionsregulatorischer Ebene sind Gene und zugehörige Signalwege (Neurogenese, Inflammation, Lipid- und Energiemetabolismus, APP-Homöostase, Oxidativer Stress und Signaltransduktion) überlappend von einer milden bis moderaten Vitamin D-Hypovitaminose und der Alzheimererkrankung betroffen. In Neuroblastomzellen und Hirnproben von Mäusen mit Vitamin D-Mangel wurden Effekte des Secosteroids Vitamin D auf die Homöostase Alzheimer-relevanter Lipide beobachtet. Diese beeinflussten den Metabolismus von Phospholipiden (Phosphatidylcholine und -Ethanolamine, Lyso-Spezies), speziell hinsichtlich der Sättigung der gebundenen Fettsäuren, sowie von Lipiden, die in den zellulären Energiemetabolismus und die β -Oxidation involviert sind (Triacylglyceride und Carnitine). Des Weiteren reduzierten Vitamin D und die analysierten Vitamin D₃-Analoga Maxacalcitol, Calcipotriol, Alfacalcidol sowie die Vitamin D₂-Analoga Paricalcitol und Doxercalciferol die Prozessierung des amyloidogenen Vorläuferproteins APP, indem sie die Aktivitäten der β - und γ -Sekretase beeinflussten. Die verringerte β -Sekretase-Aktivität wurde durch einen direkten Effekt von Vitamin D und den analysierten Analoga auf die β -

Sekretase kombiniert mit einem indirekten Effekt auf die *BACE1*-Genexpression sowie den BACE1-Proteingehalt vermittelt. Die γ -Sekretase-Aktivität wurde auf Grund einer verminderten Genexpression von *NCSTN*, dessen kodiertes Protein Nicastrin für die Reifung des heterotetrameren γ -Sekretasekomplexes verantwortlich ist, reduziert. Ein stimulierender Effekt auf die α -Sekretase-vermittelte nicht-amyloidogene Prozessierung von APP wurde für Calcidiol und das Vitamin D₂-Analog Paricalcitol detektiert. Darüber hinaus wurden die A β -Spiegel in Anwesenheit von Vitamin D und seinen Analoga durch eine gesteigerte A β -Degradation reduziert. APP: Amyloides Vorläuferprotein. Teile der Abbildung wurden unter Verwendung von Bildern von *Servier Medical Art* gezeichnet. *Servier Medical Art* von *Servier* ist unter einer *Creative Commons Attribution 3.0 Unported License* (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>) lizenziert. Abbildung verändert nach (GRIMM et al., 2019; GRIMM et al., 2017b; LAUER et al., 2021a).

5.2 Der Einfluss des Vitamin A-Derivates Acitretin auf Hirn- und Leber-Lipidhomöostase von transgenen Alzheimermäusen

Das folgende Kapitel diskutiert die Ergebnisse der lipidanalytischen Analyse der Einflüsse des Vitamin A-Derivates Acitretin im 5xFAD-Mausmodell im Kontext der aktuellen Literatur.

Neben Vitamin D und seinen Analoga wurden beispielsweise auch für die ebenfalls lipophilen Vitamine E und A Einflüsse auf die Alzheimerpathologie beschrieben (BROWNE et al., 2019; ENDRES, 2019; GRIMM et al., 2016b; WOLOSZYNOWSKA-FRASER et al., 2020). In der vorliegenden Arbeit wurde, basierend auf den detektierten protektiven Eigenschaften von Vitamin D-Analoga, analysiert, ob auch Vitamin A-Derivate positive Einflüsse auf die Lipidhomöostase-assoziierte Pathologie der Alzheimererkrankung bedingen. Daher wurde im Speziellen eine potenzielle Wirkung des therapeutisch eingesetzten Vitamin A-Derivates Acitretin auf den Metabolismus von Alzheimer-assoziierten Lipiden analysiert. Acitretin ist ein aromatisches synthetisches Vitamin A-Derivat (Retinoid), welches häufig auch in der älteren Bevölkerung bei schweren Formen der Psoriasis vulgaris (Schuppenflechte) zur peroralen Anwendung verordnet wird (HEATH et al., 2018). Bei der Psoriasis vulgaris handelt es sich um eine chronisch-entzündliche Erkrankung der Haut, die sich durch Schuppenherde auf scharf begrenzten roten Plaques äußert und deren Prävalenz in Deutschland bei ein bis zwei Prozent liegt. Eine Behandlung mit Acitretin bewirkt in diesem Zusammenhang die Ausreifung von Epithelzellen und eine Reduzierung der Verhornung und Entzündung. Retinoide allgemein sind für einige wichtige Körperfunktionen, wie beispielsweise das Sehen, die Immunantwort, die Regulierung von Entwicklungsprozessen sowie in der Abstimmung von Proliferation und Differenzierung, notwendig und daher von pharmakologischem Interesse (OLIVEIRA et al., 2018).

Grundlage für die Analyse von Acitretin in der vorliegenden Arbeit waren die bereits in der Literatur berichteten positiven Einflüsse des Retinoids Acitretin auf die neuropathologischen Charakteristika der Alzheimererkrankung. Auf molekularer Ebene wurde kürzlich im Zusammenhang mit lokalen funktionellen Netzwerken, deren abweichende Aktivitäten als Ursache für Defizite im Gedächtnis und der Kognition bei der Alzheimerkrankheit angesehen werden, ein protektiver Einfluss von Acitretin in einem Mausmodell der familiären Alzheimererkrankung berichtet (ROSALES JUBAL et al., 2021). Zudem wurden *in vivo* immunmodulatorische Einflüsse von Acitretin im zentralen Nervensystem beobachtet. Sowohl in Hirnproben von 5xFAD-Mäusen als auch in humaner Cerebrospinalflüssigkeit von Patienten mit leichter bis moderater Demenz und der Diagnose einer Alzheimererkrankung bedingte die Behandlung mit Acitretin (murin: tägliche intraperitoneale Injektion von 10 mg Acitretin für sieben Tage; human: tägliche perorale Aufnahme von 30 mg Acitretin für 30 Tage) eine signifikante Zunahme an IL-6 (DOS SANTOS GUILHERME et al., 2019).

Hinsichtlich der APP-Pathologie führte Acitretin beispielsweise sowohl *in vitro* (humane neuronale Zellen) als auch *in vivo* (Alzheimermausmodell) zu einer gesteigerten Expression und Enzymaktivität der α -Sekretase und zu einer Verbesserung von Verhaltensstörungen im Alzheimermausmodell (DOS SANTOS GUILHERME et al., 2019; TIPPMANN et al., 2009). Einhergehend damit wurde in einer klinischen Studie an 21 Patienten mit milder bis moderater Alzheimererkrankung eine verstärkende Wirkung von Acitretin auf die nicht-amyloidogene APP-Prozessierung beschrieben. Diese bildete sich in signifikant erhöhten Spiegeln an löslichem APP α (sAPP α) in der Cerebrospinalflüssigkeit nach vierwöchiger Aufnahme von 30 mg Acitretin pro Tag im Vergleich zu Patienten, denen ein Placebo verabreicht wurde, ab (ENDRES et al., 2014).

Neben diesen positiven Effekten von Acitretin auf die Alzheimerpathologie müssen gerade im Hinblick auf das fortgeschrittene Alter der meisten Patienten einige Aspekte in der pharmazeutischen Behandlung beachtet werden, die den täglichen klinischen Einsatz erschweren könnten. Es sollte beispielsweise berücksichtigt werden, dass vermutlich die Durchblutung der Leber, unter anderem auf Grund einer Akkumulierung von Leukozyten in den Sinusoiden (ITO et al., 2007), verringert und somit die Kapazität der Leber-vermittelten Entgiftung beeinträchtigt sein könnte (TAN et al., 2015). Neben einem altersbedingt veränderten Blutfluss können auch die Größe der Leber, deren Volumen während der Lebensspanne von Erwachsenen 20-40 % abnehmen kann (SCHMUCKER, 2005), sowie ihre proteinbindende Kapazität die *Clearance* eines Arzneimittels beeinflussen (BUTLER, BEGG, 2008). Auch Mehrfachmedikationen auf Grund von Multimorbidität und damit zusammenhängende Wechselwirkungen zwischen einzelnen Pharmazeutika oder eine reduzierte Integrität der Blut-Hirn-Schranke sind Faktoren, die speziell bei älteren Personen Beachtung finden sollten (ERICKSON, BANKS, 2019; WU et al., 2022). Für Acitretin, welches in der Dermatologie systemisch eingesetzt wird, sind einige potenzielle Nebenwirkungen bekannt, zu denen beispielsweise teratogene Eigenschaften, hepatotoxisches Potential sowie ein Anstieg in den Serum-Triacylglycerid- oder Cholesterinspiegeln, der eine ständige Therapieüberwachung mit Kontrollen des Blutbildes, vor allem der Leberwerte bedingt, zählen (GUPTA et al., 1989a; VAHLQUIST et al., 1988; ZITO, MAZZONI, 2022).

Auf Grund dessen, dass Acitretin sowohl in zellulären Modellen als auch in Mäusen in der Lage ist die Blut-Hirn-Schranke zu passieren (FREESE et al., 2014; HOLTHOEWER et al., 2012), wurden in der vorliegenden Arbeit Hirnproben von Acitretin-behandelten 5xFAD-Mäusen analysiert. Da potenzielle Veränderungen im Lipidmetabolismus des Gehirns neben direkten Effekten auch auf Veränderungen der Lipidkomposition im Blutstrom zurückgeführt werden könnten und die Leber für die Serumlipide verantwortlich ist, wurde weiterführend die Analyse von Leberproben der Acitretin-behandelten Alzheimermodellmäuse mit einbezogen. So sollte adressiert werden, ob die Lipidveränderungen, die in einem Organ, in diesem Fall in der Leber, detektiert werden, auf ein anderes Organ, in diesem Fall das Gehirn, übertragbar sind. Basierend auf den zuvor beschriebenen sowohl positiven als auch negativen Eigenschaften von Acitretin bestand das Ziel dieser Studie in der systematischen Analyse des Effektes dieses Vitamin A-Derivates auf den Leber- und Hirn-Lipidmetabolismus. Gerade in Bezug auf die Alzheimererkrankung werden Hyperlipidämie und veränderte Lipidkonzentrationen im Gehirn als Risikofaktoren für das Auftreten und die Progression dieser neurodegenerativen Krankheit diskutiert (CHEW et al., 2020; YIN, 2022).

In der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, dass einige Lipidklassen (Plasmalogene, Lyso-PC und Sphingomyeline) in den beiden analysierten Geweben von Acitretin-behandelten Alzheimer-Modellmäusen ähnlich verändert waren, während für andere Klassen (TAG, PCaa und Carnitine) gewebeabhängige Unterschiede detektiert wurden (Abbildung 58).

Die erhöhten Spiegel an TAG in den Leberproben Acitretin-behandelter 5xFAD-Mäuse stimmen mit der in der Literatur beschriebenen Assoziation zwischen Acitretinbehandlung und der Prävalenz für NAFLD in Psoriasis-Patienten (BALAK et al., 2020; OLVEIRA et al., 2019; XU et al., 2017) überein. Im Einklang damit wurden in Acitretin-behandelten Patienten gesteigerte Serum-TAG-Spiegel detektiert (PAI et al., 2019; VAHLQUIST et al., 1988). Eine achtwöchige Intervention bei 247 Psoriasis-Patienten mit 30 mg Acitretin pro Tag resultierte in einer retrospektiven Studie in einer signifikanten Erhöhung der TAG-Spiegel von $1,47 \pm 0,87$ mmol/l auf $1,70 \pm 0,97$ mmol/l (QIAN et al., 2021a). Die in dieser Arbeit mittels semiquantitativer *Shotgun Lipidomics* gewonnenen Daten wurden weiterführend durch eine zweite Methode, die Ölrot O-Färbung von Lipidtropfen, validiert. Im Gegensatz zu den Effekten in der Leber resultierte die Behandlung mit Acitretin im Hirngewebe in einer signifikanten Reduzierung der TAG-Spiegel. Dies könnte auf den verringerten Glukosemetabolismus, der in spezifischen Hirnarealen von Alzheimerpatienten und Modellmäusen detektiert wurde (BERGAU et al., 2019; BUTTERFIELD, HALLIWELL, 2019; HIPKISS, 2019), zurückgeführt werden. Vor allem in frühen Stadien der Alzheimererkrankung, in welchen die mitochondrialen Dysfunktionen noch nicht so stark ausgeprägt sind (DE LA MONTE, WANDS, 2006; WANG et al., 2020a), könnte eine Steigerung der β -Oxidation zur Kompensierung des Energiedefizits auf Grund des beeinträchtigten Glukosemetabolismus dienen. Die Behandlung mit Acitretin schien diesen Alzheimer-relevanten Prozess in der Energiehomöostase des Gehirns zu verstärken, was sich in den reduzierten TAG-Spiegeln abbildet. Zudem liefern die verringerten Mengen an Acyl-Carnitinen in Hirnproben Acitretin-behandelter Mäuse Hinweise für eine gesteigerte β -Oxidation in Anwesenheit von Acitretin. Die Bedeutung der analysierten Carnitine-Spezies im Carnitin-*Carrier*-System kann Kapitel 5.1.4.2 entnommen werden. Ein Vorbehalt dieser Interpretation ist, dass die reduzierten Acyl-Carnitin-Mengen auch Folge der verminderten TAG-Spiegel sein könnten, ähnlich wie im Lebergewebe erhöhte Mengen an Acyl-Carnitinen detektiert wurden, die auf die Zunahme an TAG zurückgeführt werden könnten.

Neben diesen unterschiedlichen Einflüssen von Acitretin auf den TAG-Metabolismus in Leber- und Hirngewebe resultierte eine detailliertere Analyse der Lipidklassen-unabhängigen Effekte in einzelnen TAG-Spezies, die in beiden Geweben ähnlich beeinflusst wurden. Interessanterweise handelte es sich dabei um PUFA-enthaltende TAG-Spezies (TAG C56:8, C58:5, C60:5, C54:9), welche Acitretin-bedingt in beiden Geweben im Vergleich zu Proben der Kontrolltiere reduziert vorlagen. Diese Spezies sind hinsichtlich der Alzheimererkrankung von besonderer Relevanz, da sie die ω -3 Fettsäuren Docosahexaensäure (DHA, C22:6) und Eicosapentaensäure (EPA, C20:5) enthalten könnten, deren enge Assoziation mit der Alzheimerpathologie in der Literatur einheitlich beschrieben wird (ALBANESE et al., 2009; BARBERGER-GATEAU et al., 2002; COLE, FRAUTSCHY, 2010; DIAZ et al., 2021; GRIMM et al., 2011c; HEATH, WOOD, 2021; MORRIS et al., 2003; SAMBRA et al., 2021; SCHAEFER et al., 2006; SWANSON et al., 2012; TROESCH et al., 2020).

Zudem wurde berichtet, dass sie in Gehirnen von Alzheimerpatienten verringert vorliegen (CONQUER et al., 2000; SODERBERG et al., 1991; TULLY et al., 2003). DHA weist auf molekularer Ebene multiple pleiotrope Mechanismen auf, durch welche sie die A β -Produktion beeinflusst: Neben einer Steigerung der nicht-amyloidogenen Prozessierung, vermittelt durch erhöhte ADAM17-Gen- und Proteinexpression sowie eine verminderte ADAM17-Proteindegradation, wird die amyloidogene APP-Prozessierung in Anwesenheit von mehrfach-ungesättigten Fettsäuren reduziert. Als mögliche zugrundeliegende molekulare Mechanismen werden dabei eine verringerte BACE1-Aktivität und eine veränderte zelluläre BACE1-Lokalisation diskutiert. Hinsichtlich der γ -Sekretase wird ein direkter Effekt von DHA auf deren Aktivität begleitet von einem Wechsel ihrer Lokalisation in der Membran von Raft- hin zu Nichtraft-Bereichen vermutet (GRIMM et al., 2013a; GRIMM et al., 2011c; YANG et al., 2011). Darüber hinaus sind in der Literatur auch Hinweise für Effekte auf die A β -Degradation zu finden. So steigert beispielsweise EPA die IDE-vermittelte Degradation von A β (GRIMM et al., 2016c). Neben direkten positiven Einflüssen auf den A β -Metabolismus wurde eine Rolle von ω -3 PUFA, die natürlich in fettreichen Kaltwasserfischen (Lachs, Hering, Sardine) vorkommen, als Aktivator von RXR und PPAR beschrieben, was vermuten lässt, dass sich eine Supplementierung ausgewählter Fettsäuren über pleiotrope Effekte positiv auf die Alzheimerprävention und -Progression auswirken könnte (CASALI et al., 2015; GRIMM et al., 2011c; GRIMM et al., 2016c). In diesem Kontext sind auch Einflüsse von mehrfach-ungesättigten Fettsäuren auf Alzheimerpathologie-relevante Prozesse wie oxidativen Stress, den neuronalen Energiemetabolismus sowie die Neuroinflammation bekannt (DESALE, CHINNATHAMBI, 2020; METT, 2021). In Alzheimer-Modellmäusen wurden kürzlich protektive Effekte von DHA auf Lernen und Gedächtnisfunktionen sowie neuronale Schäden, das Verhältnis von ungesättigten zu gesättigten Fettsäuren, A β -Plaques und Neurofibrillenbündel berichtet (BIE et al., 2021). In klinischen RCT konnte eine Supplementierung mit DHA bisher nur in Subgruppen, wie beispielsweise Studienteilnehmern mit sehr milden Stadien der Alzheimererkrankung oder in Studienteilnehmern, die keine APOE4-Träger waren, positive Effekte hinsichtlich der kognitiven Leistungsfähigkeiten vermitteln (FREUND-LEVI et al., 2006; QUINN et al., 2010).

Basierend auf dem in der vorliegenden Arbeit detektierten reduzierenden Effekt von Acitretin auf diese Alzheimer-relevanten Fettsäuren, sollte eine Supplementierung mehrfach-ungesättigter Fettsäuren für Alzheimerpatienten, die mit Acitretin behandelt werden, in Betracht gezogen werden. Hinsichtlich der empfohlenen Intervention mit beispielsweise DHA wurde kürzlich publiziert, dass eine tägliche Dosis von circa 1 mg DHA auf Grund der so adäquaten Bioverfügbarkeit im Gehirn in gesunden Individuen zur Demenzprävention beitragen kann. Interessanterweise war die signifikante Zunahme an DHA in der Cerebrospinalflüssigkeit von APOE4-tragenden Studienteilnehmern deutlich geringer ausgeprägt, was vermuten lässt, dass speziell APOE4-Träger von einer höherdosierten DHA-Supplementierung, im Optimalfall kombiniert mit einem Vitamin B-Komplex, hinsichtlich der Alzheimerprävention profitieren könnten (ARELLANES et al., 2020). Einen wichtigen Punkt stellt in diesem Kontext die richtige Art der Supplementierung der oxidationssensitiven PUFA, beispielsweise in Kombination mit Antioxidantien, dar, da bereits geringste Mengen von circa 1 % oxidiertes DHA kontroverse Effekte in Form einer signifikant gesteigerten A β -Generierung bedingen (GRIMM et al., 2016a). Dies könnte die teilweise kontroversen Beobachtungen epidemiologischer Studien und ernährungswissenschaftlicher Ansätze erklären.

Basierend darauf, dass TAG als Neutralfette intrazellulär in Form von Lipidtropfen gespeichert werden, welche von einer Phospholipid-Membran umgeben sind (KRAHMER et al., 2011; WILFLING et al., 2013), ist das Ergebnis eines signifikant erhöhten mittleren Effekts aller PCaa-Spezies in Anwesenheit von Acitretin in Leberzellen übereinstimmend mit den in diesem Gewebe signifikant gesteigerten TAG-Spiegel. Darüber hinaus stehen die verminderten PCaa-Spiegel im Hirngewebe Acitretin-behandelter 5xFAD-Mäuse im Einklang mit den TAG-spezifischen Acitretin-vermittelten Beobachtungen im Hirngewebe (Abbildung 58).

Während in den Lipidklassen TAG, Carnitine und PCaa gewebespezifische Unterschiede in den Acitretin-vermittelten Veränderungen der Homöostase beobachtet wurden, verhielten sich Sphingomyeline, Lyso-Phosphatidylcholine und Plasmalogene in beiden Geweben in Anwesenheit von Acitretin ähnlich.

Hinsichtlich der Sphingomyeline wurde sowohl in Leber- als auch Hirnproben von 5xFAD-Mäusen eine Acitretin-bedingte Abnahme detektiert. Diese potenziell SM-reduzierende Eigenschaft von Acitretin ist im Hinblick auf die Alzheimerpathologie kein wünschenswerter Effekt, da berichtet wurde, dass die Konzentration an Sphingomyelin im Gehirn von Alzheimerpatienten reduziert ist. Dies könnte durch eine A β -induzierte Aktivierung der Sphingomyelinasen (SMasen), welche Sphingomyelin zu Ceramid degradieren, bedingt sein (GRIMM et al., 2005; HE et al., 2010). Ein Zusammenhang, der in Kapitel 5.1.2.1 bereits diskutiert wurde. Bei Sphingomyelin handelt es sich um den in der Zellmembran am häufigsten vorkommenden Vertreter der Sphingolipide, der auf Grund seiner Lokalisierung in *Lipid Rafts* (Kapitel 5.1.4.1) eine wichtige Rolle in der Membranfluidität spielt (CRIVELLI et al., 2020) und somit die APP-Prozessierung beeinflussen kann (VAN ECHTEN-DECKERT, HERGET, 2006). Weiterführend könnte ein potenzieller Erklärungsansatz für den berichteten Zusammenhang zwischen der therapeutischen Acitretinbehandlung und Depressionen sowie Suizidalität in der detektierten SM-senkenden Eigenschaft des Retinoids liegen. Einhergehend damit werden SMase-Inhibitoren für die Behandlung von schweren Formen von Depressionen oder auch der Alzheimererkrankung, welche mit einer gesteigerten Aktivität der sauren SMasen assoziiert sind, diskutiert (CARRETERO et al., 2013; GUPTA et al., 1993; HAYES, KOO, 2011).

Innerhalb der in der vorliegenden Arbeit analysierten Lyso-PC-Spezies wurden keine gewebespezifischen Unterschiede detektiert, da die Behandlung mit Acitretin sowohl in den Leber- als auch den Hirnproben transgener Alzheimermodellmäuse in tendenziell reduzierten Spiegel an Lyso-PC resultierte. Diese Acitretin-induzierten Veränderungen in der Lyso-PC-Homöostase müssen in einem weiteren System validiert werden, da es sich lediglich um Tendenzen, die das Signifikanzniveau nicht erreichten, handelt. Während des Alterungsprozesses und speziell im Rahmen der Alzheimerpathologie scheinen die Spiegel an Lyso-PC beeinflusst zu werden, weshalb sie als potenzielle Plasma-Lipid-Biomarker diskutiert werden. Dorninger *et al.* analysierten das Plasma von 174 nicht-dementen Studienteilnehmern zu Beginn der Studie und nach 90 Monaten oder einer Alzheimerdiagnose. Während des physiologischen Alterungsprozesses stiegen die Spiegel an Lyso-PC und PC-Plasmalogenen signifikant an. Interessanterweise waren diese Veränderungen in den Teilnehmern, die eine Alzheimererkrankung entwickelten, stärker ausgeprägt (DORNINGER et al., 2018). Einhergehend mit der Zunahme an Lyso-PC im Plasma von Alzheimerpatienten, die vermutlich ihre Transportfunktion repräsentieren, scheint der Gehalt an Lyso-PCs im Gehirn abzunehmen.

Dies geht unter anderem aus einer Massenspektrometrie-basierten lipidanalytischen Studie der Experimentellen Neurologie an humanen *post mortem* Proben des frontalen Kortex, temporalen Kortex und Cerebellums von 30 Alzheimerpatienten verglichen mit 14 gesunden Individuen passenden Alters hervor. In den Alzheimerproben des frontalen Kortex waren 73 % der Lyso-PC-Spezies tendenziell reduziert, während in denen des temporalen Kortex 53 % und in denjenigen des Cerebellums alle analysierten Lyso-PC-Spezies als verringert im Vergleich zu den entsprechenden Hirngewebe gesunder Individuen detektiert wurden (GRIMM et al., 2011a). In Übereinstimmung damit wurde bereits früh berichtet, dass die Aktivität des katabolen Enzyms Phospholipase A₂ (PLA₂), welche in der Bildung von Lyso-PC-Spezies resultiert, im parietalen und temporalen Kortex von Alzheimerpatienten signifikant um circa 35-50 % reduziert ist. Gleichzeitig war die Aktivität der Lyso-Phospholipid-Acyltransferase, welche die Umwandlung von Lyso-Phospholipiden in Phospholipide katalysiert, um 50-70 % erhöht (ROSS et al., 1998). Auch in der Cerebrospinalflüssigkeit von Alzheimerpatienten sind die Lyso-PC-Konzentrationen tendenziell geringer im Vergleich zu gesunden Individuen (MULDER et al., 2003). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass Acitretin den in Alzheimerbetroffenen Gehirnen beobachteten Effekt reduzierter Lyso-PC-Spezies verstärken könnte, jedoch muss an dieser Stelle wieder betont werden, dass es sich lediglich um Tendenzen handelt. Auf molekularer Ebene wurde die Phospholipase A₂ als wichtiger Mediator der A β -induzierten Pathogenese beschrieben (SANCHEZ-MEJIA, MUCKE, 2010).

Eine Inhibition der Gruppe-IV Isoform der PLA₂ resultierte weiterführend in einer verminderten A β -induzierten Neurotoxizität und in einem Schutz vor A β -abhängigen Lern- und Gedächtnisdefiziten, Verhaltensveränderungen und vorzeitiger Sterblichkeit in einem Alzheimermausmodell (SANCHEZ-MEJIA et al., 2008). Des Weiteren wird vermutet, dass Lyso-PC-Spezies die Neurotoxizität von A β ₁₋₄₂ erhöhen und einen Einfluss auf die A β -Oligomerisierung haben könnten (SHEIKH et al., 2015). Demgegenüber steht die Beobachtung, dass der Gehalt an Lyso-PC-Spezies in unterschiedlichen Hirnregionen von Alzheimerpatienten negativ mit dem Spiegel an A β korreliert (GRIMM et al., 2011a).

Neben diesen als negativ einzuschätzenden Nebenwirkungen der Acitretinbehandlung auf den Lipidmetabolismus wurden in der vorliegenden Arbeit auch positive Einflüsse auf die Alzheimer-assoziierte Lipidhomöostase von Leber und Gehirn detektiert. So waren beispielsweise die Mengen an PC-Plasmalogenen in beiden Geweben nach Behandlung der 5xFAD-Mäuse mit Acitretin erhöht. Plasmalogene werden strukturell anhand der Vinyletherbindung an der sn-1 Position und der Esterbindung an der sn-2 Position charakterisiert und sind in fast allen Geweben von Säugetieren vertreten, wobei sie unter anderem im Gehirn am höchsten konzentriert vorliegen (SU et al., 2019). Die Funktionen von Plasmalogenen können auf ihre Vinyletherbindung sowie die überwiegende Bindung von PUFA in der sn-2 Position zurückgeführt werden (BRAVERMAN, MOSER, 2012). Als Anti-Oxidantien spielen sie, vor allem im Gehirn und Herz, eine protektive Rolle hinsichtlich oxidativen Stresses (BRONIEC et al., 2011; ZOELLER et al., 1999). Die Acitretin-bedingte Erhöhung der Plasmalogen Spiegel ist hinsichtlich der Alzheimererkrankung eine als positiv einzustufende Veränderung, da in *post mortem* Hirn- und Cerebrospinalflüssigkeit Proben von Alzheimerpatienten signifikant reduzierte Plasmalogen Spiegel detektiert wurden (FAROOQUI et al., 1997; GINSBERG et al., 1995; GUAN et al., 1999; HAN et al., 2001; SENANAYAKE, GOODENOWE, 2019; WELLS et al., 1995).

Eine aktuelle Studie berichtete in diesem Zusammenhang, dass die Spiegel an PC-Plasmalogenen in Speichelproben von 25 Alzheimerpatienten im Vergleich zu derselben Anzahl gesunder Individuen signifikant reduziert waren (MARKSTEINER et al., 2019). Auf molekularer Ebene könnten diese Beobachtungen dadurch erklärt werden, dass Plasmalogene anfällig gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies sind, die in der Alzheimerpathologie vermehrt auftreten (JENKINS et al., 2018). Zusätzlich zu den bereits beschriebenen anti-neuroinflammatorischen und anti-amyloidogenen Eigenschaften der Plasmalogene sowie ihrer wichtigen Rolle als Strukturlipide in der Zellmembran scheinen sie zudem relevant für Prozesse wie beispielsweise die Membranfusion (BRECKENRIDGE et al., 1973; GLASER, GROSS, 1994), den Ionentransport (DUHM et al., 1993; FORD, HALE, 1996; YOUNG et al., 2000) oder den Efflux von Cholesterin (MANDEL et al., 1998; NAGAN et al., 1998) zu sein. Speziell im Bezug auf die Alzheimererkrankung konnte ein reduzierender Einfluss von Plasmalogenen auf die Aktivität der membrangebundenen γ -Sekretase und somit die Bildung von A β sowohl in Zellkulturstudien als auch in humanen *post mortem* Alzheimer-Hirnproben gefunden werden (ROTHHAAR et al., 2012).

Zusammenfassend liefern die im Rahmen dieser Studie generierten Ergebnisse mögliche Erklärungen für die Nebenwirkungen, die in Acitretin-behandelten Psoriasispatienten beobachtet werden und zu denen beispielsweise die Entwicklung einer NAFLD oder hepatotoxische Eigenschaften zählen. Zudem betonen sie, dass potenzielle Pharmazeutika zur Behandlung der Alzheimererkrankung immer hinsichtlich ihrer Einflüsse auf die Lipidhomöostase überwacht werden sollten. Dies betrifft vor allem Patienten, welche mit Medikamenten behandelt werden, von denen bekannt ist, dass sie die Lipidhomöostase beeinflussen, wie beispielsweise Glukokortikoide und Ciclosporine (KRAUSZ et al., 1981; ROSS, MARAIS, 2014; STILLER et al., 1992), oder aber auch Patienten, welche ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen oder NAFLD haben. Gerade weil die APP-Prozessierung selbst über A β und AICD in der Lage ist den Lipidmetabolismus zu beeinflussen (CHALIMONIUK et al., 2007; GRIMM et al., 2005; GRIMM et al., 2011b; GRIMM et al., 2011d; HE et al., 2010; ROBINSON et al., 2014; SWOMLEY et al., 2014) und eine Medikation daher in weiteren und unerwarteten Änderungen resultieren könnte. Darüber hinaus verdeutlichen die Ergebnisse, dass Lipidveränderungen in bestimmten Geweben oder im Serum nicht routinemäßig auf das Gehirn extrapoliert werden sollten. Acitretin resultierte in teilweise unterschiedlichen und gegenteiligen Effekten auf den Lipidmetabolismus im Leber- verglichen zum Hirngewebe. Mögliche Gründe für diese Beobachtungen könnten neben der Eliminierung, welche bereits als langsamer im Gehirn im Vergleich zum Blut im Mausmodell beschrieben wurde (HOLTHOEWER et al., 2012), in der metabolischen Konversion oder aber auch der Medikamenten-Konzentration liegen und sollten Gegenstand weiterführender Forschung sein. Alternativ könnte im spezifischen Fall der vorliegenden Daten die Leber als „Versorger“ und das Gehirn als „Konsument“ für Fettsäuren interpretiert werden.

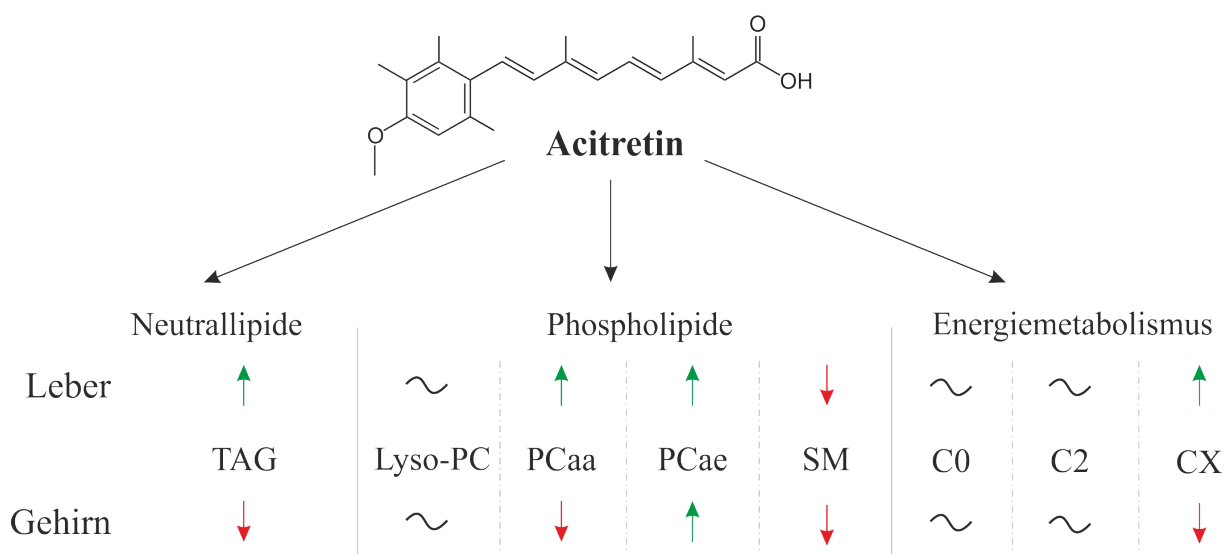


Abbildung 58: Übersicht über die detektierten Effekte von Acitretin auf die analysierten Neutrallipide, Phospholipide und Energiemetabolismus-assoziierten Lipide in Leber- und Hirngewebe von 5xFAD-Mäusen. TAG: Triacylglyceride; lyso PC: Lyso-Phosphatidylcholine; PCaa: Phosphatidylcholine; PCae: PC-Plasmalogene; SM: Sphingomyelin; C0: Carnitin; C2: Acetylcarnitin; CX: Carnitine >C3. Abbildung verändert nach (LAUER et al., 2021b).

5.3 Der Einfluss mittelkettiger gesättigter Fettsäuren auf die IDE-vermittelte A β -Degradation

Im vorliegenden Abschnitt erfolgt die Diskussion der Ergebnisse, die im Rahmen der Analyse potenzieller Einflüsse von gesättigten Fettsäuren auf die Degradation von A β generiert wurden, sowie deren Interpretation unter Zuhilfenahme der aktuellen Fachliteratur.

Basierend auf den in dieser Arbeit beobachteten Effekten der Vitamine D und A sowie ihrer Derivate auf die Alzheimer-relevante Lipidhomöostase, spezieller die gesättigten Fettsäuren, wie beispielsweise PCaa C20:0, C24:0, C26:0, C28:0; C42:0, C48:0, PEaa C32:0, C34:0, C36:0, C40:0, PCae C36:0, C42:0 oder PEae C34:0, C36:0, C38:0 (die angegebene Anzahl an Kohlenstoffatomen entspricht dabei der Summe von an sn-1 und sn-2 Position gebundenen Fettsäuren), wurde weiterführend analysiert, ob diese Doppelbindungs-freien Fettsäuren, ähnlich zu ihrem Einfluss auf die Sekretasen der APP-Prozessierung (CHEW et al., 2020; GRIMM et al., 2013a; LIU et al., 2019a; OKSMAN et al., 2006), auch in der Lage sind den A β -Metabolismus anderweitig zu beeinflussen. Da neben dem Vitamin D-Mangel-vermittelten Einfluss auf den Sättigungsgrad, auch Effekte auf die Kettenlänge, speziell die mittelkettigen Fettsäuren, detektiert wurden, stand die Analyse Kettenlänge-abhängiger Effekte im Fokus dieser weiterführenden Analyse. Hinweise dafür, dass die Kettenlänge gesättigter Fettsäuren einen Einfluss auf die jeweilige Wirkung im A β -Anabolismus haben könnte, lieferte eine kürzlich von Liu *et al.* publizierte Studie. Die Autoren beschrieben, dass eine 24-stündige Inkubation von SH-SY5Y-Zellen mit 10 $\mu\text{mol/l}$ gesättigten Fettsäuren verschiedener Kettenlängen (C16:0, C20:0 und C26:0) in unterschiedlichen Effekten auf die APP-Prozessierung und somit die A β -Bildung im Vergleich zu Kontroll-behandelten Zellen resultierte.

Während C16:0 keine signifikanten Einflüsse auf den A β -Anabolismus vermittelte, bedingten C20:0 und C26:0 eine Zunahme der A β -Menge, welche auf gesteigerte Expressionen von APP sowie der β - und γ -Sekretase bei gleichzeitig reduzierter Expression der α -Sekretase zurückgeführt werden konnte. Ein Vergleich zwischen den drei analysierten gesättigten Fettsäuren verdeutlichte, dass die Effektstärken auf die gesteigerte A β -Produktion nach Inkubation von C26:0 am prominentesten ausgeprägt waren (LIU et al., 2019a). Zusätzlich zu den Lipidmetabolismus-modulierenden Eigenschaften von Vitamin D, wurde in der vorliegenden Arbeit auch ein Einfluss dieses Secosteroids auf die A β -Degradation detektiert. Basierend auf diesen Daten und der Gegebenheit, dass über einen möglichen Einfluss der Lipidumgebung auf den Katabolismus von A β auf molekularer Ebene erst wenig bekannt ist, wurde sich in der vorliegenden Arbeit auf einen möglichen Einfluss der Kettenlänge von an Phosphatidylcholin gebundenen gesättigten Fettsäuren auf die enzymatische A β -Degradation fokussiert.

Die zerebrale Lipidhomöostase sowie Änderungen in der Fettsäure-Komposition des Gehirns stehen im Zusammenhang mit verschiedenen neurologischen Erkrankungen wie der Parkinsonerkrankung oder der Alzheimererkrankung. Während mehrfach-ungesättigte Fettsäuren, die in Alzheimerpatienten häufig unter anderem auf Grund erhöhter Mengen an reaktiven Sauerstoffspezies reduziert sind (CONQUER et al., 2000; SODERBERG et al., 1991; TULLY et al., 2003; WHILEY et al., 2014), als protektiv hinsichtlich der Alzheimerpathologie angesehen werden, wurde in der Literatur lange vermutet, dass gesättigte Fettsäuren gerade im Hinblick auf die APP-Pathologie gegenteilige Effekte aufweisen. In Bezug auf die mehrfach-ungesättigten Fettsäuren, welche anhand der Lokalisation der ersten Doppelbindung in ω -3- (erste Doppelbindung zwischen dem dritten und vierten Kohlenstoffatom) und ω -6- (erste Doppelbindung zwischen dem sechsten und siebten Kohlenstoffatom) Fettsäuren eingeteilt werden können, wurde eine negative Korrelation zwischen einem gesteigerten ω -3/ ω -6-Verhältnis und den kognitiven Beeinträchtigungen sowie der Inzidenz der Alzheimererkrankung abgebildet (LOEF, WALACH, 2013). Auf die pleiotropen Mechanismen der ω -3-Fettsäure DHA auf die Produktion von A β oder die von EPA auf die A β -Degradation wurde bereits in Kapitel 5.2, worauf an dieser Stelle verwiesen wird, eingegangen.

Wie bereits erwähnt, wurden die den ungesättigten Fettsäuren gegenüberstehenden gesättigten Fettsäuren bisher häufig in negativer Weise mit verschiedenen Formen der Demenz, darunter auch der Alzheimererkrankung, in Verbindung gebracht (BARNARD et al., 2014; GUSTAFSON et al., 2020). Auf molekularer Ebene wurden potenzielle Mechanismen, über welche gesättigte Fettsäuren diesen hinsichtlich der Alzheimerpathologie negativen Einfluss vermitteln könnten, beschrieben. Diese umfassen eine reduzierte Aktivität der α -Sekretase sowie eine verringerte Membranfluidität im Vergleich zu einfach- oder mehrfach-ungesättigten Fettsäuren (YANG et al., 2011). Weiterführend scheinen diese doppelbindungsfreien Fettsäuren die Sekretion von A β zu erhöhen und stehen im Zusammenhang mit einer verminderten Eliminierung dieses neurotoxischen Peptides. Außerdem wurden gesättigte Fettsäuren mit Diabetes und Insulinresistenz assoziiert, welche beide eine wichtige Rolle in der Alzheimerpathologie spielen (BIESSELS et al., 2006).

Dem gegenüber werden in neueren Studien mittelkettige Fettsäuren (*medium-chain fatty acids*, MCFA), bei denen es sich um gesättigte Fettsäuren bestehend aus sechs bis zwölf Kohlenstoffatomen handelt, und die über die Nahrung, beispielsweise durch Kokosnuss-Öl, aufgenommen werden können, diskutiert, in frühen Stadien der Alzheimererkrankung positive Einflüsse auf die kognitive Leistungsfähigkeit zu haben. Diese könnten auf molekularer Ebene durch eine Steigerung der zirkulierenden Ketonkörper vermittelt werden, die in der Lage sind den beeinträchtigten zerebralen Glukosemetabolismus zu kompensieren (CHATTERJEE et al., 2020b; DE LA RUBIA ORTI et al., 2018; HENDERSON et al., 2009). Eine weitere, vorteilhafte Auswirkung auf die neuronale Gesundheit könnte durch die Verminderung von oxidativem Stress, wie es für die MCFA Decansäure 10:0 berichtet wurde, mediiert werden (METT, MULLER, 2021). Zusammenfassend sind sowohl für MCFAs als auch für ω -3 PUFAs einige molekulare Mechanismen beschrieben, über welche sie beispielsweise die zerebrale A β -Ablagerung, den oxidativen Stress sowie den Energiemetabolismus des Gehirns positiv beeinflussen können und somit eine wichtige Rolle in der Prävention der Alzheimererkrankung einnehmen (METT, 2021).

Basierend auf dieser aktuellen und kontroversen Datenlage war die detailliertere Aufklärung der Einflüsse gesättigter Fettsäuren auf die A β -Degradation sowie die Analyse potenzieller Unterschiede in den Effekten einzelner gesättigter Fettsäuren ein Ziel der vorliegenden Arbeit. Innerhalb der analysierten gesättigten Fettsäuren, welche an Diacyl-Phosphatidylcholin gebunden vorlagen, wurde eine Einteilung anhand der Kettenlänge in die drei Gruppen mittelkettige (PC10:0-14:0), langkettige (PC16:0-18:0) und sehr langkettige (PC20:0-24:0) Fettsäuren vorgenommen.

Die Inkubation muriner Neuroblastomzellen (N2a) mit mittelkettigen gesättigten Fettsäuren (PC10:0-14:0) resultierte in einer Zunahme der A β -Degradation, welche von Veränderungen in der zellulären IDE-Sortierung sowie einem direkten Effekt auf die Aktivität dieser A β -degradierenden Protease begleitet wurde. In diesem Zusammenhang wurde in der Literatur anhand einer Studie, die klassische Proteinsekretionsinhibitoren oder -Stimulatoren wie beispielsweise Brefeldin A oder Glyburid einsetzte, berichtet, dass circa 3-10 % von IDE über einen unkonventionellen Proteinsekretionsweg in den Extrazellulärraum exportiert werden kann (ZHAO et al., 2009). Damit einhergehend verdeutlichten Bulloj *et al.* in einer Studie an N2a-Zellen, dass IDE mit Hilfe multivesikulärer Körper exosomal freigesetzt wird und somit eine wichtige Rolle im extrazellulären Katabolismus von A β einnimmt (BULLOJ et al., 2010). Dass IDE durch seine katalytischen Eigenschaften auch an der Regulierung der extrazellulären A β -Spiegel beteiligt ist, wurde bereits früh anhand der Mikroglia-Zelllinie BV-2 sowie durch den Nachweis intakten Enzyms in der Cerebrospinalflüssigkeit von gesunden Individuen und Alzheimerpatienten beschrieben. Neben der zytosolischen Lokalisation in BV-2 Zellen konnte IDE auch im Medium von gesunden Zellen mit intakter Plasmamembran nachgewiesen werden. Damit einhergehend reduzierte eine Depletion von IDE aus dem konditionierten Medium mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers die A β -degradierende Aktivität, was sich anhand erhöhter Mengen an endogenem A β im Zellkulturüberstand zeigte (QIU et al., 1998). Dieser Studie steht eine Publikation überschneidender Autoren gegenüber, die berichtet, dass IDE von kultivierten HEK-293- oder BV-2-Zellen nicht sezerniert wird (SONG et al., 2018). Die Autoren beschrieben, dass lediglich 1 % des gesamtzellulären IDE-Gehaltes in den extrazellulären Raum freigesetzt wird.

Mögliche Gründe für diese kontroversen Beobachtungen könnten in dem Verhältnis von Zellen zu Medium, der IDE-Konzentrierungs- und Detektionsmethode oder aber auch klonaler Heterogenität liegen. Außerdem konnte die im Rahmen der genannten Studie berichtete simultane Freisetzung der LDH in einem vergleichbaren Ausmaß in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden, da nach Behandlung mit PC10:0-14:0 keine Unterschiede im Vergleich zu Kontroll-inkubierten Zellen in der LDH-Menge im konditionierten Medium mittels LDH-Analyse (KUMAR et al., 2018) detektiert werden konnten. Auch ein möglicher Verlust der Zellintegrität als Ursache für die extrazelluläre IDE-Lokalisation, wie von den Autoren postuliert, konnte in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe einer Propidiumiodidfärbung (CROWLEY et al., 2016), in welcher keine Unterschiede zwischen Kontroll- und Fettsäure-behandelten Zellen detektiert wurden, ausgeschlossen werden. Ein Hinweis dafür, dass die in dieser Arbeit beobachteten Effekte von PC10:0-14:0 spezifisch für IDE zu sein scheinen, resultierte daraus, dass die Freisetzung der Sekretorischen-Alkalischen-Phosphatase (SEAP), einem Marker für den konstitutiven sekretorischen Signalweg (GORR, MOORE, 1999), unter den hier verwendeten experimentellen Bedingungen nicht verändert war.

Im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit liefert eine Vielzahl an Studien Hinweise für einen potenziellen Einfluss verschiedener Lipide auf die allgemeine exosomale Freisetzung. So wurde beispielsweise berichtet, dass Ceramiden eine Rolle bei der exosomalen Knospung zukommt (TRAJKOVIC et al., 2008) oder auch Glykosphingolipide in die Regulierung der exosomalen Sekretion involviert sind (PHUYAL et al., 2014). Der aktuelle Forschungsstand bezüglich des Zusammenhangs zwischen dem Lipidmetabolismus und der Produktion sowie Sekretion von Exosomen kann beispielsweise den Reviews von (RECORD et al., 2014; SKOTLAND et al., 2019; WANG et al., 2020b) entnommen werden. Hinsichtlich der IDE-spezifischen exosomalen Sekretion beschrieben Tamboli *et al.* eine gesteigerte Sekretion von IDE sowie Degradation von A β im Blut von Mäusen, die mit dem Statin Lovastatin behandelt wurden. Dadurch wurde deutlich, dass Statine in der Lage sind die Degradation extrazellulären A β durch Mikroglia zu stimulieren (TAMBOLI et al., 2010). Auch für die DHA, auf deren protektive Eigenschaften hinsichtlich der Alzheimerpathologie zuvor bereits hingewiesen wurde, wurde demonstriert, dass sie die Sortierung von IDE in neuronalen Zellen durch eine gesteigerte exosomale Freisetzung dieses A β -katabolisierenden Enzyms beeinflusst (GRIMM et al., 2016c). In diesem Kontext sprechen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit dafür, dass mittelkettige gesättigte Fettsäuren (PC10:0-14:0) die Sekretion von IDE in das extrazelluläre Kompartiment stimulieren.

Im Gegensatz zu den kurzkettigen Fettsäuren bedingte die Inkubation von N2a-Zellen mit sehr langkettigen gesättigten Fettsäuren (PC20:0-24:0) eine verringerte IDE-abhängige A β -Degradation, die auf einen direkten inhibierenden Einfluss auf die katalytische Aktivität zurückgeführt werden konnte. Es wurde bereits vor dem Hintergrund, dass Fettleibigkeit und eine gesteigerte Freisetzung freier Fettsäuren vom Fettgewebe die Glukose-stimulierte Sekretion von Insulin durch β -Zellen des Pankreas beeinträchtigen (JIMENEZ et al., 1987; SVEDBERG et al., 1991), vermutet, dass auch IDE in diesem Zusammenhang eine mögliche Rolle zukommen könnte (GONZALEZ-CASIMIRO et al., 2021). Hamel *et al.* berichteten in ihrer *in vitro* Studie an IDE, welches teilweise aus der Leber männlicher Sprague-Dawley-Ratten isoliert wurde, dass langkettige freie Fettsäuren (C20) bis zu 90 % der Insulin-Degradation inhibierten. Mechanistisch lag dieser Beobachtung eine nicht-kompetitive Inhibition zugrunde.

Außerdem wurde vermutet, dass intrazelluläre sehr langkettige Fettsäuren IDE direkt beeinflussen und so in den Insulinmetabolismus eingreifen können. Diese Vermutung führten die Autoren darauf zurück, dass sie mit Hilfe eines *Proteomics*-Tools eine Bindeproteinsignatur für zytosolische Fettsäuren detektierten, während die Konsensussequenz unter Einbeziehung der dazwischenliegenden raumhaltenden Reste eine 83 %-ige Ähnlichkeit zur Aminosäuresequenz humanen IDEs aufweist (HAMEL et al., 2003). Die Anwesenheit einer Bindestelle für zytosolische Fettsäuren könnte durch Mutationsstudien innerhalb dieser potenziellen Sequenz im *IDE*-Gen weiter experimentell adressiert werden, um so die vermutete Bindung von Fettsäuren an dieses A β -degradierende Enzym weiter aufzuklären.

Insgesamt deuten die in der vorliegenden Arbeit in Kooperation mit Dr. Janine Mett gewonnenen Daten an, dass kurz- und mittelkettige gesättigte Fettsäuren hinsichtlich positiver Auswirkungen auf die IDE-medierte A β -Degradation den lang- und sehr langkettigen Fettsäuren vorzuziehen sind.

Das Ausbleiben der beobachteten Effekte der analysierten gesättigten Fettsäuren auf die A β -Degradation in *IDE-knockdown*-Zellen bestätigte, dass diese hauptsächlich durch IDE vermittelt werden. Außerdem wurden die Ergebnisse der *IDE-knockdown*-Analysen zur Validierung der IDE-Aktivitätsanalyse mittels kurzen fluorogenen Substratpeptiden herangezogen. Dies war von Relevanz, da der Verwendung dieser kurzen Peptide als Substrate einige Nachteile zugesprochen werden, wie beispielsweise die Tatsache, dass das eingesetzte Substrat nicht spezifisch für IDE ist, sondern auch durch andere Metalloproteasen gespalten werden kann (LEISSRING, 2021). So wurde beispielsweise berichtet, dass neben IDE auch das Angiotensin-konvertierende Enzym (ACE) in der Lage ist das in dieser Arbeit eingesetzte Substrat umzusetzen (LIU et al., 2012), weshalb die mittels *IDE-knockdown*-Zellen generierten Daten zwar auf einen hauptsächlichlichen Effekt der kurzkettigen gesättigten Fettsäuren auf die IDE-vermittelte A β -Degradation hinweisen, ein möglicher Einfluss einer veränderten ACE-Aktivität jedoch nicht komplett ausgeschlossen werden kann.

Zusätzlich zu diesen Ergebnissen der *in vitro* Versuche wurde auch *in vivo* im Serum von Mäusen, die mit einer Kokosnuss-Öl-angereicherten Diät gefüttert wurden, eine gesteigerte IDE-Aktivität im Vergleich zu Kontrolldiät-gefütterten Tieren detektiert. Auf Grund der verfügbaren Menge an murinem Gewebe konnte eine hauptsächlichliche Beteiligung von IDE an den beobachteten Effekten, wie sie *in vitro* durch *IDE-knockdown* bestätigt wurde, nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden. Diese Limitierung hätte experimentell mittels eines spezifischen IDE-Inhibitors, wie beispielsweise 6bK (MAIANTI et al., 2014), bei ausreichender Probenmenge adressiert werden können. Aus diesem Grund müssen die *in vivo* Daten mit Vorsicht bezüglich der potenziellen Beteiligung weiterer Proteasen interpretiert werden beziehungsweise in weiterführenden *in vivo* Studien adressiert werden. Nichtsdestotrotz könnte die in der vorliegenden Arbeit detektierte gesteigerte Aktivität von IDE im Serum Kokosnuss-Öl-gefütterter Mäuse durch eine vermehrte Freisetzung von IDE in den extrazellulären Raum, kombiniert mit der direkten Erhöhung der katalytischen Aktivität erklärt werden. Diese Zunahme der IDE-Aktivität im Serum könnte folglich eine Reduzierung der peripheren A β -Konzentrationen bedingen. Durch Verwendung des A β -spezifischen Antikörpers m266 demonstrierten DeMattos *et al.*, dass dessen periphere Anwendung im PDAPP^{+/+}-transgenen Alzheimermausmodell, in welchem die Expression eines mutierten humanen APP-Transgens in der Generierung von humanem A β im zentralen Nervensystem resultiert, in der Lage ist, den A β -Gehalt im Gehirn durch Veränderung der A β -Beseitigung im zentralen Nervensystem und Plasma zu reduzieren (DEMATTOS et al., 2001).

Diese und andere Beobachtungen ließen eine Form von Equilibrium zwischen dem A β in Gehirn und dem in der Peripherie vermuten. Die in diesem Zusammenhang entstandene „Senkungshypothese“ postuliert, dass durch die Modulierung des peripheren A β -Gehaltes der A β -Spiegel im Gehirn entsprechend verändert werden könnte, was einen möglichen Ansatzpunkt für Strategien zur Senkung der A β -Konzentrationen im Gehirn darstellt (ZHANG, LEE, 2011). Übereinstimmend damit wurde unter Verwendung des auch in der vorliegenden Arbeit herangezogenen Substrats eine negative Assoziation zwischen Alzheimer beziehungsweise MCI und der Aktivität derjenigen Serum-Proteasen, die die Degradation von A β mediierten, beschrieben (LIU et al., 2012). Neben A β sind auch mittelkettige gesättigte Fettsäuren in der Lage die Blut-Hirnschranke zu passieren. Bereits in frühen Studien wurde *in vivo* beobachtet, dass beispielsweise Myristinsäure (C14:0) über die Blut-Hirnschranke transportiert werden kann (SPECTOR, 1988), was ebenfalls in einem neueren Review beschrieben ist (AUGUSTIN et al., 2018). Basierend darauf könnte angenommen werden, dass mittelkettige Fettsäuren die Sekretion und Aktivität von IDE im Zentralnervensystem in einer ähnlichen Weise beeinflussen, wie in der vorliegenden Arbeit beobachtet. Dies wiederum würde die Degradation von extrazellulär akkumulierenden A β -Peptiden, welche eng mit der Alzheimerpathologie assoziiert sind, durch extrazelluläres IDE innerhalb des Hirngewebes fördern. Hinweise für eine derartige Vermittlung des positiven Einflusses von mittelkettigen Fettsäuren auf die Alzheimerpathologie lieferte eine Studie an Hunden, in welcher demonstriert wurde, dass die A β -Gesamtmenge im Parietallappen durch die nahrungsbedingte Aufnahme mittelkettiger Triglyzeride tendenziell reduziert werden kann (STUDZINSKI et al., 2008). Auf Grund dessen, dass neben der detektierten Verringerung des APP-Proteingehaltes keine Analyse der A β -Degradation durchgeführt wurde, müsste die Beteiligung von IDE an diesem vermuteten A β -reduzierenden Einfluss mittelkettiger Fettsäuren *in vivo* zukünftig experimentell adressiert werden. In diesem Zusammenhang könnte auch ein Fokus auf den potenziellen Einfluss von Kokosnuss-Öl auf den hepatischen Abbau von A β -Peptiden gelegt werden, da Insulin zwar einerseits auf Grund dessen, dass es selbst ein IDE-Substrat darstellt (MAIANTI et al., 2019), kompetitiv inhibierend auf die A β -Degradation wirkt (QIU, FOLSTEIN, 2006), andererseits Insulin aber auch den durch das Lipoprotein-Rezeptor-verwandte Protein (LRP) vermittelten hepatischen A β -Katabolismus aus dem Plasma beeinflusst. Tamaki *et al.* demonstrierten, dass diese Wirkung darüber vermittelt wird, dass Insulin im Plasma die Translokation von LRP-1 aus dem intrazellulären Pool in die hepatische Plasmamembran erleichtert und so die hepatische A β_{1-40} -Aufnahme aus dem Blut gesteigert wird (TAMAKI et al., 2007). Die Aufklärung des epidemiologisch beobachteten Zusammenhangs zwischen Diabetes mellitus Typ II und der Alzheimererkrankung auf molekularer Ebene ist daher Gegenstand aktueller Forschung, wobei auch die Entwicklung substratspezifischer Inhibitoren eine Rolle spielt (MAIANTI et al., 2019).

Zusammenfassend unterstreichen diese Daten, dass nicht nur mehrfach-ungesättigte Fettsäuren wie beispielsweise die DHA, sondern auch kurzkettige gesättigte Fettsäuren, wie sie beispielsweise in Kokosnuss-Öl enthalten sind, positive Effekte auf die Prävention oder die Behandlung der Alzheimererkrankung vermitteln können. Die hier detektierte Steigerung der IDE-medierten A β -Degradation stellt einen weiteren Mechanismus dar, durch welchen mittelkettige Fettsäuren diese positive Wirkung hinsichtlich Alzheimerpathologie vermitteln.

In der Literatur wurde aktuell beschrieben, dass dieser protektive Einfluss darüber hinaus auch auf die Zunahme zirkulierender Ketonkörper und gleichzeitige Verbesserung des zerebralen Energiemetabolismus (OTA et al., 2019) oder die Abnahme des oxidativen Stresses (METT, MULLER, 2021) zurückgeführt werden kann (CHATTERJEE et al., 2020b).

Im Gegensatz zur stimulierenden Wirkung der in der vorliegenden Arbeit analysierten mittelkettigen gesättigten Fettsäuren PC10:0-14:0 auf die Freisetzung sowie die katalytische Aktivität von IDE und die damit einhergehende gesteigerte Degradation von A β inhibierten die sehr langkettigen gesättigten Fettsäuren PC20:0-24:0 die IDE-Aktivität, was in einer reduzierten A β -Degradation und einem dadurch bedingten Anstieg des A β -Spiegels resultierte (Abbildung 59).

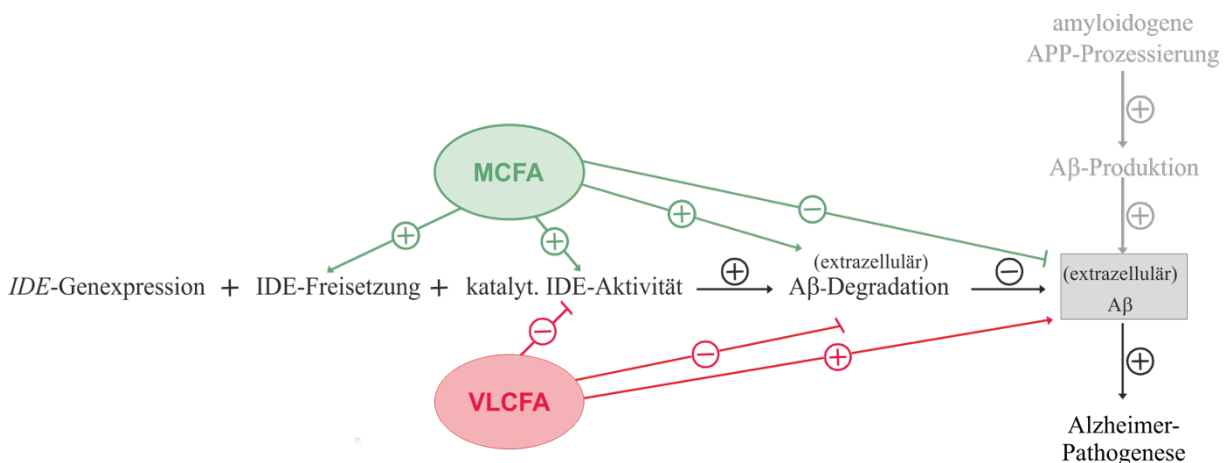


Abbildung 59: Schematische Darstellung der in der vorliegenden Arbeit detektierten Effekte von mittelkettigen und sehr langkettigen gesättigten Fettsäuren auf die IDE-vermittelte A β -Degradation. Die Inkubation muriner Neuroblastomzellen (N2a) mit den mittelkettigen gesättigten Fettsäuren PC10:0-14:0 resultierte in einer Reduzierung des A β -Spiegels, was auf eine gesteigerte A β -Degradation, bedingt durch eine erhöhte extrazelluläre Freisetzung sowie katalytische Aktivität von IDE in Anwesenheit von PC10:0-14:0, zurückgeführt werden konnte. Im Gegensatz dazu wurde eine Zunahme des extrazellulären A β -Spiegels im konditionierten Medium PC20:0-24:0-inkubierter N2a-Zellen detektiert, was sich durch eine direkte Inhibition der katalytischen IDE-Aktivität und folglich verringerten A β -Degradation erklären ließ. IDE: Insulin-degradierendes Enzym. MCFA: mittelkettige Fettsäuren. VLCFA: sehr langkettige Fettsäuren. A β : Amyloid beta. APP: Amyloides Vorläuferprotein. AD: Alzheimererkrankung. Abbildung verändert nach (METT et al., 2021).

Die gewonnenen Ergebnisse lassen vermuten, dass gesättigte Fettsäuren, welche in der vorliegenden Arbeit als beeinflussbar durch die Vitamine D und A beziehungsweise deren Derivate beschrieben werden konnten, neben ihren bekannten Effekten auf die an der APP-Prozessierung beteiligten Sekretasen auch durch unterschiedliche Wirkungen auf die IDE-abhängige A β -Degradation in der Lage sind die amyloidogene Alzheimerpathologie zu beeinflussen.

5.4 Die Analyse eines regulatorischen Rückkopplungszyklus zwischen der AICD und IDE

Das folgende Kapitel befasst sich mit der Einordnung des detektierten regulatorischen Rückkopplungszyklus zwischen AICD und dem A β -degradierenden Enzym IDE in den Kontext der aktuellen Fachliteratur.

Die in der vorliegenden Arbeit generierten Ergebnisse weisen eine gewisse Analogie des Insulin-degradierenden Enzyms (IDE) zu den APP-prozessierenden Sekretasen auf, welche sich beispielsweise dadurch äußert, dass beide Enzymgruppen, die entweder in den Katabolismus (IDE) oder den Anabolismus (Sekretasen) von A β involviert sind, durch Lipide reguliert werden können. In diesem Zusammenhang und basierend darauf, dass die Expression des β -Sekretase-kodierenden Gens *BACE* durch die APP-intrazelluläre Domäne AICD erhöht wird (VON ROTZ et al., 2004), ist die Analyse eines potenziellen regulierenden Einflusses der AICD auf die an der A β -Degradation beteiligten Enzyme Gegenstand aktueller Forschung (GRIMM et al., 2013b). Eine der vorliegenden Arbeit vorausgegangene Studie der Experimentellen Neurologie demonstrierte, dass die Gen- sowie Proteinexpression und auch die Aktivität von Neprilysin (NEP) durch die aus der β - und γ -Sekretase-vermittelten APP-Prozessierung resultierende AICD reguliert wird (GRIMM et al., 2015a). Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit früheren Publikationen, welche eine Presenilin-abhängige transkriptionelle Kontrolle von Neprilysin sowie die Notwendigkeit der AICD-Bindung an den *NEP*-Promotor beschreiben (BELYAEV et al., 2009; PARDOSSI-PIQUARD et al., 2005). Auf Grund dieser Rolle der AICD in der Regulierung von in die A β -Homöostase involvierten Enzymen in Form der β -Sekretase und Neprilysin sollte in der vorliegenden Arbeit ein potenzieller Einfluss der AICD auf das A β -degradierende Enzym IDE experimentell adressiert werden. Dieser könnte Bestandteil eines zusätzlichen Weges sein, über welchen Vitamin D die beobachteten Einflüsse auf die A β -Degradation vermitteln könnte. Durch die Lipidhomöostase-modulierenden Effekte könnte die beobachtete Beeinflussung der Sekretase-Aktivitäten mediiert werden, welche sich auf die Menge an transkriptionsregulatorischer AICD auswirken könnte, die dann in der Lage sein könnte die Expression des A β -degradierenden Proteins IDE zu regulieren. Hinweise für eine regulatorische Wirkung der AICD auf IDE oder weitere A β -degradierende Proteasen lieferte die Beobachtung, dass der NEP-spezifische Inhibitor Thiorphan die detektierten AICD-abhängigen Veränderungen im A β -Abbau nur partiell umkehren konnte (GRIMM et al., 2015a). Übereinstimmend damit wurden die Unterschiede hinsichtlich der A β -Degradation zwischen WT-MEF-Zellen (MEF WT) und MEF-Zellen ohne APP-Familie (MEF-APP/APLP2^{-/-}) als Folge einer Inkubation mit Thiorphan unter den in der vorliegenden Arbeit verwendeten experimentellen Bedingungen nur teilweise abgeschwächt. Speziell IDE ist hinsichtlich der A β -Homöostase von Bedeutung, da es spezifisch für Substrate ist, die β -Strukturen bilden. Somit stellt dieses Enzym ein wichtiges proteolytisches Werkzeug gegen die Bildung toxischer Oligomere dar (KUROCHKIN et al., 2018). Die Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen der IDE-Regulierung ist im Kontext der Alzheimerpathologie auch deshalb von Relevanz, da die Datenlage bezüglich der Expression sowie Aktivität dieses A β -degradierenden Enzyms in Alzheimer-Gehirnen kontrovers ist.

Dies wird daran deutlich, dass sowohl verminderte (STARGARDT et al., 2013; ZHAO et al., 2007), unveränderte (MINERS et al., 2010; WANG et al., 2010) als aber auch gesteigerte Aktivitäten von IDE (MINERS et al., 2009; MORELLI et al., 2004) im Zusammenhang mit der Alzheimerpathologie beschrieben wurden.

5.4.1.1 Der Einfluss der AICD auf die IDE-Gen- und Proteinexpression

In der vorliegenden Arbeit wurde demonstriert, dass neben den bereits identifizierten Zielgenen auch die Expression von *IDE* unter der transkriptionsregulatorischen Kontrolle der AICD steht. Die AICD interagiert dabei über die NPTY-Domäne mit dem Ko-Aktivatoren Fe65, der wiederum auch die Histon-Acetyltransferase Tip60 über deren NKSYP-Domäne binden kann (CAO, SUDHOF, 2001, 2004). Dieser AFT- (AICD-Fe65-Tip60-) Komplex kann nach Translokation in den Zellkern transkriptionsregulatorisch aktiv werden und die Expression einer Vielzahl unterschiedlicher Gene, die beispielsweise Neprilysin (GRIMM et al., 2015a) kodieren, regulieren (KONIETZKO et al., 2010). Sowohl in embryonalen Maus-Fibroblasten, in denen die AICD-Generierung auf Grund des Fehlens der γ -Sekretase-Komponente Presenilin beeinträchtigt war (MEF-PS1/2^{-/-}, SH-SY5Y-PS1^{-/-}), als auch in Zellen, die frei von APP oder der APP-Proteinfamilie waren (MEF-APP/APLP2^{-/-}, SH-SY5Y-APP^{-/-}), und Zellen, denen eine funktionelle AICD fehlte (MEF-APP Δ CT15), war die Transkription von *IDE* konsistent signifikant verringert. Die γ -Sekretase spaltet innerhalb der Transmembrandomäne von mehr als 70 verschiedenen Typ-1-Membranproteinen, wobei die beiden am besten analysierten Substrate die Notch-Familie, die in die zelluläre Differenzierung involviert ist, und APP sind (WOLFE, 2020). Diese Substratvielfalt machte eine Verifizierung der beobachteten verringerten *IDE*-Genexpression in Zellen ohne APP und damit AICD relevant. Die Expression eines verkürzten APP-Konstruktes, welchem die 15 C-terminalen Aminosäuren fehlen, bildete dabei den Verlust einer funktionellen AICD ab, da innerhalb dieser 15 Aminosäuren das YENPTY-Motiv liegt, welches, wie einleitend bereits beschrieben, für den Import von AICD in den Zellkern mit Hilfe des AFT-Komplexes essenziell ist.

Übereinstimmend mit der verminderten *IDE*-Genexpression, die in AICD-defizienten Zellen detektiert wurde, resultierten *in vitro* eine Überexpression von APP oder des AICD-kodierenden Fragments C50 sowie eine Inkubation mit AICD-Peptiden in einer gesteigerten Transkription von *IDE*. Dabei wurden die signifikant erhöhten *IDE*-mRNS-Mengen sowohl in humanen Neuroblastomzellen (SH-SY5Y), die das neuronale APP⁶⁹⁵ stabil überexprimierten als auch in embryonalen APP/APLP2-Knockout-Maus-Fibroblasten (MEF-APP/APLP2^{-/-}), die entweder APP⁶⁹⁵ oder die nicht-neuronalen APP⁷⁵¹ oder APP⁷⁷⁰ transient überexprimierten, detektiert. Zwischen den analysierten APP-Isoformen wurden keine Unterschiede in ihrer stimulierenden Wirkung auf die *IDE*-Transkription ausgemacht, allerdings wurde die noch weiter gesteigerte Expression von WT-Fibroblasten nicht erreicht. Ein potenzieller Grund hierfür könnte die endogene APLP2-Expression und damit die Entstehung des aus der γ -Sekretase-Prozessierung stammenden Fragments von APLP2 (ALID2) in MEF-WT-Zellen sein. Im Hinblick darauf, dass für ALID2 bereits ein Einfluss auf die NEP-Expression beschrieben wurde, kann anhand der vorliegenden Daten nicht ausgeschlossen werden, dass dieses Peptid auch einen regulierenden Effekt auf die *IDE*-Transkription ausübt. Pardossi-Piquard *et al.* berichteten in diesem Kontext von einer reduzierten NEP-Expression sowie -Aktivität in Fibroblasten, denen APLP2 fehlte.

Die Aktivität dieses A β -degradierenden Enzyms konnte durch eine Re-Transfizierung mit *APLP2* wieder gesteigert werden. In diesem Zusammenhang legten die Autoren auch dar, dass das Produkt der γ -Sekretase-Prozessierung des APP-Homologes *APLP1*, *ALID1*, ebenfalls eine erhöhte NEP-Aktivität bedingt (PARDOSSI-PIQUARD et al., 2005). Basierend darauf sollte die Analyse potenzieller Einflüsse von *ALID1* und *ALID2* auf die *IDE*-Transkription Gegenstand weiterführender Studien sein.

Den vorliegenden Ergebnissen, die zeigen, dass die drei APP-Isoformen (*APP*⁶⁹⁵, *APP*⁷⁵¹ und *APP*⁷⁷⁰) die mRNS-Spiegel von *IDE* gleichermaßen beeinflussen, stehen die Beobachtungen einer Studie gegenüber, die lediglich nach Transfektion der beiden APP-Isoformen *APP*⁷⁵¹ und *APP*⁷⁷⁰ eine gesteigerte *IDE*-Genexpression in humanen Neuroblastomzellen detektierten (NALIVAEVA et al., 2016). Dieser Studie ging jedoch eine Publikation derselben Autoren voraus, die aufzeigte, dass die transkriptionell aktive AICD vorzugsweise aus der β -Sekretase-vermittelten Spaltung der *APP*⁶⁹⁵-Isoform im Vergleich zu den beiden Isoformen *APP*⁷⁵¹ und *APP*⁷⁷⁰ hervorgeht. Lediglich die Überexpression von *APP*⁶⁹⁵ resultierte in erhöhten nuklearen AICD-Spiegeln sowie einer gesteigerten NEP-Expression in derselben humanen Neuroblastomzelllinie (BELYAEV et al., 2010). Die Unterschiede zwischen den aufgeführten Studien und den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit könnten auf verschiedene Niveaus der Überexpression oder auf die jeweils verwendeten Zelllinien (MEF-*APP/APLP2*^{-/-} vs. SH-SY5Y-WT) zurückgeführt werden. Darüber hinaus könnten die zitierten Ergebnisse darauf beruhen, dass es sich bei *APP*⁶⁹⁵ um die hauptsächliche Form dieses Transmembranproteins in Neuronen handelt (ROHAN DE SILVA et al., 1997) und eine Überexpression der vorwiegend in Gliazellen und Astrozyten vorkommenden Isoformen *APP*⁷⁵¹ und *APP*⁷⁷⁰ (CHAUVET et al., 1997; GUO et al., 2012) in neuronalen Zellen keine zweifelsfreien Rückschlüsse zulässt. Ausblickend sollte daher der Einfluss unterschiedlicher APP-Isoformen auf die *IDE*-Transkription beispielsweise mittels siRNS-Experimenten, die die Reduzierung einzelner APP-Spleißformen ermöglichen, sowie in geeigneten zellulären Modellen analysiert werden.

Die in der vorliegenden Arbeit aufgezeigte AICD-abhängige Regulierung der *IDE*-Genexpression wurde weiterführend in humanen Neuroblastomzellen durch die stabile Überexpression von *C50*, dem für die AICD von APP kodierenden Bereich, validiert. Übereinstimmend damit resultierte die Transfektion von *C50* oder eine Inkubation mit AICD-Peptiden in murinen Fibroblasten ohne funktionelle AICD (MEF-*APP* Δ CT15) oder γ -Sekretase (MEF-*PS1/2*^{-/-}) in einer signifikanten Zunahme der *Ide*-Transkription und des Proteingehaltes. Neben den beobachteten Effekten auf *IDE* bedingte die Wiedereinbringung einer funktionellen AICD in MEF-*PS1/2*^{-/-}-Zellen eine Erhöhung der A β -Degradation auf ein ähnliches Maß, wie es in MEF-*PS1*^{res}-Zellen detektiert wurde.

Übereinstimmend mit den Beobachtungen der AICD-vermittelten Regulierung der *IDE*-Transkription wurden in Zellen, denen die APP-Familie beziehungsweise eine funktionale AICD fehlte oder deren AICD-Bildung beeinträchtigt war, reduzierte *IDE*-Proteingehalte mittels Western Blot-Analyse detektiert. Die Beteiligung der aus der γ -Sekretase-Prozessierung stammenden AICD wurde dadurch validiert, dass sowohl in MEF-*PS1/2*^{-/-}-Zellen als auch in Fibroblasten, die mit dem γ -Sekretase-spezifischen-Inhibitor DAPT behandelt wurden, die *IDE*-Proteinmengen in gleichem Maße verringert waren. Zudem resultierten die auf Grund der fehlenden AICD verringerten *IDE*-Proteinmengen in einer reduzierten katalytischen Aktivität und damit einhergehend in einer beeinträchtigten A β -Degradation.

5.4.1.2 Effekte der AICD auf die Aktivität des *Ide*-Promotors

Um die transkriptionsregulatorischen Einflüsse der AICD auf IDE auf molekularer Ebene weiter aufklären zu können, wurde die *Ide*-Promotoraktivität in An- und Abwesenheit von AICD analysiert. Auf Grund dessen, dass die *Ide*-Promotoraktivität in Fibroblasten ohne APP oder funktionale AICD reduziert war, wohingegen diese in MEF-APP Δ CT15-Zellen, die mit C50 re-transfiziert wurden, signifikant erhöht war, kann ein direkter Einfluss von AICD auf die Aktivität des *Ide*-Promotors vermutet werden. Dies würde im Einklang mit der in der Literatur beschriebenen Bindung der AICD an Promotoren einiger Gene stehen (PARDOSSI-PIQUARD, CHECLER, 2012). Beispielsweise wurde bereits für die AICD-Zielgene *KAIL/CD82*, das ein Transmembranprotein der Tetraspanin-Familie kodiert, welches die Funktion von Membranrezeptoren reguliert (BAEK et al., 2002; VON ROTZ et al., 2004); *NEP*, das Neprilysin, eines der hauptsächlich A β -degradierenden Enzyme, kodiert (BELYAEV et al., 2009; PARDOSSI-PIQUARD et al., 2005; XU et al., 2011); *p53*, welches für den Tumorsuppressor p53 kodiert, dessen Aktivierung zur Entstehung der Alzheimererkrankung und anderer neurodegenerative Erkrankungen beitragen könnte (ALVES DA COSTA et al., 2006; OZAKI et al., 2006); *LRP1*, das für den hauptsächlich ApoE/Lipoprotein-Rezeptor LRP1 kodiert (LIU et al., 2007); *CHOP*, das auf Stress des Endoplasmatischen Retikulums reagiert (TAKAHASHI et al., 2009), eine Promotorbindung berichtet.

5.4.1.3 Die Relevanz der AICD-abhängigen *IDE*-Genexpression *in vivo*

Die *in vivo* Relevanz der vorliegenden Ergebnisse wurde weiterführend in Hirnproben von APP-Knockout-Mäusen sowie von heterozygoten Mäusen, die ein verkürztes APP-Konstrukt ohne funktionale AICD exprimieren, analysiert. In den Proben beider Mausmodelle resultierte die Genexpressionsanalyse in verringerten *Ide*-mRNS-Mengen.

Neben diesen Tiermodellen war auch die Analyse der *IDE*- und *APP*-Transkription in humanen *post mortem* Hirnproben Gegenstand dieser Arbeit. In beiden, anhand des Braak-Status differenzierten, Kohorten (Braak 1-3 und Braak 4-6) wurden positive Korrelationen zwischen *IDE*- und *APP*-mRNS detektiert. Zusätzlich korrelierten auch die IDE-Proteingehälter in repräsentativen humanen Proben mit den Braak-Stadien 1-6 mit denen von APP. Die Analyse einer potenziellen Korrelation zwischen AICD-Spiegel und *IDE*-Expression war auf Grund der durchschnittlichen *post mortem* Verzögerung von circa sechs Stunden und der deutlich geringeren Halbwertszeit von AICD-Peptiden, die bei circa 10 Minuten liegt (KIMBERLY et al., 2001), unmöglich. Basierend auf dieser Limitierung wurde auf die Analyse der APP-mRNS- oder Proteinspiegel zurückgegriffen, was bedingt, dass diese *in vivo* gewonnenen Daten vorsichtig interpretiert werden sollten. Ein weiterer Vorbehalt, der in diesem Kontext Beachtung finden sollte, ist der, dass die Braak-Stadien anhand der Tau-Pathologie und nicht anhand von veränderten APP-, A β - oder AICD-Spiegeln charakterisiert werden (Kapitel 2.1.1.3).

5.4.1.4 Der regulatorische Rückkopplungszyklus zwischen der AICD und IDE

Die vorliegenden Daten weisen auf einen regulatorischen Rückkopplungszyklus der AICD-abhängigen IDE-Regulierung hin, da die AICD auf Grund dessen, dass IDE auch in der Lage ist, AICD-Peptide zu degradieren (EDBAUER et al., 2002), ihren eigenen Katabolismus fördert (Abbildung 60).

Die Ergebnisse von Edbauer *et al.*, die IDE als AICD-spaltende zytoplasmatische Protease identifizierten und unter anderem durch die Zugabe von Insulin zur *in vitro* Degradationsanalyse und daraus resultierender Beeinträchtigung des AICD-Abbaus verifizierten (EDBAUER *et al.*, 2002), wurden in weiteren Publikationen validiert. So wurde beispielsweise eine Akkumulierung der AICD in IDE^{-/-}-Mäusen detektiert (FARRIS *et al.*, 2003). Dieser Zyklus ist eng mit einem zweiten, negativen, Rückkopplungsmechanismus assoziiert, in welchem die AICD durch eine Interaktion mit dem Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein-(WASP)-Familie-Verprolin-homologes-Protein-1-(WAVE1) Signalweg die APP-Prozessierung und somit die Generierung von A β reduziert (Abbildung 60). Proteine der WASP- und WAVE-Proteinfamilie interagieren mit dem ARP2/3-Komplex und fördern dadurch die Re-Organisierung des Aktin-Zytoskeletts, welche unter anderem für den vesikulären Transport wichtig ist. Sie können als Gerüstproteine angesehen werden, die Signale von Protein-Protein- sowie Protein-Membran-Interaktionen in Aktin-Polymerisierung umsetzen. Da eine Vielzahl membrangebundener Proteine mit der WASP- und WAVE-Familie interagiert, wird eine membranabhängige Regulierung der Aktin-Polymerisierung angenommen (TAKENAWA, SUETSUGU, 2007). Ceglia *et al.* demonstrierten in N2a-Zellen, dass die AICD den *Wave1*-Promotor bindet und dadurch dessen Transkription verringert. Auf Grund dessen, dass WAVE1 im Golgi-Apparat mit APP interagiert, resultiert eine Reduzierung von WAVE1 in einer verminderten Abknospung von APP-enthaltenden Vesikeln vom Golgi-Apparat und folglich reduzierten Mengen an APP an der Zelloberfläche, wodurch die Generierung von A β abnimmt (CEGLIA *et al.*, 2015).

Dieser kombinierte Rückkopplungszyklus (Abbildung 60) ist von besonderer Relevanz, um die strenge Regulierung von A β -Anabolismus und A β -Katabolismus, welcher gerade deshalb von Wichtigkeit ist, da es sich bei der APP-Prozessierung und somit A β -Generierung um einen unter physiologischen Bedingungen konstant ablaufenden Prozess handelt, auf molekularer Ebene aufklären zu können. Die vorliegenden Daten identifizierten AICD in diesem Zusammenhang als zentrales Element, da es an der Regulierung von sowohl A β -Produktion als auch A β -Degradation beteiligt ist und darüber hinaus auch seine eigene Degradation reguliert. Die Beeinträchtigung dieser komplexen Regulierungszyklen führt unter pathologischen Bedingungen zur Akkumulierung von A β und damit verbunden zur Progression der Alzheimererkrankung.

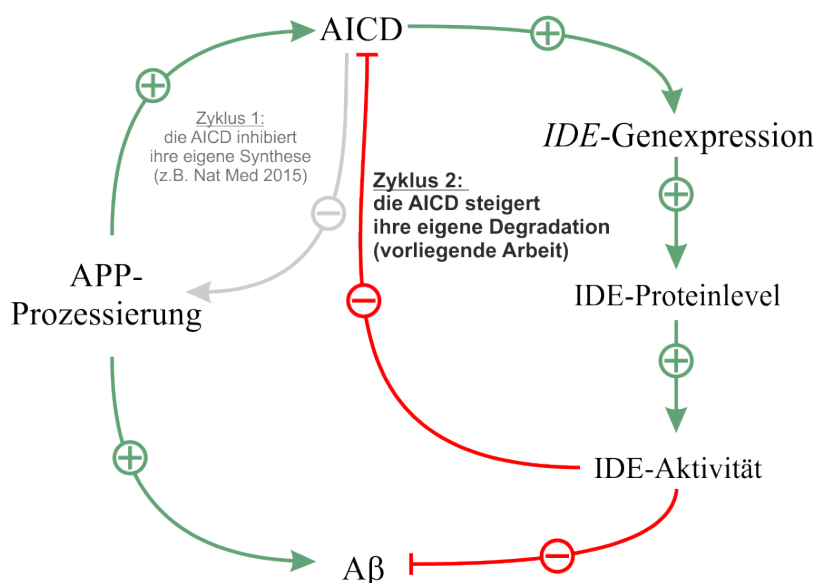


Abbildung 60: Schematische Übersicht über die kombinierten Rückkopplungszyklen zwischen AICD und dem Anabolismus sowie IDE-vermittelten Katabolismus von A β . In der Literatur ist bereits bekannt, dass die AICD in der Lage ist, die APP-Prozessierung reduzierend zu regulieren und somit ihren eigenen Anabolismus zu beeinflussen (**Zyklus 1**). Gleichzeitig reguliert die AICD die IDE-Genexpression, was entweder direkt oder vermittelt durch den AICD/PGC-1 α /PPAR γ -Signalweg bedingt wird. Dies resultiert in erhöhten IDE-Proteinmengen und einer gesteigerten IDE-Enzymaktivität, was wiederum die Degradation von A β und AICD stimuliert (**Zyklus 2**). AICD: APP-Intrazelluläre Domäne. IDE: Insulin-degradierendes Enzym. A β : Amyloid beta. APP: Amyloides Vorläuferprotein. Abbildung verändert nach (LAUER et al., 2020).

5.5 Ausblick

Im Rahmen der *in vivo* Untersuchung potenzieller Einflüsse des therapeutisch eingesetzten Vitamin A-Derivates Acitretin auf das Lipidom wurden unterschiedliche Effekte auf die beiden untersuchten Gewebearten Leber und Gehirn detektiert. Gerade hinsichtlich der Alzheimerpathologie resultierte die Acitretinbehandlung in positiven Veränderungen, jedoch auch in unerwünschten Effekten wie den reduzierten Spiegel an Sphingomyelinspezies sowie DHA- und EPA-haltigen Phospholipiden. Aufbauend darauf sind weitere Studien erforderlich, die an diesen detektierten Veränderungen anknüpfen und deren potenziellen Einfluss auf die Pathologie der Alzheimererkrankung detaillierter aufklären.

Eine weitere Untersuchung, auch in späteren klinischen Studien, ist insbesondere deshalb wichtig, da die APP-abhängige Lipidregulation durch die Alzheimerpathologie verändert werden kann und es dadurch im Laufe der Alzheimerprogression zu unerwünschten Wechselwirkungen mit den Acitretin-vermittelten Lipidveränderungen kommen kann. Hierzu könnten in einem ersten Ansatz WT-Mäuse einer identischen Acitretin- beziehungsweise Kontrollbehandlung unterzogen werden und eine Untersuchung der Lipidhomöostase mittels *Lipidomics*-Analyse durchgeführt werden. Ein Vergleich der hauptsächlichen Veränderungen einzelner Lipidspezies zwischen WT und transgenen Mäusen würde Hinweise darauf liefern, dass sich die Alzheimerpathologie beziehungsweise deren Progression auf die Lipidhomöostase sowie die Acitretin-vermittelten Effekte auf den Lipidmetabolismus auswirkt.

6 Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge

6.1 Publikationen im Rahmen der vorliegenden Arbeit

- 1) Mett J, **Lauer AA**, Janitschke D, Griebisch LV, Theiss EL, Grimm HS, Koivisto H, Tanila H, Hartmann T, Grimm MOW. *Medium-Chain Length Fatty Acids Enhance β Degradation by Affecting Insulin-Degrading Enzyme*. Cells. 2021 Oct 29;10(11):2941. doi: 10.3390/cells10112941. PMID: 34831163; PMCID: PMC8616162.
- 2) **Lauer AA**, Griebisch LV, Pilz SM, Janitschke D, Theiss EL, Reichrath J, Herr C, Beisswenger C, Bals R, Valencak TG, Portius D, Grimm HS, Hartmann T, Grimm MOW. *Impact of Vitamin D3 Deficiency on Phosphatidylcholine-/Ethanolamine, Plasmalogen-, Lyso-Phosphatidylcholine-/Ethanolamine, Carnitine- and Triacyl Glyceride-Homeostasis in Neuroblastoma Cells and Murine Brain*. Biomolecules. 2021 Nov 15;11(11):1699. doi: 10.3390/biom11111699. PMID: 34827697; PMCID: PMC8615687.
- 3) **Lauer AA**^{*}, Janitschke D^{*}, Dos Santos Guilherme M^{*}, Nguyen VTT, Bachmann CM, Qiao S, Schrul B, Boehm U, Grimm HS, Hartmann T, Endres K^{*}, Grimm MOW^{*}. *Shotgun lipidomics of liver and brain tissue of Alzheimer's disease model mice treated with acitretin*. Sci Rep. 2021 Jul 27;11(1):15301. doi: 10.1038/s41598-021-94706-3. PMID: 34315969; PMCID: PMC8316403.
- 4) **Lauer AA**^{*}, Mett J^{*}, Janitschke D, Thiel A, Stahlmann CP, Bachmann CM, Ritzmann F, Schrul B, Müller UC, Stein R, Riemenschneider M, Grimm HS, Hartmann T^{*}, Grimm MOW^{*}. *Regulatory feedback cycle of the insulin-degrading enzyme and the amyloid precursor protein intracellular domain: Implications for Alzheimer's disease*. Aging Cell. 2020 Nov;19(11):e13264. doi: 10.1111/acel.13264. Epub 2020 Oct 31. PMID: 33128835; PMCID: PMC7681056.
- 5) Grimm MOW^{*}, **Lauer AA**^{*}, Grösgen S, Thiel A, Lehmann J, Winkler J, Janitschke D, Herr C, Beisswenger C, Bals R, Grimm HS, Hartmann T. Profiling of Alzheimer's disease related genes in mild to moderate vitamin D hypovitaminosis. J Nutr Biochem. 2019 May;67:123-137. doi: 10.1016/j.jnutbio.2019.01.015. Epub 2019 Feb 11. PMID: 30889441.
- 6) Grimm MOW^{*}, Thiel A^{*}, **Lauer AA**, Winkler J, Lehmann J, Regner L, Nelke C, Janitschke D, Benoist C, Streidenberger O, Stötzel H, Endres K, Herr C, Beisswenger C, Grimm HS, Bals R, Lammert F, Hartmann T. *Vitamin D and Its Analogues Decrease Amyloid- β (β) Formation and Increase β -Degradation*. Int J Mol Sci. 2017 Dec 19;18(12):2764. doi: 10.3390/ijms18122764. PMID: 29257109; PMCID: PMC5751363.

^{*} equally contributed

6.2 Weitere Publikationen

- 1) Theiss EL^{*}, Griebisch LV^{*}, **Lauer AA**, Janitschke D, Erhardt VKJ, Haas EC, Kuppler KN, Radermacher J, Walzer O, Portius D, Grimm HS, Hartmann T, Grimm MOW. *Vitamin B12 Attenuates Changes in Phospholipid Levels Related to Oxidative Stress in SH-SY5Y Cells*. Cells. 2022 Aug 18;11(16):2574. doi: 10.3390/cells11162574. PMID: 36010649; PMCID: PMC9406929.

- 2) Lyschik S*, **Lauer AA***, Roth T, Janitschke D, Hollander M, Will T, Hartmann T, Kopito RR, Helms V, Grimm MOW, Schrul B. *PEX19 Coordinates Neutral Lipid Storage in Cells in a Peroxisome-Independent Fashion*. Front Cell Dev Biol. 2022 Apr 26;10:859052. doi: 10.3389/fcell.2022.859052. PMID: 35557938; PMCID: PMC9086359.
- 3) Janitschke D*, **Lauer AA***, Bachmann CM, Winkler J, Griebisch LV, Pilz SM, Theiss EL, Grimm HS, Hartmann T, Grimm MOW. *Methylxanthines Induce a Change in the AD/Neurodegeneration-Linked Lipid Profile in Neuroblastoma Cells*. Int J Mol Sci. 2022 Feb 18;23(4):2295. doi: 10.3390/ijms23042295. PMID: 35216410; PMCID: PMC8875332.
- 4) **Lauer AA***, Grimm HS*, Apel B, Golobrodskaja N, Kruse L, Ratanski E, Schulten N, Schwarze L, Slawik T, Sperlich S, Vohla A, Grimm MOW. *Mechanistic Link between Vitamin B12 and Alzheimer's Disease*. Biomolecules. 2022 Jan 14;12(1):129. doi: 10.3390/biom12010129. PMID: 35053277; PMCID: PMC8774227. **Editor's Choice**
- 5) Kurokin I*, **Lauer AA***, Janitschke D*, Winkler J, Theiss EL, Griebisch LV, Pilz SM, Matschke V, van der Laan M, Grimm HS, Hartmann T, Grimm MOW. *Targeted Lipidomics of Mitochondria in a Cellular Alzheimer's Disease Model*. Biomedicines. 2021 Aug 21;9(8):1062. doi: 10.3390/biomedicines9081062. PMID: 34440266; PMCID: PMC8393816.
- 6) Ramesh G*, Jarzembowski L*, Schwarz Y*, Poth V, Konrad M, Knapp ML, Schwär G, **Lauer AA**, Grimm MOW, Alansary D, Bruns D, Niemeyer BA. *A short isoform of STIM1 confers frequency-dependent synaptic enhancement*. Cell Rep. 2021 Mar 16;34(11):108844. doi: 10.1016/j.celrep.2021.108844. PMID: 33730587.
- 7) Janitschke D*, **Lauer AA***, Bachmann CM, Grimm HS, Hartmann T, Grimm MOW. *Methylxanthines and Neurodegenerative Diseases: An Update*. Nutrients. 2021 Feb 28;13(3):803. doi: 10.3390/nu13030803. PMID: 33671099; PMCID: PMC8000915.
- 8) Janitschke D*, **Lauer AA***, Bachmann CM*, Seyfried M, Grimm HS, Hartmann T, Grimm MOW. *Unique Role of Caffeine Compared to Other Methylxanthines (Theobromine, Theophylline, Pentoxifylline, Propentofylline) in Regulation of AD Relevant Genes in Neuroblastoma SH-SY5Y Wild Type Cells*. Int J Mol Sci. 2020 Nov 27;21(23):9015. doi: 10.3390/ijms21239015. PMID: 33260941; PMCID: PMC7730563.
- 9) Grimm MOW, Blümel T, **Lauer AA**, Janitschke D, Stahlmann C, Mett J, Haupenthal VJ, Miederer AM, Niemeyer BA, Grimm HS, Hartmann T. *The impact of capsaicinoids on APP processing in Alzheimer's disease in SH-SY5Y cells*. Sci Rep. 2020 Jun 8;10(1):9164. doi: 10.1038/s41598-020-66009-6. PMID: 32514053; PMCID: PMC7280252.
- 10) Janitschke D*, Nelke C*, **Lauer AA**, Regner L, Winkler J, Thiel A, Grimm HS, Hartmann T, Grimm MOW. *Effect of Caffeine and Other Methylxanthines on β -Homeostasis in SH-SY5Y Cells*. Biomolecules. 2019 Nov 2;9(11):689. doi: 10.3390/biom9110689. PMID: 31684105; PMCID: PMC6920871. **Editor's Choice**
- 11) **Lauer AA**, Janitschke D, Hartmann T, Grimm HS, Grimm MO. *The Effects of Vitamin D Deficiency on Neurodegenerative Diseases*. In (Ed.), Vitamin D Deficiency. 2019. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.89160>

* equally contributed

6.3 Konferenzbeiträge

- 1) **Lauer AA**, Thiel A, Lehmann J, Janitschke D, Winkler J, Griebisch LV, Theiss EL, Bals R, Riemenschneider M, Grimm HS, Hartmann T, Grimm MOW. (2022). *Influence of a mild vitamin D hypovitaminosis on the Alzheimer's disease pathology*. Joint International Symposium Vitamin D In Prevention And Therapy & Biologic Effects Of Light 2022, Homburg, Germany (Posterpräsentation)
- 2) **Lauer AA**, Janitschke D, Thiel A, Bachmann C, Winkler J, Herr C, Bals R, Grimm H, Hartmann T, Grimm MOW. (2020). Vitamin D and its analogues in Alzheimer's disease & Ab homeostasis. The 14th World Congress on Controversies in Neurology (CONy), CONy Virtual 2020 Congress (Posterpräsentation)
- 3) **Lauer AA**, Thiel A, Lehmann J, Janitschke D, Winkler J, Riemenschneider M, Bals R, Grimm HS, Hartmann T, Grimm MOW. (2019). *Impact of vitamin D and its analogues on Alzheimer's disease*. Joint International Symposium Vitamin D In Prevention And Therapy & Biologic Effects Of Light 2019, Homburg, Germany (Posterpräsentation)
- 4) Stahlmann CP, **Lauer AA**, Streidenberger O, Schorr P, Mylonas N, Mett J, Riemenschneider M, Müller U, Volmer DA, Grimm HS, Hartmann T, Grimm MOW. (2018). *Link between altered ceramide homeostasis and amyloidogenic processing in Alzheimer's disease*. European Mass Spectrometry Conference (EMSC) 2018, Saarbrücken, Germany (Posterpräsentation)
- 5) **Schorr P**, **Lauer AA**, Regner L, Mett J, Grimm HS, Stahlmann CP, Grimm MOW, Hartmann T, Volmer DA (2018). Investigating the role of vitamin E in Alzheimer's disease using a new high-throughput extraction and LC-MS/MS method. European Mass Spectrometry Conference (EMSC) 2018, Saarbrücken, Germany (Posterpräsentation)
- 6) **Lauer AA**, Thiel A, Lehmann J, Stahlmann CP, Winkler J, Regner L, Nelke C, Grimm HS, Riemenschneider M, Bals R, Hartmann T, Grimm MOW. (2017). *Vitamin D and their analogues: A mechanistical link to Alzheimer's disease*. Lipids and Brain IV: Lipids in Alzheimer's disease 2017, Nancy, France (Posterpräsentation)

6.4 Durch *Web of Science* verifizierte peer reviewer Tätigkeiten

- 1) BMC Neuroscience
- 2) Experimental Gerontology
- 3) Heliyon
- 4) INQUIRY: The Journal of Health Care Organization, Provision, and Financing
- 5) Metabolic Brain Disease
- 6) Physiology & Behavior

Web of Science ResearcherID: ABE-6195-2022

7 Literaturverzeichnis

1. Abreha MH, Dammer EB, Ping L, Zhang T, Duong DM, Gearing M, . . . Seyfried NT (2018) Quantitative Analysis of the Brain Ubiquitylome in Alzheimer's Disease. *Proteomics* 18:e1800108
2. Afzal S, Bojesen SE, Nordestgaard BG (2014) Reduced 25-hydroxyvitamin D and risk of Alzheimer's disease and vascular dementia. *Alzheimers Dement* 10:296-302
3. Agholme L, Lindstrom T, Kagedal K, Marcusson J, Hallbeck M (2010) An in vitro model for neuroscience: differentiation of SH-SY5Y cells into cells with morphological and biochemical characteristics of mature neurons. *J Alzheimers Dis* 20:1069-1082
4. Alam J, Cook JL (1990) Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. *Anal Biochem* 188:245-254
5. Alamro AA, Alsulami EA, Almutlaq M, Alghamedi A, Alokail M, Haq SH (2020) Therapeutic Potential of Vitamin D and Curcumin in an In Vitro Model of Alzheimer Disease. *J Cent Nerv Syst Dis* 12:1179573520924311
6. Albanese E, Dangour AD, Uauy R, Acosta D, Guerra M, Guerra SS, . . . Prince MJ (2009) Dietary fish and meat intake and dementia in Latin America, China, and India: a 10/66 Dementia Research Group population-based study. *Am J Clin Nutr* 90:392-400
7. Alisio A, Canas F, de Bronia DH, Pereira R, Tolosa de Talamoni N (1997) Effect of vitamin D deficiency on lipid composition and calcium transport in basolateral membrane vesicles from chick intestine. *Biochem Mol Biol Int* 42:339-347
8. Allinson TM, Parkin ET, Condon TP, Schwager SL, Sturrock ED, Turner AJ, Hooper NM (2004) The role of ADAM10 and ADAM17 in the ectodomain shedding of angiotensin converting enzyme and the amyloid precursor protein. *Eur J Biochem* 271:2539-2547
9. Almeida CG, Takahashi RH, Gouras GK (2006) Beta-amyloid accumulation impairs multivesicular body sorting by inhibiting the ubiquitin-proteasome system. *J Neurosci* 26:4277-4288
10. Alonso AC, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1994) Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:5562-5566
11. Alvarez-Diaz S, Larriba MJ, Lopez-Otin C, Munoz A (2010) Vitamin D: Proteases, protease inhibitors and cancer. *Cell Cycle* 9:32-37
12. Alves da Costa C, Sunyach C, Pardossi-Piquard R, Sevalle J, Vincent B, Boyer N, . . . Checler F (2006) Presenilin-dependent gamma-secretase-mediated control of p53-associated cell death in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 26:6377-6385
13. Alzheimer A, Stelzmann RA, Schnitzlein HN, Murtagh FR (1995) An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Uber eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clin Anat* 8:429-431
14. Alzheimer's-Association-Report (2021) 2021 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* 17:327-406
15. Annweiler C, Allali G, Allain P, Bridenbaugh S, Schott AM, Kressig RW, Beauchet O (2009) Vitamin D and cognitive performance in adults: a systematic review. *Eur J Neurol* 16:1083-1089
16. Annweiler C, Le Gall D, Fantino B, Beauchet O, Tucker KL, Buell JS (2010) 25-hydroxyvitamin D, dementia, and cerebrovascular pathology in elders receiving home services. *Neurology* 75:95; author reply 95-96
17. Annweiler C, Souberbielle JC, Schott AM, de Decker L, Berrut G, Beauchet O (2011) [Vitamin D in the elderly: 5 points to remember]. *Geriatr Psychol Neuropsychiatr Vieil* 9:259-267
18. Annweiler C, Rolland Y, Schott AM, Blain H, Vellas B, Herrmann FR, Beauchet O (2012) Higher vitamin D dietary intake is associated with lower risk of Alzheimer's disease: a 7-year follow-up. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 67:1205-1211
19. Annweiler C, Llewellyn DJ, Beauchet O (2013) Low serum vitamin D concentrations in Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *J Alzheimers Dis* 33:659-674
20. Annweiler C (2017) Vitamin D-mentia: Is Vitamin D Optional or Essential for Preventing Late-Life Cognitive Decline? *J Am Geriatr Soc* 65:2155-2157
21. Arellanes IC, Choe N, Solomon V, He X, Kavin B, Martinez AE, . . . Yassine HN (2020) Brain delivery of supplemental docosahexaenoic acid (DHA): A randomized placebo-controlled clinical trial. *EBioMedicine* 59:102883
22. Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT (1992) Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* 42:631-639

23. Asai M, Hattori C, Szabo B, Sasagawa N, Maruyama K, Tanuma S, Ishiura S (2003) Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP alpha-secretase. *Biochem Biophys Res Commun* 301:231-235
24. Ashe KH (2020) The biogenesis and biology of amyloid beta oligomers in the brain. *Alzheimers Dement* 16:1561-1567
25. Atri A (2019) The Alzheimer's Disease Clinical Spectrum: Diagnosis and Management. *Med Clin North Am* 103:263-293
26. Augustin K, Khabbush A, Williams S, Eaton S, Orford M, Cross JH, . . . Williams RSB (2018) Mechanisms of action for the medium-chain triglyceride ketogenic diet in neurological and metabolic disorders. *Lancet Neurol* 17:84-93
27. Ayala A, Munoz MF, Arguelles S (2014) Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev* 2014:360438
28. Bader JM, Geyer PE, Muller JB, Strauss MT, Koch M, Leypoldt F, . . . Mann M (2020) Proteome profiling in cerebrospinal fluid reveals novel biomarkers of Alzheimer's disease. *Mol Syst Biol* 16:e9356
29. Baek SH, Ohgi KA, Rose DW, Koo EH, Glass CK, Rosenfeld MG (2002) Exchange of N-CoR corepressor and Tip60 coactivator complexes links gene expression by NF-kappaB and beta-amyloid precursor protein. *Cell* 110:55-67
30. Balabanova S, Richter HP, Antoniadis G, Homoki J, Kremmer N, Hanle J, Teller WM (1984) 25-Hydroxyvitamin D, 24, 25-dihydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D in human cerebrospinal fluid. *Klin Wochenschr* 62:1086-1090
31. Balak DMW, Gerdes S, Parodi A, Salgado-Boquete L (2020) Long-term Safety of Oral Systemic Therapies for Psoriasis: A Comprehensive Review of the Literature. *Dermatol Ther (Heidelb)* 10:589-613
32. Balion C, Griffith LE, Striffler L, Henderson M, Patterson C, Heckman G, . . . Raina P (2012) Vitamin D, cognition, and dementia: a systematic review and meta-analysis. *Neurology* 79:1397-1405
33. Barberger-Gateau P, Letenneur L, Deschamps V, Peres K, Dartigues JF, Renaud S (2002) Fish, meat, and risk of dementia: cohort study. *BMJ* 325:932-933
34. Barnard ND, Bunner AE, Agarwal U (2014) Saturated and trans fats and dementia: a systematic review. *Neurobiol Aging* 35 Suppl 2:S65-73
35. Bateman RJ, Munsell LY, Morris JC, Swarm R, Yarasheski KE, Holtzman DM (2006) Human amyloid-beta synthesis and clearance rates as measured in cerebrospinal fluid in vivo. *Nat Med* 12:856-861
36. Baulac S, Lu H, Strahle J, Yang T, Goldberg MS, Shen J, . . . Xia W (2009) Increased DJ-1 expression under oxidative stress and in Alzheimer's disease brains. *Mol Neurodegener* 4:12
37. Bellenguez C, Kucukali F, Jansen IE, Kleindam L, Moreno-Grau S, Amin N, . . . Lambert JC (2022) New insights into the genetic etiology of Alzheimer's disease and related dementias. *Nat Genet* 54:412-436
38. Belyaev ND, Nalivaeva NN, Makova NZ, Turner AJ (2009) Neprilysin gene expression requires binding of the amyloid precursor protein intracellular domain to its promoter: implications for Alzheimer disease. *EMBO Rep* 10:94-100
39. Belyaev ND, Kellett KA, Beckett C, Makova NZ, Revett TJ, Nalivaeva NN, . . . Turner AJ (2010) The transcriptionally active amyloid precursor protein (APP) intracellular domain is preferentially produced from the 695 isoform of APP in a {beta}-secretase-dependent pathway. *J Biol Chem* 285:41443-41454
40. Bennett DA, Schneider JA, Arvanitakis Z, Kelly JF, Aggarwal NT, Shah RC, Wilson RS (2006) Neuropathology of older persons without cognitive impairment from two community-based studies. *Neurology* 66:1837-1844
41. Bergau N, Maul S, Rujescu D, Simm A, Navarrete Santos A (2019) Reduction of Glycolysis Intermediate Concentrations in the Cerebrospinal Fluid of Alzheimer's Disease Patients. *Front Neurosci* 13:871
42. Berger T, Lee H, Young AH, Aarsland D, Thuret S (2020) Adult Hippocampal Neurogenesis in Major Depressive Disorder and Alzheimer's Disease. *Trends Mol Med* 26:803-818
43. Berridge MJ (2016) Vitamin D, reactive oxygen species and calcium signalling in ageing and disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 371
44. Berridge MJ (2017) Vitamin D deficiency accelerates ageing and age-related diseases: a novel hypothesis. *J Physiol* 595:6825-6836

45. Bie N, Li J, Li C, Lian R, Qin L, Wang C (2021) Protective effect and mechanism of docosahexaenoic acid on the cognitive function in female APP/PS1 mice. *Food Funct* 12:11435-11448
46. Bierer LM, Hof PR, Purohit DP, Carlin L, Schmeidler J, Davis KL, Perl DP (1995) Neocortical neurofibrillary tangles correlate with dementia severity in Alzheimer's disease. *Arch Neurol* 52:81-88
47. Biessels GJ, Staekenborg S, Brunner E, Brayne C, Scheltens P (2006) Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. *Lancet Neurol* 5:64-74
48. Biessels GJ, Strachan MW, Visseren FL, Kappelle LJ, Whitmer RA (2014) Dementia and cognitive decline in type 2 diabetes and prediabetic stages: towards targeted interventions. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2:246-255
49. Bikle DD (2000). Vitamin D: Production, Metabolism and Mechanisms of Action. In *Endotext*, Feingold KR, B Anawalt, A Boyce, G Chrousos, WW de Herder, K Dhatariya, K Dungan, JM Hershman, J Hofland, S Kalra, *et al.*, eds. (South Dartmouth (MA)).
50. Binderup L (1993) Comparison of calcipotriol with selected metabolites and analogues of vitamin D3: effects on cell growth regulation in vitro and calcium metabolism in vivo. *Pharmacol Toxicol* 72:240-244
51. Bivona G, Lo Sasso B, Gambino CM, Giglio RV, Scazzone C, Agnello L, Ciaccio M (2021) The Role of Vitamin D as a Biomarker in Alzheimer's Disease. *Brain Sci* 11
52. Bjorkhem I, Meaney S (2004) Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:806-815
53. Blasko I, Defrancesco M, Oberacher H, Loacker L, Kemmler G, Marksteiner J, Humpel C (2021) Plasma phosphatidylcholines and vitamin B12/folate levels are possible prognostic biomarkers for progression of Alzheimer's disease. *Exp Gerontol* 147:111264
54. Bolos M, Perea JR, Avila J (2017) Alzheimer's disease as an inflammatory disease. *Biomol Concepts* 8:37-43
55. Bonilla C, Ness AR, Wills AK, Lawlor DA, Lewis SJ, Davey Smith G (2014) Skin pigmentation, sun exposure and vitamin D levels in children of the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. *BMC Public Health* 14:597
56. Bozic M, Guzman C, Benet M, Sanchez-Campos S, Garcia-Monzon C, Gari E, . . . Jover R (2016) Hepatocyte vitamin D receptor regulates lipid metabolism and mediates experimental diet-induced steatosis. *J Hepatol* 65:748-757
57. Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82:239-259
58. Braak H, Braak E, Bohl J (1993) Staging of Alzheimer-related cortical destruction. *Eur Neurol* 33:403-408
59. Braak H, de Vos RA, Jansen EN, Bratzke H, Braak E (1998) Neuropathological hallmarks of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Prog Brain Res* 117:267-285
60. Braverman NE, Moser AB (2012) Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1822:1442-1452
61. Breckenridge WC, Morgan IG, Zanetta JP, Vincendon G (1973) Adult rat brain synaptic vesicles. II. Lipid composition. *Biochim Biophys Acta* 320:681-686
62. Breijyeh Z, Karaman R (2020) Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules* 25
63. Briones TL, Darwish H (2012) Vitamin D mitigates age-related cognitive decline through the modulation of pro-inflammatory state and decrease in amyloid burden. *J Neuroinflammation* 9:244
64. Broniec A, Klosinski R, Pawlak A, Wrona-Krol M, Thompson D, Sarna T (2011) Interactions of plasmalogens and their diacyl analogs with singlet oxygen in selected model systems. *Free Radic Biol Med* 50:892-898
65. Brookmeyer R, Corrada MM, Curriero FC, Kawas C (2002) Survival following a diagnosis of Alzheimer disease. *Arch Neurol* 59:1764-1767
66. Brown AJ, Ritter CR, Finch JL, Morrissey J, Martin KJ, Murayama E, . . . Slatopolsky E (1989) The noncalcemic analogue of vitamin D, 22-oxacalcitriol, suppresses parathyroid hormone synthesis and secretion. *J Clin Invest* 84:728-732
67. Brown AJ, Finch J, Grieff M, Ritter C, Kubodera N, Nishii Y, Slatopolsky E (1993) The mechanism for the disparate actions of calcitriol and 22-oxacalcitriol in the intestine. *Endocrinology* 133:1158-1164

68. Brown AJ, Finch J, Takahashi F, Ritter CS, Slatopolsky E (1997) Distinct mechanisms for the selective actions of two vitamin D analogues, 19-nor-1,25(OH)₂D₂ and 22-oxa-1,15(OH)₂D₃, on the parathyroid glands. *J Am Soc Nephrol* 8:571A
69. Brown AJ (2001) Therapeutic uses of vitamin D analogues. *Am J Kidney Dis* 38:S3-S19
70. Brown AJ, Slatopolsky E (2008) Vitamin D analogs: therapeutic applications and mechanisms for selectivity. *Mol Aspects Med* 29:433-452
71. Brown MS, Goldstein JL (2009) Cholesterol feedback: from Schoenheimer's bottle to Scap's MELADL. *J Lipid Res* 50 Suppl:S15-27
72. Browne D, McGuinness B, Woodside JV, McKay GJ (2019) Vitamin E and Alzheimer's disease: what do we know so far? *Clin Interv Aging* 14:1303-1317
73. Brumbaugh PF, Haussler MR (1974) 1 Alpha,25-dihydroxycholecalciferol receptors in intestine. I. Association of 1 alpha,25-dihydroxycholecalciferol with intestinal mucosa chromatin. *J Biol Chem* 249:1251-1257
74. Buell JS, Dawson-Hughes B, Scott TM, Weiner DE, Dallal GE, Qui WQ, . . . Tucker KL (2010) 25-Hydroxyvitamin D, dementia, and cerebrovascular pathology in elders receiving home services. *Neurology* 74:18-26
75. Bulloj A, Leal MC, Xu H, Castano EM, Morelli L (2010) Insulin-degrading enzyme sorting in exosomes: a secretory pathway for a key brain amyloid-beta degrading protease. *J Alzheimers Dis* 19:79-95
76. Bundesgesundheitsministerium (2020) National Dementia Strategy - short version.
77. Burg VK, Grimm HS, Rothhaar TL, Grosgen S, Hundsdorfer B, Hauptenthal VJ, . . . Grimm MO (2013) Plant sterols the better cholesterol in Alzheimer's disease? A mechanistical study. *J Neurosci* 33:16072-16087
78. Burns DK, Alexander RC, Welsh-Bohmer KA, Culp M, Chiang C, O'Neil J, . . . investigators Ts (2021) Safety and efficacy of pioglitazone for the delay of cognitive impairment in people at risk of Alzheimer's disease (TOMMORROW): a prognostic biomarker study and a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol* 20:537-547
79. Buszewski B, Walczak J, Zuvela P, Liu JJ (2017) Non-target analysis of phospholipid and sphingolipid species in egg yolk using liquid chromatography/triple quadrupole tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1487:179-186
80. Butler JM, Begg EJ (2008) Free drug metabolic clearance in elderly people. *Clin Pharmacokinet* 47:297-321
81. Butterfield DA, Halliwell B (2019) Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci* 20:148-160
82. Buxbaum JD, Liu KN, Luo Y, Slack JL, Stocking KL, Peschon JJ, . . . Black RA (1998) Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem* 273:27765-27767
83. Cacabelos R, Alvarez XA, Fernandez-Novoa L, Franco A, Mangues R, Pellicer A, Nishimura T (1994) Brain interleukin-1 beta in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 16:141-151
84. Cacabelos R (2018) Have there been improvements in Alzheimer's disease drug discovery over the past 5 years? *Expert Opin Drug Discov* 13:523-538
85. Cao X, Sudhof TC (2001) A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* 293:115-120
86. Cao X, Sudhof TC (2004) Dissection of amyloid-beta precursor protein-dependent transcriptional transactivation. *J Biol Chem* 279:24601-24611
87. Carretero G, Ribera M, Belinchon I, Carrascosa JM, Puig L, Ferrandiz C, . . . Psoriasis Group of the A (2013) Guidelines for the use of acitretin in psoriasis. *Psoriasis Group of the Spanish Academy of Dermatology and Venereology. Actas Dermosifiliogr* 104:598-616
88. Casali BT, Corona AW, Mariani MM, Karlo JC, Ghosal K, Landreth GE (2015) Omega-3 Fatty Acids Augment the Actions of Nuclear Receptor Agonists in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Neurosci* 35:9173-9181
89. Case LD, Kimmick G, Paskett ED, Lohman K, Tucker R (2002) Interpreting measures of treatment effect in cancer clinical trials. *Oncologist* 7:181-187
90. Cashman KD, Dowling KG, Skrabakova Z, Gonzalez-Gross M, Valtuena J, De Henauw S, . . . Kiely M (2016) Vitamin D deficiency in Europe: pandemic? *Am J Clin Nutr* 103:1033-1044
91. Catania M, Giaccone G, Salmona M, Tagliavini F, Di Fede G (2019) Dreaming of a New World Where Alzheimer's Is a Treatable Disorder. *Front Aging Neurosci* 11:317

92. Ceccom J, Loukh N, Lauwers-Cances V, Touriol C, Nicaise Y, Gentil C, . . . Delisle MB (2014) Reduced sphingosine kinase-1 and enhanced sphingosine 1-phosphate lyase expression demonstrate deregulated sphingosine 1-phosphate signaling in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun* 2:12
93. Ceglia I, Reitz C, Gresack J, Ahn JH, Bustos V, Bleck M, . . . Kim Y (2015) APP intracellular domain-WAVE1 pathway reduces amyloid-beta production. *Nat Med* 21:1054-1059
94. Cha HJ, Shen J, Kang J (2022) Regulation of gene expression by the APP family in the adult cerebral cortex. *Sci Rep* 12:66
95. Chai B, Gao F, Wu R, Dong T, Gu C, Lin Q, Zhang Y (2019) Vitamin D deficiency as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease: an updated meta-analysis. *BMC Neurol* 19:284
96. Chakhtoura MT, Nakhoul N, Akl EA, Mantzoros CS, El Hajj Fuleihan GA (2016) Guidelines on vitamin D replacement in bariatric surgery: Identification and systematic appraisal. *Metabolism* 65:586-597
97. Chakraborty S (2017) Multi-potent Natural Scaffolds Targeting Amyloid Cascade: In Search of Alzheimer's Disease Therapeutics. *Curr Top Med Chem* 17:3336-3348
98. Chalimoniuk M, Stolecka A, Cakala M, Hauptmann S, Schulz K, Lipka U, . . . Strosznajder JB (2007) Amyloid beta enhances cytosolic phospholipase A2 level and arachidonic acid release via nitric oxide in APP-transfected PC12 cells. *Acta Biochim Pol* 54:611-623
99. Challoumas D (2014) Vitamin D supplementation and lipid profile: what does the best available evidence show? *Atherosclerosis* 235:130-139
100. Chan RB, Oliveira TG, Cortes EP, Honig LS, Duff KE, Small SA, . . . Di Paolo G (2012) Comparative lipidomic analysis of mouse and human brain with Alzheimer disease. *J Biol Chem* 287:2678-2688
101. Chatterjee I, Lu R, Zhang Y, Zhang J, Dai Y, Xia Y, Sun J (2020a) Vitamin D receptor promotes healthy microbial metabolites and microbiome. *Sci Rep* 10:7340
102. Chatterjee P, Fernando M, Fernando B, Dias CB, Shah T, Silva R, . . . Martins RN (2020b) Potential of coconut oil and medium chain triglycerides in the prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev* 186:111209
103. Chaudhary A, Gour JK, Rizvi SI (2022) Capsaicin has potent anti-oxidative effects in vivo through a mechanism which is non-receptor mediated. *Arch Physiol Biochem* 128:141-147
104. Chaudhuri A (2013) Multiple sclerosis is primarily a neurodegenerative disease. *J Neural Transm (Vienna)* 120:1463-1466
105. Chauss D, Freiwald T, McGregor R, Yan B, Wang L, Nova-Lamperti E, . . . Afzali B (2022) Autocrine vitamin D signaling switches off pro-inflammatory programs of TH1 cells. *Nat Immunol* 23:62-74
106. Chauvet N, Apert C, Dumoulin A, Epelbaum J, Alonso G (1997) Mab22C11 antibody to amyloid precursor protein recognizes a protein associated with specific astroglial cells of the rat central nervous system characterized by their capacity to support axonal outgrowth. *J Comp Neurol* 377:550-564
107. Chen GF, Xu TH, Yan Y, Zhou YR, Jiang Y, Melcher K, Xu HE (2017) Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacol Sin* 38:1205-1235
108. Chen L, Zhao ZW, Zeng PH, Zhou YJ, Yin WJ (2022) Molecular mechanisms for ABCA1-mediated cholesterol efflux. *Cell Cycle* 21:1121-1139
109. Cheng H, Vetrivel KS, Gong P, Meckler X, Parent A, Thinakaran G (2007) Mechanisms of disease: new therapeutic strategies for Alzheimer's disease--targeting APP processing in lipid rafts. *Nat Clin Pract Neurol* 3:374-382
110. Chesneau V, Vekrellis K, Rosner MR, Selkoe DJ (2000) Purified recombinant insulin-degrading enzyme degrades amyloid beta-protein but does not promote its oligomerization. *Biochem J* 351 Pt 2:509-516
111. Chew H, Solomon VA, Fonteh AN (2020) Involvement of Lipids in Alzheimer's Disease Pathology and Potential Therapies. *Front Physiol* 11:598
112. Chidambaram H, Chinnathambi S (2020) G-Protein Coupled Receptors and Tau-different Roles in Alzheimer's Disease. *Neuroscience* 438:198-214
113. Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, . . . Selkoe DJ (1992) Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* 360:672-674

114. Clements CM, McNally RS, Conti BJ, Mak TW, Ting JP (2006) DJ-1, a cancer- and Parkinson's disease-associated protein, stabilizes the antioxidant transcriptional master regulator Nrf2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:15091-15096
115. Cline EN, Bicca MA, Viola KL, Klein WL (2018) The Amyloid-beta Oligomer Hypothesis: Beginning of the Third Decade. *J Alzheimers Dis* 64:S567-S610
116. Coburn JW, Maung HM, Elangovan L, Germain MJ, Lindberg JS, Sprague SM, . . . Bishop CW (2004) Doxercalciferol safely suppresses PTH levels in patients with secondary hyperparathyroidism associated with chronic kidney disease stages 3 and 4. *Am J Kidney Dis* 43:877-890
117. Cole GM, Frautschy SA (2010) DHA may prevent age-related dementia. *J Nutr* 140:869-874
118. Combs B, Mueller RL, Morfini G, Brady ST, Kanaan NM (2019) Tau and Axonal Transport Misregulation in Tauopathies. *Adv Exp Med Biol* 1184:81-95
119. Conquer JA, Tierney MC, Zecevic J, Bettger WJ, Fisher RH (2000) Fatty acid analysis of blood plasma of patients with Alzheimer's disease, other types of dementia, and cognitive impairment. *Lipids* 35:1305-1312
120. Consiglio M, Viano M, Casarin S, Castagnoli C, Pescarmona G, Silvagno F (2015) Mitochondrial and lipogenic effects of vitamin D on differentiating and proliferating human keratinocytes. *Exp Dermatol* 24:748-753
121. Cook DG, Leverenz JB, McMillan PJ, Kulstad JJ, Ericksen S, Roth RA, . . . Craft S (2003) Reduced hippocampal insulin-degrading enzyme in late-onset Alzheimer's disease is associated with the apolipoprotein E-epsilon4 allele. *Am J Pathol* 162:313-319
122. Copenhaver PF, Kogel D (2017) Role of APP Interactions with Heterotrimeric G Proteins: Physiological Functions and Pathological Consequences. *Front Mol Neurosci* 10:3
123. Cordell GA, Araujo OE (1993) Capsaicin: identification, nomenclature, and pharmacotherapy. *Ann Pharmacother* 27:330-336
124. Costantini C, Ko MH, Jonas MC, Puglielli L (2007) A reversible form of lysine acetylation in the ER and Golgi lumen controls the molecular stabilization of BACE1. *Biochem J* 407:383-395
125. Couttas TA, Kain N, Daniels B, Lim XY, Shepherd C, Kril J, . . . Don AS (2014) Loss of the neuroprotective factor Sphingosine 1-phosphate early in Alzheimer's disease pathogenesis. *Acta Neuropathol Commun* 2:9
126. Coyne D, Acharya M, Qiu P, Abboud H, Battle D, Rosansky S, . . . Sprague SM (2006) Paricalcitol capsule for the treatment of secondary hyperparathyroidism in stages 3 and 4 CKD. *Am J Kidney Dis* 47:263-276
127. Creemers JW, Ines Dominguez D, Plets E, Serneels L, Taylor NA, Multhaup G, . . . De Strooper B (2001) Processing of beta-secretase by furin and other members of the proprotein convertase family. *J Biol Chem* 276:4211-4217
128. Crivelli SM, Giovagnoni C, Visseren L, Scheithauer AL, de Wit N, den Hoedt S, . . . Martinez-Martinez P (2020) Sphingolipids in Alzheimer's disease, how can we target them? *Adv Drug Deliv Rev* 159:214-231
129. Crowley LC, Scott AP, Marfell BJ, Boughaba JA, Chojnowski G, Waterhouse NJ (2016) Measuring Cell Death by Propidium Iodide Uptake and Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc* 2016
130. Cui X, Pelekanos M, Liu PY, Burne TH, McGrath JJ, Eyles DW (2013) The vitamin D receptor in dopamine neurons; its presence in human substantia nigra and its ontogenesis in rat midbrain. *Neuroscience* 236:77-87
131. Cutler RG, Kelly J, Storie K, Pedersen WA, Tammara A, Hatanpaa K, . . . Mattson MP (2004) Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:2070-2075
132. Dai Y, Zhang J, Xiang J, Li Y, Wu D, Xu J (2019) Calcitriol inhibits ROS-NLRP3-IL-1beta signaling axis via activation of Nrf2-antioxidant signaling in hyperosmotic stress stimulated human corneal epithelial cells. *Redox Biol* 21:101093
133. de la Monte SM, Wands JR (2006) Molecular indices of oxidative stress and mitochondrial dysfunction occur early and often progress with severity of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 9:167-181
134. de la Rubia Orti JE, Garcia-Pardo MP, Drehmer E, Sancho Cantus D, Julian Rochina M, Aguilar MA, Hu Yang I (2018) Improvement of Main Cognitive Functions in Patients with Alzheimer's Disease after Treatment with Coconut Oil Enriched Mediterranean Diet: A Pilot Study. *J Alzheimers Dis* 65:577-587

135. De Strooper B, Saftig P, Craessaerts K, Vanderstichele H, Guhde G, Annaert W, . . . Van Leuven F (1998) Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 391:387-390
136. De Strooper B (2003) Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron* 38:9-12
137. De Strooper B (2010) Proteases and proteolysis in Alzheimer disease: a multifactorial view on the disease process. *Physiol Rev* 90:465-494
138. de Vrij FM, Fischer DF, van Leeuwen FW, Hol EM (2004) Protein quality control in Alzheimer's disease by the ubiquitin proteasome system. *Prog Neurobiol* 74:249-270
139. DeBose-Boyd RA, Ye J (2018) SREBPs in Lipid Metabolism, Insulin Signaling, and Beyond. *Trends Biochem Sci* 43:358-368
140. DeMattos RB, Bales KR, Cummins DJ, Dodart JC, Paul SM, Holtzman DM (2001) Peripheral anti-A beta antibody alters CNS and plasma A beta clearance and decreases brain A beta burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:8850-8855
141. Demattos RB, Lu J, Tang Y, Racke MM, DeLong CA, Tzaferis JA, . . . Hutton ML (2012) A plaque-specific antibody clears existing beta-amyloid plaques in Alzheimer's disease mice. *Neuron* 76:908-920
142. Desale SE, Chinnathambi S (2020) Role of dietary fatty acids in microglial polarization in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* 17:93
143. Desjardins P, Conklin D (2010) NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *J Vis Exp*
144. Desvergne B, Wahli W (1999) Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 20:649-688
145. DeTure MA, Dickson DW (2019) The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 14:32
146. Dhillon S (2021) Aducanumab: First Approval. *Drugs* 81:1437-1443
147. Diaz M, Mesa-Herrera F, Marin R (2021) DHA and Its Elaborated Modulation of Antioxidant Defenses of the Brain: Implications in Aging and AD Neurodegeneration. *Antioxidants (Basel)* 10
148. Dibaba DT (2019) Effect of vitamin D supplementation on serum lipid profiles: a systematic review and meta-analysis. *Nutr Rev* 77:890-902
149. Dickens AP, Lang IA, Langa KM, Kos K, Llewellyn DJ (2011) Vitamin D, cognitive dysfunction and dementia in older adults. *CNS Drugs* 25:629-639
150. Didriksen A, Burild A, Jakobsen J, Fuskevåg OM, Jorde R (2015) Vitamin D₃ increases in abdominal subcutaneous fat tissue after supplementation with vitamin D₃. *Eur J Endocrinol* 172:235-241
151. Dilworth FJ, Calverley MJ, Makin HL, Jones G (1994) Increased biological activity of 20-epi-1,25-dihydroxyvitamin D₃ is due to reduced catabolism and altered protein binding. *Biochem Pharmacol* 47:987-993
152. Dinarello CA (2011) Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood* 117:3720-3732
153. Dorninger F, Moser AB, Kou J, Wiesinger C, Forss-Petter S, Gleiss A, . . . Berger J (2018) Alterations in the Plasma Levels of Specific Choline Phospholipids in Alzheimer's Disease Mimic Accelerated Aging. *J Alzheimers Dis* 62:841-854
154. Dos Santos Guilherme M, Stoye NM, Rose-John S, Garbers C, Fellgiebel A, Endres K (2019) The Synthetic Retinoid Acitretin Increases IL-6 in the Central Nervous System of Alzheimer Disease Model Mice and Human Patients. *Front Aging Neurosci* 11:182
155. Dries DR, Yu G (2008) Assembly, maturation, and trafficking of the gamma-secretase complex in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 5:132-146
156. Drose S, Brandt U (2012) Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Adv Exp Med Biol* 748:145-169
157. Du J, Zhang L, Liu S, Zhang C, Huang X, Li J, . . . Wang Z (2009) PPAR γ transcriptionally regulates the expression of insulin-degrading enzyme in primary neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 383:485-490
158. Dugger BN, Dickson DW (2017) Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 9
159. Duhm J, Engelmann B, Schonhauer UM, Streich S (1993) Accelerated maximal velocity of the red blood cell Na⁺/K⁺ pump in hyperlipidemia is related to increase in 1-palmitoyl,2-arachidonoyl-plasmalogen phosphatidylethanolamine. *Biochim Biophys Acta* 1149:185-188

160. Dursun E, Gezen-Ak D, Yilmazer S (2013) A new mechanism for amyloid-beta induction of iNOS: vitamin D-VDR pathway disruption. *J Alzheimers Dis* 36:459-474
161. Dursun E, Gezen-Ak D (2017) Vitamin D receptor is present on the neuronal plasma membrane and is co-localized with amyloid precursor protein, ADAM10 or Nicastrin. *PLoS One* 12:e0188605
162. Dyrks T, Weidemann A, Multhaup G, Salbaum JM, Lemaire HG, Kang J, . . . Beyreuther K (1988) Identification, transmembrane orientation and biogenesis of the amyloid A4 precursor of Alzheimer's disease. *EMBO J* 7:949-957
163. Dzik KP, Kaczor JJ (2019) Mechanisms of vitamin D on skeletal muscle function: oxidative stress, energy metabolism and anabolic state. *Eur J Appl Physiol* 119:825-839
164. Ebanks B, Chakrabarti L (2022) Mitochondrial ATP Synthase is a Target of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Front Mol Biosci* 9:854321
165. Eckman CB, Mehta ND, Crook R, Perez-tur J, Prihar G, Pfeiffer E, . . . Hardy J (1997) A new pathogenic mutation in the APP gene (I716V) increases the relative proportion of A beta 42(43). *Hum Mol Genet* 6:2087-2089
166. Edbauer D, Willem M, Lammich S, Steiner H, Haass C (2002) Insulin-degrading enzyme rapidly removes the beta-amyloid precursor protein intracellular domain (AICD). *J Biol Chem* 277:13389-13393
167. Eehalt R, Keller P, Haass C, Thiele C, Simons K (2003) Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol* 160:113-123
168. Eisenmenger M, Pöttsch O, Sommer B (2006) Bevölkerung Deutschlands bis 2050 - 11. koordinierte Bevölkerungsvorausberechnung. Statistisches Bundesamt - Pressestelle, Wiesbaden
169. El Gaamouch F, Jing P, Xia J, Cai D (2016) Alzheimer's Disease Risk Genes and Lipid Regulators. *J Alzheimers Dis* 53:15-29
170. Endres K, Fahrenholz F, Lotz J, Hiemke C, Teipel S, Lieb K, . . . Fellgiebel A (2014) Increased CSF APPs-alpha levels in patients with Alzheimer disease treated with acitretin. *Neurology* 83:1930-1935
171. Endres K (2019) Retinoic Acid and the Gut Microbiota in Alzheimer's Disease: Fighting Back-to-Back? *Curr Alzheimer Res* 16:405-417
172. Erickson MA, Banks WA (2019) Age-Associated Changes in the Immune System and Blood(-)Brain Barrier Functions. *Int J Mol Sci* 20
173. Ermolieff J, Loy JA, Koelsch G, Tang J (2000) Proteolytic activation of recombinant pro-memapsin 2 (pro-beta-secretase) studied with new fluorogenic substrates. *Biochemistry* 39:12450-12456
174. Escamilla-Ayala A, Wouters R, Sannerud R, Annaert W (2020) Contribution of the Presenilins in the cell biology, structure and function of gamma-secretase. *Semin Cell Dev Biol* 105:12-26
175. Etgen T, Sander D, Bickel H, Sander K, Forstl H (2012) Vitamin D deficiency, cognitive impairment and dementia: a systematic review and meta-analysis. *Dement Geriatr Cogn Disord* 33:297-305
176. Eyles DW, Smith S, Kinobe R, Hewison M, McGrath JJ (2005) Distribution of the vitamin D receptor and 1 alpha-hydroxylase in human brain. *J Chem Neuroanat* 29:21-30
177. Fabelo N, Martin V, Marin R, Moreno D, Ferrer I, Diaz M (2014) Altered lipid composition in cortical lipid rafts occurs at early stages of sporadic Alzheimer's disease and facilitates APP/BACE1 interactions. *Neurobiol Aging* 35:1801-1812
178. Fan YG, Guo T, Han XR, Liu JL, Cai YT, Xue H, . . . Guo C (2019) Paricalcitol accelerates BACE1 lysosomal degradation and inhibits calpain-1 dependent neuronal loss in APP/PS1 transgenic mice. *EBioMedicine* 45:393-407
179. Fan YG, Pang ZQ, Wu TY, Zhang YH, Xuan WQ, Wang Z, . . . Wang ZY (2020) Vitamin D deficiency exacerbates Alzheimer-like pathologies by reducing antioxidant capacity. *Free Radic Biol Med* 161:139-149
180. Farmer BC, Walsh AE, Kluemper JC, Johnson LA (2020) Lipid Droplets in Neurodegenerative Disorders. *Front Neurosci* 14:742
181. Farmery MR, Tjernberg LO, Pursglove SE, Bergman A, Winblad B, Naslund J (2003) Partial purification and characterization of gamma-secretase from post-mortem human brain. *J Biol Chem* 278:24277-24284
182. Farooqui AA, Rapoport SI, Horrocks LA (1997) Membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease: deficiency of ethanolamine plasmalogens. *Neurochem Res* 22:523-527
183. Farris W, Mansourian S, Chang Y, Lindsley L, Eckman EA, Frosch MP, . . . Guenette S (2003) Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4162-4167

184. Fassbender K, Simons M, Bergmann C, Stroick M, Lutjohann D, Keller P, . . . Hartmann T (2001) Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta -amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5856-5861
185. Fawaz L, Mrad MF, Kazan JM, Sayegh S, Akika R, Khoury SJ (2016) Comparative effect of 25(OH)D3 and 1,25(OH)2D3 on Th17 cell differentiation. *Clin Immunol* 166-167:59-71
186. Feart C, Helmer C, Merle B, Herrmann FR, Annweiler C, Dartigues JF, . . . Samieri C (2017) Associations of lower vitamin D concentrations with cognitive decline and long-term risk of dementia and Alzheimer's disease in older adults. *Alzheimers Dement* 13:1207-1216
187. Feringa FM, van der Kant R (2021) Cholesterol and Alzheimer's Disease; From Risk Genes to Pathological Effects. *Front Aging Neurosci* 13:690372
188. Fernandez-Fernandez S, Bobo-Jimenez V, Requejo-Aguilar R, Gonzalez-Fernandez S, Resch M, Carabias-Carrasco M, . . . Bolanos JP (2018) Hippocampal neurons require a large pool of glutathione to sustain dendrite integrity and cognitive function. *Redox Biol* 19:52-61
189. Filippov V, Song MA, Zhang K, Vinters HV, Tung S, Kirsch WM, . . . Duerksen-Hughes PJ (2012) Increased ceramide in brains with Alzheimer's and other neurodegenerative diseases. *J Alzheimers Dis* 29:537-547
190. Fonteh AN, Cipolla M, Chiang J, Arakaki X, Harrington MG (2014) Human cerebrospinal fluid fatty acid levels differ between supernatant fluid and brain-derived nanoparticle fractions, and are altered in Alzheimer's disease. *PLoS One* 9:e100519
191. Fonteh AN, Cipolla M, Chiang AJ, Edminster SP, Arakaki X, Harrington MG (2020) Polyunsaturated Fatty Acid Composition of Cerebrospinal Fluid Fractions Shows Their Contribution to Cognitive Resilience of a Pre-symptomatic Alzheimer's Disease Cohort. *Front Physiol* 11:83
192. Ford DA, Hale CC (1996) Plasmalogen and anionic phospholipid dependence of the cardiac sarcolemmal sodium-calcium exchanger. *FEBS Lett* 394:99-102
193. Franco R, Martinez-Pinilla E, Navarro G, Zamarbide M (2017) Potential of GPCRs to modulate MAPK and mTOR pathways in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 149-150:21-38
194. Freese C, Reinhardt S, Hefner G, Unger RE, Kirkpatrick CJ, Endres K (2014) A novel blood-brain barrier co-culture system for drug targeting of Alzheimer's disease: establishment by using acitretin as a model drug. *PLoS One* 9:e91003
195. Freshney RI (2011) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*.
196. Freund-Levi Y, Eriksdotter-Jonhagen M, Cederholm T, Basun H, Faxen-Irving G, Garlind A, . . . Palmblad J (2006) Omega-3 fatty acid treatment in 174 patients with mild to moderate Alzheimer disease: OmegaAD study: a randomized double-blind trial. *Arch Neurol* 63:1402-1408
197. Fujii R, Yamada H, Munetsuna E, Yamazaki M, Ando Y, Mizuno G, . . . Suzuki K (2019) Associations between dietary vitamin intake, ABCA1 gene promoter DNA methylation, and lipid profiles in a Japanese population. *Am J Clin Nutr* 110:1213-1219
198. Gadhve K, Bolshette N, Ahire A, Pardeshi R, Thakur K, Trandafir C, . . . Balea M (2016) The ubiquitin proteasomal system: a potential target for the management of Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med* 20:1392-1407
199. Gall Z, Szekeley O (2021) Role of Vitamin D in Cognitive Dysfunction: New Molecular Concepts and Discrepancies between Animal and Human Findings. *Nutrients* 13
200. Ganguli M, Dodge HH, Shen C, Pandav RS, DeKosky ST (2005) Alzheimer disease and mortality: a 15-year epidemiological study. *Arch Neurol* 62:779-784
201. Garcia-Vinuales S, Sciacca MFM, Lanza V, Santoro AM, Grasso G, Tundo GR, . . . Milardi D (2021) The interplay between lipid and Abeta amyloid homeostasis in Alzheimer's Disease: risk factors and therapeutic opportunities. *Chem Phys Lipids* 236:105072
202. Gauthier S, Rosa-Neto P, Morais J, Webster C (2021) *World Alzheimer Report 2021: Journey through the diagnosis of dementia*. London, England: Alzheimer's Disease International
203. Geng T, Lu Q, Wan Z, Guo J, Liu L, Pan A, Liu G (2022) Association of serum 25-hydroxyvitamin D concentrations with risk of dementia among individuals with type 2 diabetes: A cohort study in the UK Biobank. *PLoS Med* 19:e1003906
204. Gezen-Ak D, Atasoy IL, Candas E, Alaylioglu M, Yilmazer S, Dursun E (2017) Vitamin D Receptor Regulates Amyloid Beta 1-42 Production with Protein Disulfide Isomerase A3. *ACS Chem Neurosci* 8:2335-2346
205. Ghasemi A, Zahediasl S (2012) Normality tests for statistical analysis: a guide for non-statisticians. *Int J Endocrinol Metab* 10:486-489

206. Gibson UE, Heid CA, Williams PM (1996) A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 6:995-1001
207. Ginsberg L, Rafique S, Xuereb JH, Rapoport SI, Gershfeld NL (1995) Disease and anatomic specificity of ethanolamine plasmalogen deficiency in Alzheimer's disease brain. *Brain Res* 698:223-226
208. Giri M, Zhang M, Lu Y (2016) Genes associated with Alzheimer's disease: an overview and current status. *Clin Interv Aging* 11:665-681
209. Glaser PE, Gross RW (1994) Plasménylethanolamine facilitates rapid membrane fusion: a stopped-flow kinetic investigation correlating the propensity of a major plasma membrane constituent to adopt an HII phase with its ability to promote membrane fusion. *Biochemistry* 33:5805-5812
210. Gloth FM, 3rd, Gundberg CM, Hollis BW, Haddad JG, Jr., Tobin JD (1995) Vitamin D deficiency in homebound elderly persons. *JAMA* 274:1683-1686
211. Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, . . . et al. (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349:704-706
212. Goedert M, Spillantini MG (2006) A century of Alzheimer's disease. *Science* 314:777-781
213. Gomez-Ramos P, Asuncion Moran M (2007) Ultrastructural localization of intraneuronal A β -peptide in Alzheimer disease brains. *J Alzheimers Dis* 11:53-59
214. Gonzalez-Casimiro CM, Merino B, Casanueva-Alvarez E, Postigo-Casado T, Camara-Torres P, Fernandez-Diaz CM, . . . Perdomo G (2021) Modulation of Insulin Sensitivity by Insulin-Degrading Enzyme. *Biomedicines* 9
215. Gonzalez-Dominguez R, Garcia-Barrera T, Vitorica J, Gomez-Ariza JL (2014) Region-specific metabolic alterations in the brain of the APP/PS1 transgenic mice of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1842:2395-2402
216. Goodger ZV, Rajendran L, Trutzel A, Kohli BM, Nitsch RM, Konietzko U (2009) Nuclear signaling by the APP intracellular domain occurs predominantly through the amyloidogenic processing pathway. *J Cell Sci* 122:3703-3714
217. Gorr SU, Moore YR (1999) Sorting of a constitutive secretory protein to the regulated secretory pathway of exocrine cells. *Biochem Biophys Res Commun* 257:545-548
218. Grant WB, Al Anouti F, Boucher BJ, Dursun E, Gezen-Ak D, Jude EB, . . . Pludowski P (2022) A Narrative Review of the Evidence for Variations in Serum 25-Hydroxyvitamin D Concentration Thresholds for Optimal Health. *Nutrients* 14
219. Grimm MO, Grimm HS, Patzold AJ, Zinser EG, Halonen R, Duering M, . . . Hartmann T (2005) Regulation of cholesterol and sphingomyelin metabolism by amyloid-beta and presenilin. *Nat Cell Biol* 7:1118-1123
220. Grimm MO, Grimm HS, Tomic I, Beyreuther K, Hartmann T, Bergmann C (2008) Independent inhibition of Alzheimer disease beta- and gamma-secretase cleavage by lowered cholesterol levels. *J Biol Chem* 283:11302-11311
221. Grimm MO, Grosgen S, Riemenschneider M, Tanila H, Grimm HS, Hartmann T (2011a) From brain to food: analysis of phosphatidylcholins, lyso-phosphatidylcholins and phosphatidylcholin-plasmalogens derivatives in Alzheimer's disease human post mortem brains and mice model via mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1218:7713-7722
222. Grimm MO, Grosgen S, Rothhaar TL, Burg VK, Hundsdorfer B, Hauptenthal VJ, . . . Hartmann T (2011b) Intracellular APP Domain Regulates Serine-Palmitoyl-CoA Transferase Expression and Is Affected in Alzheimer's Disease. *Int J Alzheimers Dis* 2011:695413
223. Grimm MO, Kuchenbecker J, Grosgen S, Burg VK, Hundsdorfer B, Rothhaar TL, . . . Hartmann T (2011c) Docosahexaenoic acid reduces amyloid beta production via multiple pleiotropic mechanisms. *J Biol Chem* 286:14028-14039
224. Grimm MO, Kuchenbecker J, Rothhaar TL, Grosgen S, Hundsdorfer B, Burg VK, . . . Hartmann T (2011d) Plasmalogen synthesis is regulated via alkyl-dihydroxyacetonephosphate-synthase by amyloid precursor protein processing and is affected in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 116:916-925
225. Grimm MO, Zinser EG, Grosgen S, Hundsdorfer B, Rothhaar TL, Burg VK, . . . Hartmann T (2012) Amyloid precursor protein (APP) mediated regulation of ganglioside homeostasis linking Alzheimer's disease pathology with ganglioside metabolism. *PLoS One* 7:e34095
226. Grimm MO, Hauptenthal VJ, Rothhaar TL, Zimmer VC, Grosgen S, Hundsdorfer B, . . . Hartmann T (2013a) Effect of Different Phospholipids on alpha-Secretase Activity in the Non-Amyloidogenic Pathway of Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* 14:5879-5898

227. Grimm MO, Mett J, Stahlmann CP, Hauptenthal VJ, Zimmer VC, Hartmann T (2013b) Neprilysin and Abeta Clearance: Impact of the APP Intracellular Domain in NEP Regulation and Implications in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci* 5:98
228. Grimm MO, Zimmer VC, Lehmann J, Grimm HS, Hartmann T (2013c) The impact of cholesterol, DHA, and sphingolipids on Alzheimer's disease. *Biomed Res Int* 2013:814390
229. Grimm MO, Lehmann J, Mett J, Zimmer VC, Grosgen S, Stahlmann CP, . . . Hartmann T (2014) Impact of Vitamin D on amyloid precursor protein processing and amyloid-beta peptide degradation in Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis* 13:75-81
230. Grimm MO, Mett J, Stahlmann CP, Grosgen S, Hauptenthal VJ, Blumel T, . . . Hartmann T (2015a) APP intracellular domain derived from amyloidogenic beta- and gamma-secretase cleavage regulates neprilysin expression. *Front Aging Neurosci* 7:77
231. Grimm MO, Stahlmann CP, Mett J, Hauptenthal VJ, Zimmer VC, Lehmann J, . . . Hartmann T (2015b) Vitamin E: Curse or Benefit in Alzheimer's Disease? A Systematic Investigation of the Impact of alpha-, gamma- and delta-Tocopherol on Ass Generation and Degradation in Neuroblastoma Cells. *J Nutr Health Aging* 19:646-656
232. Grimm MO, Hauptenthal VJ, Mett J, Stahlmann CP, Blumel T, Mylonas NT, . . . Hartmann T (2016a) Oxidized Docosaehaenoic Acid Species and Lipid Peroxidation Products Increase Amyloidogenic Amyloid Precursor Protein Processing. *Neurodegener Dis* 16:44-54
233. Grimm MO, Mett J, Hartmann T (2016b) The Impact of Vitamin E and Other Fat-Soluble Vitamins on Alzheimer s Disease. *Int J Mol Sci* 17
234. Grimm MO, Mett J, Stahlmann CP, Hauptenthal VJ, Blumel T, Stotzel H, . . . Hartmann T (2016c) Eicosapentaenoic acid and docosaehaenoic acid increase the degradation of amyloid-beta by affecting insulin-degrading enzyme. *Biochem Cell Biol* 94:534-542
235. Grimm MO, Regner L, Mett J, Stahlmann CP, Schorr P, Nelke C, . . . Hartmann T (2016d) Tocotrienol Affects Oxidative Stress, Cholesterol Homeostasis and the Amyloidogenic Pathway in Neuroblastoma Cells: Consequences for Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* 17
236. Grimm MO, Mett J, Grimm HS, Hartmann T (2017a) APP Function and Lipids: A Bidirectional Link. *Front Mol Neurosci* 10:63
237. Grimm MOW, Thiel A, Lauer AA, Winkler J, Lehmann J, Regner L, . . . Hartmann T (2017b) Vitamin D and Its Analogues Decrease Amyloid-beta (Abeta) Formation and Increase Abeta-Degradation. *Int J Mol Sci* 18
238. Grimm MOW, Lauer AA, Grosgen S, Thiel A, Lehmann J, Winkler J, . . . Hartmann T (2019) Profiling of Alzheimer's disease related genes in mild to moderate vitamin D hypovitaminosis. *J Nutr Biochem* 67:123-137
239. Grimm MOW, Blumel T, Lauer AA, Janitschke D, Stahlmann C, Mett J, . . . Hartmann T (2020) The impact of capsaicinoids on APP processing in Alzheimer's disease in SH-SY5Y cells. *Sci Rep* 10:9164
240. Grösgen S (2013) Der Einfluss der intrazellulären APP-Domäne und von Lipiden auf die Alzheimer Krankheit. Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes
241. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI (1986) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:4913-4917
242. Guan Z, Wang Y, Cairns NJ, Lantos PL, Dallner G, Sindelar PJ (1999) Decrease and structural modifications of phosphatidylethanolamine plasmalogen in the brain with Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 58:740-747
243. Guo Q, Li H, Gaddam SS, Justice NJ, Robertson CS, Zheng H (2012) Amyloid precursor protein revisited: neuron-specific expression and highly stable nature of soluble derivatives. *J Biol Chem* 287:2437-2445
244. Gupta AK, Goldfarb MT, Ellis CN, Voorhees JJ (1989a) Side-effect profile of acitretin therapy in psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 20:1088-1093
245. Gupta AK, Sexton RC, Rudney H (1989b) Effect of vitamin D3 derivatives on cholesterol synthesis and HMG-CoA reductase activity in cultured cells. *J Lipid Res* 30:379-386
246. Gupta MA, Schork NJ, Gupta AK, Kirkby S, Ellis CN (1993) Suicidal ideation in psoriasis. *Int J Dermatol* 32:188-190
247. Gustafson DR, Backman K, Scarmeas N, Stern Y, Manly JJ, Mayeux R, Gu Y (2020) Dietary fatty acids and risk of Alzheimer's disease and related dementias: Observations from the Washington Heights-Hamilton Heights-Inwood Columbia Aging Project (WHICAP). *Alzheimers Dement* 16:1638-1649

248. Haass C (2004) Take five--BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *EMBO J* 23:483-488
249. Haass C, Kaether C, Thinakaran G, Sisodia S (2012) Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a006270
250. Hamel FG, Upward JL, Bennett RG (2003) In vitro inhibition of insulin-degrading enzyme by long-chain fatty acids and their coenzyme A thioesters. *Endocrinology* 144:2404-2408
251. Hampel H, Hardy J, Blennow K, Chen C, Perry G, Kim SH, . . . Vergallo A (2021a) The Amyloid-beta Pathway in Alzheimer's Disease. *Mol Psychiatry* 26:5481-5503
252. Hampel H, Vassar R, De Strooper B, Hardy J, Willem M, Singh N, . . . Vergallo A (2021b) The beta-Secretase BACE1 in Alzheimer's Disease. *Biol Psychiatry* 89:745-756
253. Han X, Holtzman DM, McKeel DW, Jr. (2001) Plasmalogen deficiency in early Alzheimer's disease subjects and in animal models: molecular characterization using electrospray ionization mass spectrometry. *J Neurochem* 77:1168-1180
254. Han X, D MH, McKeel DW, Jr., Kelley J, Morris JC (2002) Substantial sulfatide deficiency and ceramide elevation in very early Alzheimer's disease: potential role in disease pathogenesis. *J Neurochem* 82:809-818
255. Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166:557-580
256. Hansen CM, Maenpaa PH (1997) EB 1089, a novel vitamin D analog with strong antiproliferative and differentiation-inducing effects on target cells. *Biochem Pharmacol* 54:1173-1179
257. Hauber AB, Gnanasakthy A, Snyder EH, Bala MV, Richter A, Mauskopf JA (2000) Potential savings in the cost of caring for Alzheimer's disease. Treatment with rivastigmine. *Pharmacoeconomics* 17:351-360
258. Haughey NJ, Liu D, Nath A, Borchard AC, Mattson MP (2002) Disruption of neurogenesis in the subventricular zone of adult mice, and in human cortical neuronal precursor cells in culture, by amyloid beta-peptide: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med* 1:125-135
259. Hayes J, Koo J (2011) Depression and acitretin: a true association or a class labeling? *J Drugs Dermatol* 10:409-412
260. He X, Huang Y, Li B, Gong CX, Schuchman EH (2010) Deregulation of sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 31:398-408
261. Heath MS, Sahni DR, Curry ZA, Feldman SR (2018) Pharmacokinetics of tazarotene and acitretin in psoriasis. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 14:919-927
262. Heath RJ, Wood TR (2021) Why Have the Benefits of DHA Not Been Borne Out in the Treatment and Prevention of Alzheimer's Disease? A Narrative Review Focused on DHA Metabolism and Adipose Tissue. *Int J Mol Sci* 22
263. Heber S, Herms J, Gajic V, Hainfellner J, Aguzzi A, Rulicke T, . . . Muller U (2000) Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *J Neurosci* 20:7951-7963
264. Hebert LE, Weuve J, Scherr PA, Evans DA (2013) Alzheimer disease in the United States (2010-2050) estimated using the 2010 census. *Neurology* 80:1778-1783
265. Hebert SS, Serneels L, Dejaegere T, Horre K, Dabrowski M, Baert V, . . . De Strooper B (2004) Coordinated and widespread expression of gamma-secretase in vivo: evidence for size and molecular heterogeneity. *Neurobiol Dis* 17:260-272
266. Helzner EP, Scarmeas N, Cosentino S, Tang MX, Schupf N, Stern Y (2008) Survival in Alzheimer disease: a multiethnic, population-based study of incident cases. *Neurology* 71:1489-1495
267. Henderson ST, Vogel JL, Barr LJ, Garvin F, Jones JJ, Costantini LC (2009) Study of the ketogenic agent AC-1202 in mild to moderate Alzheimer's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. *Nutr Metab (Lond)* 6:31
268. Heneka MT, Carson MJ, El Khoury J, Landreth GE, Brosseron F, Feinstein DL, . . . Kummer MP (2015) Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 14:388-405
269. Herreman A, Serneels L, Annaert W, Collen D, Schoonjans L, De Strooper B (2000) Total inactivation of gamma-secretase activity in presenilin-deficient embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 2:461-462
270. Hickman SE, Allison EK, El Khoury J (2008) Microglial dysfunction and defective beta-amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. *J Neurosci* 28:8354-8360
271. Hipkiss AR (2019) Aging, Alzheimer's Disease and Dysfunctional Glycolysis; Similar Effects of Too Much and Too Little. *Aging Dis* 10:1328-1331

272. Hitomi J, Katayama T, Eguchi Y, Kudo T, Taniguchi M, Koyama Y, . . . Tohyama M (2004) Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. *J Cell Biol* 165:347-356
273. Holick MF (1996) Vitamin D and bone health. *J Nutr* 126:1159S-1164S
274. Holick MF (2004) Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *Am J Clin Nutr* 79:362-371
275. Holick MF (2007) Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 357:266-281
276. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, . . . Endocrine S (2011) Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 96:1911-1930
277. Holick MF (2015a) Vitamin D and brain health: the need for vitamin D supplementation and sensible sun exposure. *J Intern Med* 277:90-93
278. Holick MF (2015b) Vitamin D Is Not as Toxic as Was Once Thought: A Historical and an Up-to-Date Perspective. *Mayo Clin Proc* 90:561-564
279. Holick MF (2020) Sunlight, UV Radiation, Vitamin D, and Skin Cancer: How Much Sunlight Do We Need? *Adv Exp Med Biol* 1268:19-36
280. Holmes O, Paturi S, Ye W, Wolfe MS, Selkoe DJ (2012) Effects of membrane lipids on the activity and processivity of purified gamma-secretase. *Biochemistry* 51:3565-3575
281. Holsinger RM, McLean CA, Beyreuther K, Masters CL, Evin G (2002) Increased expression of the amyloid precursor beta-secretase in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 51:783-786
282. Holthoewer D, Endres K, Schuck F, Hiemke C, Schmitt U, Fahrenholz F (2012) Acitretin, an enhancer of alpha-secretase expression, crosses the blood-brain barrier and is not eliminated by P-glycoprotein. *Neurodegener Dis* 10:224-228
283. Hong S, Beja-Glasser VF, Nfonoyim BM, Frouin A, Li S, Ramakrishnan S, . . . Stevens B (2016) Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science* 352:712-716
284. Horton JD, Shah NA, Warrington JA, Anderson NN, Park SW, Brown MS, Goldstein JL (2003) Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:12027-12032
285. Horton-French K, Dunlop E, Lucas RM, Pereira G, Black LJ (2021) Prevalence and predictors of vitamin D deficiency in a nationally representative sample of Australian adolescents and young adults. *Eur J Clin Nutr* 75:1627-1636
286. Houlden H, Crook R, Backhovens H, Prihar G, Baker M, Hutton M, . . . Hardy J (1998) ApoE genotype is a risk factor in nonpresenilin early-onset Alzheimer's disease families. *Am J Med Genet* 81:117-121
287. Howell S, Caswell AM, Kenny AJ, Turner AJ (1993) Membrane peptidases on human osteoblast-like cells in culture: hydrolysis of calcitonin and hormonal regulation of endopeptidase-24.11. *Biochem J* 290 (Pt 1):159-164
288. Hsu FF (2018) Mass spectrometry-based shotgun lipidomics - a critical review from the technical point of view. *Anal Bioanal Chem* 410:6387-6409
289. Hua R, Kim PK (2016) Multiple paths to peroxisomes: Mechanism of peroxisome maintenance in mammals. *Biochim Biophys Acta* 1863:881-891
290. Huang LK, Chao SP, Hu CJ (2020) Clinical trials of new drugs for Alzheimer disease. *J Biomed Sci* 27:18
291. Huang Y, Todd N, Thathiah A (2017) The role of GPCRs in neurodegenerative diseases: avenues for therapeutic intervention. *Curr Opin Pharmacol* 32:96-110
292. Hung AY, Koo EH, Haass C, Selkoe DJ (1992) Increased expression of beta-amyloid precursor protein during neuronal differentiation is not accompanied by secretory cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:9439-9443
293. Ida N, Hartmann T, Pantel J, Schroder J, Zerfass R, Forstl H, . . . Beyreuther K (1996) Analysis of heterogeneous A4 peptides in human cerebrospinal fluid and blood by a newly developed sensitive Western blot assay. *J Biol Chem* 271:22908-22914
294. Ifuku M, Katafuchi T, Mawatari S, Noda M, Miake K, Sugiyama M, Fujino T (2012) Anti-inflammatory/anti-amyloidogenic effects of plasmalogens in lipopolysaccharide-induced neuroinflammation in adult mice. *J Neuroinflammation* 9:197
295. Iino T, Watanabe S, Yamashita K, Tamada E, Hasegawa T, Irino Y, . . . Yoshida T (2021) Quantification of Amyloid-beta in Plasma by Simple and Highly Sensitive Immunoaffinity Enrichment and LC-MS/MS Assay. *J Appl Lab Med* 6:834-845

296. Indig FE, Benayahu D, Fried A, Wientroub S, Blumberg S (1990) Neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) is highly expressed on osteoblastic cells and other marrow stromal cell types. *Biochem Biophys Res Commun* 172:620-626
297. Inoue K, Matsui I, Hamano T, Okuda K, Tsukamoto Y, Matsumoto A, . . . Isaka Y (2021) Maxacalcitol (22-Oxacalcitriol (OCT)) Retards Progression of Left Ventricular Hypertrophy with Renal Dysfunction Through Inhibition of Calcineurin-NFAT Activity. *Cardiovasc Drugs Ther* 35:381-397
298. Ionescu-Tucker A, Cotman CW (2021) Emerging roles of oxidative stress in brain aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 107:86-95
299. Isaev NK, Stelmashook EV, Genrikhs EE (2019) Neurogenesis and brain aging. *Rev Neurosci* 30:573-580
300. Ito Y, Sorensen KK, Bethea NW, Svistounov D, McCuskey MK, Smedsrod BH, McCuskey RS (2007) Age-related changes in the hepatic microcirculation in mice. *Exp Gerontol* 42:789-797
301. Jahn D, Dorbath D, Schilling AK, Gildein L, Meier C, Vuille-Dit-Bille RN, . . . Geier A (2019) Intestinal vitamin D receptor modulates lipid metabolism, adipose tissue inflammation and liver steatosis in obese mice. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1865:1567-1578
302. Jakubec M, Barias E, Kryuchkov F, Hjernevik LV, Halskau O (2019) Fast and Quantitative Phospholipidomic Analysis of SH-SY5Y Neuroblastoma Cell Cultures Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry and (31)P Nuclear Magnetic Resonance. *ACS Omega* 4:21596-21603
303. Janitschke D, Nelke C, Lauer AA, Regner L, Winkler J, Thiel A, . . . Grimm MOW (2019) Effect of Caffeine and Other Methylxanthines on Abeta-Homeostasis in SH-SY5Y Cells. *Biomolecules* 9
304. Janitschke D, Lauer AA, Bachmann CM, Seyfried M, Grimm HS, Hartmann T, Grimm MOW (2020) Unique Role of Caffeine Compared to Other Methylxanthines (Theobromine, Theophylline, Pentoxifylline, Propentofylline) in Regulation of AD Relevant Genes in Neuroblastoma SH-SY5Y Wild Type Cells. *Int J Mol Sci* 21
305. Janitschke D, Lauer AA, Bachmann CM, Grimm HS, Hartmann T, Grimm MOW (2021) Methylxanthines and Neurodegenerative Diseases: An Update. *Nutrients* 13
306. Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT, Jr. (1993) The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 32:4693-4697
307. Jenkins CM, Yang K, Liu G, Moon SH, Dilthey BG, Gross RW (2018) Cytochrome c is an oxidative stress-activated plasmalogenase that cleaves plasmenylcholine and plasmenylethanolamine at the sn-1 vinyl ether linkage. *J Biol Chem* 293:8693-8709
308. Jensen PH, Hojrup P, Hager H, Nielsen MS, Jacobsen L, Olesen OF, . . . Jakes R (1997) Binding of Abeta to alpha- and beta-synucleins: identification of segments in alpha-synuclein/NAC precursor that bind Abeta and NAC. *Biochem J* 323 (Pt 2):539-546
309. Jia J, Hu J, Huo X, Miao R, Zhang Y, Ma F (2019) Effects of vitamin D supplementation on cognitive function and blood Abeta-related biomarkers in older adults with Alzheimer's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 90:1347-1352
310. Jimenez J, Zuniga-Guajardo S, Zinman B, Angel A (1987) Effects of weight loss in massive obesity on insulin and C-peptide dynamics: sequential changes in insulin production, clearance, and sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 64:661-668
311. Jimenez-Jimenez FJ, Molina JA, de Bustos F, Orti-Pareja M, Benito-Leon J, Tallon-Barranco A, . . . Arenas J (1999) Serum levels of beta-carotene, alpha-carotene and vitamin A in patients with Alzheimer's disease. *Eur J Neurol* 6:495-497
312. Jin W (2020) Novel Insights into PARK7 (DJ-1), a Potential Anti-Cancer Therapeutic Target, and Implications for Cancer Progression. *J Clin Med* 9
313. Johansson P, Almqvist EG, Johansson JO, Mattsson N, Andreasson U, Hansson O, . . . Svensson J (2013) Cerebrospinal fluid (CSF) 25-hydroxyvitamin D concentration and CSF acetylcholinesterase activity are reduced in patients with Alzheimer's disease. *PLoS One* 8:e81989
314. Jones G (2008) Pharmacokinetics of vitamin D toxicity. *Am J Clin Nutr* 88:582S-586S
315. Jonsson T, Stefansson H, Steinberg S, Jonsdottir I, Jonsson PV, Snaedal J, . . . Stefansson K (2013) Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 368:107-116
316. Kajiwara Y, McKenzie A, Dorr N, Gama Sosa MA, Elder G, Schmeidler J, . . . Buxbaum JD (2016) The human-specific CASP4 gene product contributes to Alzheimer-related synaptic and behavioural deficits. *Hum Mol Genet* 25:4315-4327

317. Kang EL, Cameron AN, Piazza F, Walker KR, Tesco G (2010) Ubiquitin regulates GGA3-mediated degradation of BACE1. *J Biol Chem* 285:24108-24119
318. Kang EL, Biscaro B, Piazza F, Tesco G (2012) BACE1 protein endocytosis and trafficking are differentially regulated by ubiquitination at lysine 501 and the Di-leucine motif in the carboxyl terminus. *J Biol Chem* 287:42867-42880
319. Kang JH, Vyas CM, Okereke OI, Ogata S, Albert M, Lee IM, . . . Manson JE (2021) Effect of vitamin D on cognitive decline: results from two ancillary studies of the VITAL randomized trial. *Sci Rep* 11:23253
320. Kao YC, Ho PC, Tu YK, Jou IM, Tsai KJ (2020) Lipids and Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* 21
321. Katsel P, Li C, Haroutunian V (2007) Gene expression alterations in the sphingolipid metabolism pathways during progression of dementia and Alzheimer's disease: a shift toward ceramide accumulation at the earliest recognizable stages of Alzheimer's disease? *Neurochem Res* 32:845-856
322. Katzmarski N, Ziegler-Waldkirch S, Scheffler N, Witt C, Abou-Ajram C, Nuscher B, . . . Meyer-Luehmann M (2020) Abeta oligomers trigger and accelerate Abeta seeding. *Brain Pathol* 30:36-45
323. Kauer JA, Gibson HE (2009) Hot flash: TRPV channels in the brain. *Trends Neurosci* 32:215-224
324. Kawarabayashi T, Shoji M, Younkin LH, Wen-Lang L, Dickson DW, Murakami T, . . . Younkin SG (2004) Dimeric amyloid beta protein rapidly accumulates in lipid rafts followed by apolipoprotein E and phosphorylated tau accumulation in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 24:3801-3809
325. Keck S, Nitsch R, Grune T, Ullrich O (2003) Proteasome inhibition by paired helical filament-tau in brains of patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem* 85:115-122
326. Keeney JTR, Forster S, Sultana R, Brewer LD, Latimer CS, Cai J, . . . Butterfield DA (2013) Dietary vitamin D deficiency in rats from middle to old age leads to elevated tyrosine nitration and proteomics changes in levels of key proteins in brain: implications for low vitamin D-dependent age-related cognitive decline. *Free Radic Biol Med* 65:324-334
327. Keller JN, Hanni KB, Markesbery WR (2000) Impaired proteasome function in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 75:436-439
328. Kennel KA, Drake MT, Hurley DL (2010) Vitamin D deficiency in adults: when to test and how to treat. *Mayo Clin Proc* 85:752-757; quiz 757-758
329. Kim MR, Jeong SJ (2019) Relationship between Vitamin D Level and Lipid Profile in Non-Obese Children. *Metabolites* 9
330. Kim WS, Bhatia S, Elliott DA, Agholme L, Kagedal K, McCann H, . . . Garner B (2010) Increased ATP-binding cassette transporter A1 expression in Alzheimer's disease hippocampal neurons. *J Alzheimers Dis* 21:193-205
331. Kimberly WT, Zheng JB, Guenette SY, Selkoe DJ (2001) The intracellular domain of the beta-amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a notch-like manner. *J Biol Chem* 276:40288-40292
332. Kimberly WT, LaVoie MJ, Ostaszewski BL, Ye W, Wolfe MS, Selkoe DJ (2003) Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:6382-6387
333. Knight EM, Martins IV, Gumusgoz S, Allan SM, Lawrence CB (2014) High-fat diet-induced memory impairment in triple-transgenic Alzheimer's disease (3xTgAD) mice is independent of changes in amyloid and tau pathology. *Neurobiol Aging* 35:1821-1832
334. Knopman DS (2019) Lowering of Amyloid-Beta by beta-Secretase Inhibitors - Some Informative Failures. *N Engl J Med* 380:1476-1478
335. Kobayashi T, Okano T, Tsugawa N, Masuda S, Takeuchi A, Nishii Y (1991) Metabolism and transporting system of 22-oxacalcitriol. *Contrib Nephrol* 91:129-133
336. Kofeler HC, Fauland A, Rechberger GN, Trotsmuller M (2012) Mass spectrometry based lipidomics: an overview of technological platforms. *Metabolites* 2:19-38
337. Koh YH, von Arnim CA, Hyman BT, Tanzi RE, Tesco G (2005) BACE is degraded via the lysosomal pathway. *J Biol Chem* 280:32499-32504
338. Koike H, Tomioka S, Sorimachi H, Saido TC, Maruyama K, Okuyama A, . . . Ishiura S (1999) Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. *Biochem J* 343 Pt 2:371-375
339. Konietzko U, Goodger ZV, Meyer M, Kohli BM, Bosset J, Lahiri DK, Nitsch RM (2010) Co-localization of the amyloid precursor protein and Notch intracellular domains in nuclear transcription factories. *Neurobiol Aging* 31:58-73

340. Kosicek M, Zetterberg H, Andreasen N, Peter-Katalinic J, Hecimovic S (2012) Elevated cerebrospinal fluid sphingomyelin levels in prodromal Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 516:302-305
341. Kragballe K, Wildfang IL (1990) Calcipotriol (MC 903), a novel vitamin D3 analogue stimulates terminal differentiation and inhibits proliferation of cultured human keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 282:164-167
342. Kragballe K (1992) Treatment of psoriasis with calcipotriol and other vitamin D analogues. *J Am Acad Dermatol* 27:1001-1008
343. Krahmer N, Guo Y, Wilfling F, Hilger M, Lingrell S, Heger K, . . . Walther TC (2011) Phosphatidylcholine synthesis for lipid droplet expansion is mediated by localized activation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase. *Cell Metab* 14:504-515
344. Krausz Y, Bar-On H, Shafir E (1981) Origin and pattern of glucocorticoid-induced hyperlipidemia in rats. Dose-dependent bimodal changes in serum lipids and lipoproteins in relation to hepatic lipogenesis and tissue lipoprotein lipase activity. *Biochim Biophys Acta* 663:69-82
345. Kuhn PH, Wang H, Dislich B, Colombo A, Zeitschel U, Ellwart JW, . . . Lichtenthaler SF (2010) ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J* 29:3020-3032
346. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD (2018) Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harb Protoc* 2018
347. Kurochkin IV, Guarnera E, Berezovsky IN (2018) Insulin-Degrading Enzyme in the Fight against Alzheimer's Disease. *Trends Pharmacol Sci* 39:49-58
348. Kurokin I, Lauer AA, Janitschke D, Winkler J, Theiss EL, Griebisch LV, . . . Grimm MOW (2021) Targeted Lipidomics of Mitochondria in a Cellular Alzheimer's Disease Model. *Biomedicines* 9
349. Kweder H, Eidi H (2018) Vitamin D deficiency in elderly: Risk factors and drugs impact on vitamin D status. *Avicenna J Med* 8:139-146
350. Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, . . . Klein WL (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6448-6453
351. Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasionowski M, . . . Fahrenholz F (1999) Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3922-3927
352. Lanctot KL, Herrmann N, Yau KK, Khan LR, Liu BA, LouLou MM, Einarson TR (2003) Efficacy and safety of cholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease: a meta-analysis. *CMAJ* 169:557-564
353. Landel V, Annweiler C, Millet P, Morello M, Feron F (2016) Vitamin D, Cognition and Alzheimer's Disease: The Therapeutic Benefit is in the D-Tails. *J Alzheimers Dis* 53:419-444
354. Lane CA, Hardy J, Schott JM (2018) Alzheimer's disease. *Eur J Neurol* 25:59-70
355. Lang F, Ma K, Leibrock CB (2019) 1,25(OH)2D3 in Brain Function and Neuropsychiatric Disease. *Neurosignals* 27:40-49
356. Larson EB, Shadlen MF, Wang L, McCormick WC, Bowen JD, Teri L, Kukull WA (2004) Survival after initial diagnosis of Alzheimer disease. *Ann Intern Med* 140:501-509
357. Larsson SC, Traylor M, Markus HS, Michaelsson K (2018) Serum Parathyroid Hormone, 25-Hydroxyvitamin D, and Risk of Alzheimer's Disease: A Mendelian Randomization Study. *Nutrients* 10
358. Lashuel HA, Overk CR, Oueslati A, Masliah E (2013) The many faces of alpha-synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target. *Nat Rev Neurosci* 14:38-48
359. Lauer AA, Janitschke D, Hartmann T, Grimm HS, Grimm MO (2019) The Effects of Vitamin D Deficiency on Neurodegenerative Diseases. *IntechOpen*
360. Lauer AA, Mett J, Janitschke D, Thiel A, Stahlmann CP, Bachmann CM, . . . Grimm MOW (2020) Regulatory feedback cycle of the insulin-degrading enzyme and the amyloid precursor protein intracellular domain: Implications for Alzheimer's disease. *Aging Cell* 19:e13264
361. Lauer AA, Griebisch LV, Pilz SM, Janitschke D, Theiss EL, Reichrath J, . . . Grimm MOW (2021a) Impact of Vitamin D3 Deficiency on Phosphatidylcholine-/Ethanolamine, Plasmalogen-, Lyso-Phosphatidylcholine-/Ethanolamine, Carnitine- and Triacyl Glyceride-Homeostasis in Neuroblastoma Cells and Murine Brain. *Biomolecules* 11
362. Lauer AA, Janitschke D, Dos Santos Guilherme M, Nguyen VTT, Bachmann CM, Qiao S, . . . Grimm MOW (2021b) Shotgun lipidomics of liver and brain tissue of Alzheimer's disease model mice treated with acitretin. *Sci Rep* 11:15301

363. Law SH, Chan ML, Marathe GK, Parveen F, Chen CH, Ke LY (2019) An Updated Review of Lysophosphatidylcholine Metabolism in Human Diseases. *Int J Mol Sci* 20
364. Lee TW, Kao YH, Lee TI, Chen YJ (2017) ADAM10 modulates calcitriol-regulated RAGE in cardiomyocytes. *Eur J Clin Invest* 47:675-683
365. Lee YH (2018) An overview of meta-analysis for clinicians. *Korean J Intern Med* 33:277-283
366. Lee YJ, Ch'ng TH (2020) RIP at the Synapse and the Role of Intracellular Domains in Neurons. *Neuromolecular Med* 22:1-24
367. Lefebvre d'Hellencourt C, Montero-Menei CN, Bernard R, Couez D (2003) Vitamin D3 inhibits proinflammatory cytokines and nitric oxide production by the EOC13 microglial cell line. *J Neurosci Res* 71:575-582
368. Leissring MA, Farris W, Chang AY, Walsh DM, Wu X, Sun X, . . . Selkoe DJ (2003) Enhanced proteolysis of beta-amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death. *Neuron* 40:1087-1093
369. Leissring MA (2021) Insulin-Degrading Enzyme: Paradoxes and Possibilities. *Cells* 10
370. Lemire P, Brangier A, Beaudenon M, Duval GT, Annweiler C (2018) Cognitive changes under memantine according to vitamin D status in Alzheimer patients: An exposed/unexposed cohort pilot study. *J Steroid Biochem Mol Biol* 175:151-156
371. Leyssens C, Verlinden L, Verstuyf A (2014) The future of vitamin D analogs. *Front Physiol* 5:122
372. Li M, Butka E, Wang X (2014) Comprehensive quantification of triacylglycerols in soybean seeds by electrospray ionization mass spectrometry with multiple neutral loss scans. *Sci Rep* 4:6581
373. Li Q, Liu Y, Sun M (2017) Autophagy and Alzheimer's Disease. *Cell Mol Neurobiol* 37:377-388
374. Liberato MV, Nascimento AS, Ayers SD, Lin JZ, Cvoro A, Silveira RL, . . . Polikarpov I (2012) Medium chain fatty acids are selective peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) gamma activators and pan-PPAR partial agonists. *PLoS One* 7:e36297
375. Lin CI, Chang YC, Kao NJ, Lee WJ, Cross TW, Lin SH (2020) 1,25(OH)2D3 Alleviates Abeta(25-35)-Induced Tau Hyperphosphorylation, Excessive Reactive Oxygen Species, and Apoptosis Through Interplay with Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Signaling in SH-SY5Y Cells. *Int J Mol Sci* 21
376. Linnertz C, Lutz MW, Ervin JF, Allen J, Miller NR, Welsh-Bohmer KA, . . . Chiba-Falek O (2014) The genetic contributions of SNCA and LRRK2 genes to Lewy Body pathology in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 23:4814-4821
377. Littlejohns TJ, Henley WE, Lang IA, Annweiler C, Beauchet O, Chaves PH, . . . Llewellyn DJ (2014) Vitamin D and the risk of dementia and Alzheimer disease. *Neurology* 83:920-928
378. Liu D, Zhou L, Yang M, McIntyre RS, Cao B (2022) Oxidative Stress Mediates the Association Between Dietary Fat Intake and Cognition in US Older Adults. *Am J Geriatr Psychiatry* 30:761-773
379. Liu JJ, Zhang W, Wang SS, Jia ZQ, Shi YH, Yang L, Shi RL (2019a) Effects of chain length of saturated fatty acids on Abeta generation in SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett* 698:169-172
380. Liu L, Herukka SK, Minkeviciene R, van Groen T, Tanila H (2004) Longitudinal observation on CSF Abeta42 levels in young to middle-aged amyloid precursor protein/presenilin-1 doubly transgenic mice. *Neurobiol Dis* 17:516-523
381. Liu PP, Xie Y, Meng XY, Kang JS (2019b) History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease. *Signal Transduct Target Ther* 4:29
382. Liu Q, Zerbinatti CV, Zhang J, Hoe HS, Wang B, Cole SL, . . . Bu G (2007) Amyloid precursor protein regulates brain apolipoprotein E and cholesterol metabolism through lipoprotein receptor LRP1. *Neuron* 56:66-78
383. Liu Y, Ding R, Xu Z, Xue Y, Zhang D, Zhang Y, . . . Li X (2021) Roles and Mechanisms of the Protein Quality Control System in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* 23
384. Liu YH, Bu XL, Liang CR, Wang YR, Zhang T, Jiao SS, . . . Wang YJ (2015) An N-terminal antibody promotes the transformation of amyloid fibrils into oligomers and enhances the neurotoxicity of amyloid-beta: the dust-raising effect. *J Neuroinflammation* 12:153
385. Liu Z, Zhu H, Fang GG, Walsh K, Mwamburi M, Wolozin B, . . . Qiu WQ (2012) Characterization of insulin degrading enzyme and other amyloid-beta degrading proteases in human serum: a role in Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis* 29:329-340
386. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408
387. Lloyd GM, Dhillon JS, Gorion KM, Riffe C, Fromholt SE, Xia Y, . . . Borchelt DR (2021) Collusion of alpha-Synuclein and Abeta aggravating co-morbidities in a novel prion-type mouse model. *Mol Neurodegener* 16:63

388. Loef M, Walach H (2013) The omega-6/omega-3 ratio and dementia or cognitive decline: a systematic review on human studies and biological evidence. *J Nutr Gerontol Geriatr* 32:1-23
389. Long JM, Holtzman DM (2019) Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell* 179:312-339
390. Lopes da Silva S, Vellas B, Elemans S, Luchsinger J, Kamphuis P, Yaffe K, . . . Stijnen T (2014) Plasma nutrient status of patients with Alzheimer's disease: Systematic review and meta-analysis. *Alzheimers Dement* 10:485-502
391. Lou YR, Molnar F, Perakyla M, Qiao S, Kalueff AV, St-Arnaud R, . . . Tuohimaa P (2010) 25-Hydroxyvitamin D(3) is an agonistic vitamin D receptor ligand. *J Steroid Biochem Mol Biol* 118:162-170
392. Lowe SL, Willis BA, Hawdon A, Natanegara F, Chua L, Foster J, . . . Sims JR (2021) Donanemab (LY3002813) dose-escalation study in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (N Y)* 7:e12112
393. Lucas PA, Rouillet C, Duchambon P, Lacour B, Druke T (1989) Rapid stimulation of calcium uptake by isolated rat enterocytes by 1,25(OH)2D3. *Pflugers Arch* 413:407-413
394. Lv L, Tan X, Peng X, Bai R, Xiao Q, Zou T, . . . Wang C (2020) The relationships of vitamin D, vitamin D receptor gene polymorphisms, and vitamin D supplementation with Parkinson's disease. *Transl Neurodegener* 9:34
395. Lyschik S, Lauer AA, Roth T, Janitschke D, Hollander M, Will T, . . . Schrul B (2022) PEX19 Coordinates Neutral Lipid Storage in Cells in a Peroxisome-Independent Fashion. *Front Cell Dev Biol* 10:859052
396. Ma C, Hong F, Yang S (2022) Amyloidosis in Alzheimer's Disease: Pathogeny, Etiology, and Related Therapeutic Directions. *Molecules* 27
397. Ma L, Nelson ER (2019) Oxysterols and nuclear receptors. *Mol Cell Endocrinol* 484:42-51
398. Ma Y, Ajnakina O, Steptoe A, Cadar D (2020) Higher risk of dementia in English older individuals who are overweight or obese. *Int J Epidemiol* 49:1353-1365
399. MacLaughlin J, Holick MF (1985) Aging decreases the capacity of human skin to produce vitamin D3. *J Clin Invest* 76:1536-1538
400. Mahley RW (2016) Apolipoprotein E: from cardiovascular disease to neurodegenerative disorders. *J Mol Med (Berl)* 94:739-746
401. Maianti JP, McFedries A, Foda ZH, Kleiner RE, Du XQ, Leissring MA, . . . Liu DR (2014) Anti-diabetic activity of insulin-degrading enzyme inhibitors mediated by multiple hormones. *Nature* 511:94-98
402. Maianti JP, Tan GA, Vetere A, Welsh AJ, Wagner BK, Seeliger MA, Liu DR (2019) Substrate-selective inhibitors that reprogram the activity of insulin-degrading enzyme. *Nat Chem Biol* 15:565-574
403. Mandel H, Sharf R, Berant M, Wanders RJ, Vreken P, Aviram M (1998) Plasmalogen phospholipids are involved in HDL-mediated cholesterol efflux: insights from investigations with plasmalogen-deficient cells. *Biochem Biophys Res Commun* 250:369-373
404. Marciani DJ (2015) Alzheimer's disease vaccine development: A new strategy focusing on immune modulation. *J Neuroimmunol* 287:54-63
405. Marciani DJ (2019) Promising Results from Alzheimer's Disease Passive Immunotherapy Support the Development of a Preventive Vaccine. *Research (Wash D C)* 2019:5341375
406. Marin R, Fabelo N, Fernandez-Echevarria C, Canerina-Amaro A, Rodriguez-Barreto D, Quinto-Aleman D, . . . Diaz M (2016) Lipid Raft Alterations in Aged-Associated Neuropathologies. *Curr Alzheimer Res* 13:973-984
407. Marksteiner J, Oberacher H, Humpel C (2019) Acyl-Alkyl-Phosphatidylcholines are Decreased in Saliva of Patients with Alzheimer's Disease as Identified by Targeted Metabolomics. *J Alzheimers Dis* 68:583-589
408. Martin V, Fabelo N, Santpere G, Puig B, Marin R, Ferrer I, Diaz M (2010) Lipid alterations in lipid rafts from Alzheimer's disease human brain cortex. *J Alzheimers Dis* 19:489-502
409. Martinez-Sena T, Soluyanov P, Guzman C, Valdivielso JM, Castell JV, Jover R (2020) The Vitamin D Receptor Regulates Glycerolipid and Phospholipid Metabolism in Human Hepatocytes. *Biomolecules* 10
410. Marzolo MP, Bu G (2009) Lipoprotein receptors and cholesterol in APP trafficking and proteolytic processing, implications for Alzheimer's disease. *Semin Cell Dev Biol* 20:191-200
411. Masters CL, Bateman R, Blennow K, Rowe CC, Sperling RA, Cummings JL (2015) Alzheimer's disease. *Nat Rev Dis Primers* 1:15056

412. Max D, Brandsch C, Schumann S, Kuhne H, Frommhagen M, Schutkowski A, . . . Stangl GI (2014) Maternal vitamin D deficiency causes smaller muscle fibers and altered transcript levels of genes involved in protein degradation, myogenesis, and cytoskeleton organization in the newborn rat. *Mol Nutr Food Res* 58:343-352
413. Mazzaferro S, Goldsmith D, Larsson TE, Massy ZA, Cozzolino M (2014) Vitamin D metabolites and/or analogs: which D for which patient? *Curr Vasc Pharmacol* 12:339-349
414. McCudden CR, Hains MD, Kimple RJ, Siderovski DP, Willard FS (2005) G-protein signaling: back to the future. *Cell Mol Life Sci* 62:551-577
415. McDowell I (2001) Alzheimer's disease: insights from epidemiology. *Aging (Milano)* 13:143-162
416. McGrattan AM, McGuinness B, McKinley MC, Kee F, Passmore P, Woodside JV, McEvoy CT (2019) Diet and Inflammation in Cognitive Ageing and Alzheimer's Disease. *Curr Nutr Rep* 8:53-65
417. Mendez MF (2017) Early-Onset Alzheimer Disease. *Neurol Clin* 35:263-281
418. Menendez SG, Martin Gimenez VM, Holick MF, Barrantes FJ, Manucha W (2022) COVID-19 and neurological sequelae: Vitamin D as a possible neuroprotective and/or neuroreparative agent. *Life Sci* 297:120464
419. Mett J (2017) Die Regulation Abeta-degradierender Enzyme durch die intrazelluläre Domäne von APP (AICD) und die Lipidhomöostase. Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes
420. Mett J (2021) The Impact of Medium Chain and Polyunsaturated omega-3-Fatty Acids on Amyloid-beta Deposition, Oxidative Stress and Metabolic Dysfunction Associated with Alzheimer's Disease. *Antioxidants (Basel)* 10
421. Mett J, Lauer AA, Janitschke D, Griebisch LV, Theiss EL, Grimm HS, . . . Grimm MOW (2021) Medium-Chain Length Fatty Acids Enhance Abeta Degradation by Affecting Insulin-Degrading Enzyme. *Cells* 10
422. Mett J, Muller U (2021) The medium-chain fatty acid decanoic acid reduces oxidative stress levels in neuroblastoma cells. *Sci Rep* 11:6135
423. Miller BC, Eckman EA, Sambamurti K, Dobbs N, Chow KM, Eckman CB, . . . Thiele DL (2003) Amyloid-beta peptide levels in brain are inversely correlated with insulin activity levels in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:6221-6226
424. Miller YI, Navia-Pelaez JM, Corr M, Yaksh TL (2020) Lipid rafts in glial cells: role in neuroinflammation and pain processing. *J Lipid Res* 61:655-666
425. Miners JS, Kehoe PG, Love S (2008a) Immunocapture-based fluorometric assay for the measurement of insulin-degrading enzyme activity in brain tissue homogenates. *J Neurosci Methods* 169:177-181
426. Miners JS, Verbeek MM, Rikkert MO, Kehoe PG, Love S (2008b) Immunocapture-based fluorometric assay for the measurement of neprilysin-specific enzyme activity in brain tissue homogenates and cerebrospinal fluid. *J Neurosci Methods* 167:229-236
427. Miners JS, Baig S, Tayler H, Kehoe PG, Love S (2009) Neprilysin and insulin-degrading enzyme levels are increased in Alzheimer disease in relation to disease severity. *J Neuropathol Exp Neurol* 68:902-914
428. Miners JS, van Helmond Z, Kehoe PG, Love S (2010) Changes with age in the activities of beta-secretase and the Abeta-degrading enzymes neprilysin, insulin-degrading enzyme and angiotensin-converting enzyme. *Brain Pathol* 20:794-802
429. Mintun MA, Lo AC, Duggan Evans C, Wessels AM, Ardayfio PA, Andersen SW, . . . Skovronsky DM (2021) Donanemab in Early Alzheimer's Disease. *N Engl J Med* 384:1691-1704
430. Mirra SS, Heyman A, McKeel D, Sumi SM, Crain BJ, Brownlee LM, . . . Berg L (1991) The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 41:479-486
431. Miyazawa S, Ozasa H, Furuta S, Osumi T, Hashimoto T, Miura S, . . . Tatibana M (1983) Biosynthesis and turnover of carnitine acetyltransferase in rat liver. *J Biochem* 93:453-459
432. Mizuno S, Ogishima S, Kitatani K, Kikuchi M, Tanaka H, Yaegashi N, Nakaya J (2016) Network Analysis of a Comprehensive Knowledge Repository Reveals a Dual Role for Ceramide in Alzheimer's Disease. *PLoS One* 11:e0148431
433. Mizwicki MT, Liu G, Fiala M, Magpantay L, Sayre J, Siani A, . . . Teplow DB (2013) 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and resolvin D1 retune the balance between amyloid-beta phagocytosis and inflammation in Alzheimer's disease patients. *J Alzheimers Dis* 34:155-170
434. Mladenovic Djordjevic AN, Kapetanou M, Loncarevic-Vasiljkovic N, Todorovic S, Athanasopoulou S, Jovic M, . . . Gonos ES (2021) Pharmacological intervention in a transgenic

- mouse model improves Alzheimer's-associated pathological phenotype: Involvement of proteasome activation. *Free Radic Biol Med* 162:88-103
435. Molander-Melin M, Blennow K, Bogdanovic N, Dellheden B, Mansson JE, Fredman P (2005) Structural membrane alterations in Alzheimer brains found to be associated with regional disease development; increased density of gangliosides GM1 and GM2 and loss of cholesterol in detergent-resistant membrane domains. *J Neurochem* 92:171-182
436. Moradi K, Faghani S, Abdolalizadeh A, Khomeijani-Farahani M, Ashraf-Ganjouei A, Alzheimer's Disease Neuroimaging I (2021) Biological Features of Reversion from Mild Cognitive Impairment to Normal Cognition: A Study of Cerebrospinal Fluid Markers and Brain Volume. *J Alzheimers Dis Rep* 5:179-186
437. Morelli L, Llovera RE, Mathov I, Lue LF, Frangione B, Ghiso J, Castano EM (2004) Insulin-degrading enzyme in brain microvessels: proteolysis of amyloid {beta} vasculotropic variants and reduced activity in cerebral amyloid angiopathy. *J Biol Chem* 279:56004-56013
438. Morenas-Rodriguez E, Li Y, Nuscher B, Franzmeier N, Xiong C, Suarez-Calvet M, . . . Dominantly Inherited Alzheimer N (2022) Soluble TREM2 in CSF and its association with other biomarkers and cognition in autosomal-dominant Alzheimer's disease: a longitudinal observational study. *Lancet Neurol* 21:329-341
439. Mori T, Paris D, Town T, Rojiani AM, Sparks DL, Delledonne A, . . . Mullan MJ (2001) Cholesterol accumulates in senile plaques of Alzheimer disease patients and in transgenic APP(SW) mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 60:778-785
440. Morris MC, Evans DA, Bienias JL, Tangney CC, Bennett DA, Wilson RS, . . . Schneider J (2003) Consumption of fish and n-3 fatty acids and risk of incident Alzheimer disease. *Arch Neurol* 60:940-946
441. Mosconi L (2013) Glucose metabolism in normal aging and Alzheimer's disease: Methodological and physiological considerations for PET studies. *Clin Transl Imaging* 1
442. Mukherjee S, Perez KA, Lago LC, Klatt S, McLean CA, Birchall IE, . . . Roberts BR (2021) Quantification of N-terminal amyloid-beta isoforms reveals isomers are the most abundant form of the amyloid-beta peptide in sporadic Alzheimer's disease. *Brain Commun* 3:fcab028
443. Mulder C, Wahlund LO, Teerlink T, Blomberg M, Veerhuis R, van Kamp GJ, . . . Scheffer PG (2003) Decreased lysophosphatidylcholine/phosphatidylcholine ratio in cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease. *J Neural Transm (Vienna)* 110:949-955
444. Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, Lannfelt L (1992) A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet* 1:345-347
445. Murayama E, Miyamoto K, Kubodera N, Mori T, Matsunaga I (1986) Synthetic studies of vitamin D3 analogues. VIII. Synthesis of 22-oxavitamin D3 analogues. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 34:4410-4413
446. Murphy RC, James PF, McAnoy AM, Krank J, Duchoslav E, Barkley RM (2007) Detection of the abundance of diacylglycerol and triacylglycerol molecular species in cells using neutral loss mass spectrometry. *Anal Biochem* 366:59-70
447. Murthy MS, Pande SV (1987) Malonyl-CoA binding site and the overt carnitine palmitoyltransferase activity reside on the opposite sides of the outer mitochondrial membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:378-382
448. Musardo S, Therin S, Pelucchi S, D'Andrea L, Stringhi R, Ribeiro A, . . . Marcello E (2022) The development of ADAM10 endocytosis inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Mol Ther* 30:2474-2490
449. Nagan N, Hajra AK, Larkins LK, Lazarow P, Purdue PE, Rizzo WB, Zoeller RA (1998) Isolation of a Chinese hamster fibroblast variant defective in dihydroxyacetonephosphate acyltransferase activity and plasmalogen biosynthesis: use of a novel two-step selection protocol. *Biochem J* 332 (Pt 1):273-279
450. Nalivaeva NN, Belyaev ND, Turner AJ (2016) New Insights into Epigenetic and Pharmacological Regulation of Amyloid-Degrading Enzymes. *Neurochem Res* 41:620-630
451. Nalivaeva NN, Turner AJ (2019) Targeting amyloid clearance in Alzheimer's disease as a therapeutic strategy. *Br J Pharmacol* 176:3447-3463
452. Nandi A, Wadhvani N, Joshi SR (2019) Vitamin D deficiency influences fatty acid metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 140:57-63

453. Nguyen TB, Louie SM, Daniele JR, Tran Q, Dillin A, Zoncu R, . . . Olzmann JA (2017) DGAT1-Dependent Lipid Droplet Biogenesis Protects Mitochondrial Function during Starvation-Induced Autophagy. *Dev Cell* 42:9-21 e25
454. Niederstrasser J, Herr C, Wolf L, Lehr CM, Beisswenger C, Bals R (2016) Vitamin D Deficiency Does Not Result in a Breach of Host Defense in Murine Models of Pneumonia. *Infect Immun* 84:3097-3104
455. Nitsch RM, Blusztajn JK, Pittas AG, Slack BE, Growdon JH, Wurtman RJ (1992) Evidence for a membrane defect in Alzheimer disease brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:1671-1675
456. Nolan T, Hands RE, Bustin SA (2006) Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc* 1:1559-1582
457. Nordestgaard LT, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG, Frikke-Schmidt R (2015) Loss-of-function mutation in ABCA1 and risk of Alzheimer's disease and cerebrovascular disease. *Alzheimers Dement* 11:1430-1438
458. Norman AW, Deluca HF (1964) The Subcellular Location of H3 Vitamin D3 in Kidney and Intestine. *Arch Biochem Biophys* 107:69-77
459. Norman AW, Song X, Zanello L, Bula C, Okamura WH (1999) Rapid and genomic biological responses are mediated by different shapes of the agonist steroid hormone, 1 α ,25(OH) $_2$ vitamin D3. *Steroids* 64:120-128
460. Nunomura A, Perry G (2020) RNA and Oxidative Stress in Alzheimer's Disease: Focus on microRNAs. *Oxid Med Cell Longev* 2020:2638130
461. O'Reilly JA, Lynch M (2012) Rosiglitazone improves spatial memory and decreases insoluble A β (1-42) in APP/PS1 mice. *J Neuroimmune Pharmacol* 7:140-144
462. Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, . . . Vassar R (2006) Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci* 26:10129-10140
463. Oh S, Hong HS, Hwang E, Sim HJ, Lee W, Shin SJ, Mook-Jung I (2005) Amyloid peptide attenuates the proteasome activity in neuronal cells. *Mech Ageing Dev* 126:1292-1299
464. Okada T, Ikeda K, Wakabayashi M, Ogawa M, Matsuzaki K (2008) Formation of toxic A β (1-40) fibrils on GM1 ganglioside-containing membranes mimicking lipid rafts: polymorphisms in A β (1-40) fibrils. *J Mol Biol* 382:1066-1074
465. Okano T, Tsugawa N, Masuda S, Takeuchi A, Kobayashi T, Nishii Y (1989) Protein-binding properties of 22-oxa-1 α ,25-dihydroxyvitamin D3, a synthetic analogue of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 35:529-533
466. Oksman M, Iivonen H, Högys E, Amtul Z, Penke B, Leenders I, . . . Tanila H (2006) Impact of different saturated fatty acid, polyunsaturated fatty acid and cholesterol containing diets on beta-amyloid accumulation in APP/PS1 transgenic mice. *Neurobiol Dis* 23:563-572
467. Oliveira LM, Teixeira FME, Sato MN (2018) Impact of Retinoic Acid on Immune Cells and Inflammatory Diseases. *Mediators Inflamm* 2018:3067126
468. Olmsted JB, Carlson K, Klebe R, Ruddle F, Rosenbaum J (1970) Isolation of microtubule protein from cultured mouse neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 65:129-136
469. Oliveira A, Herranz P, Montes ML (2019) Psoriasis and fatty liver: a harmful synergy. *Rev Esp Enferm Dig* 111:314-319
470. Orre M, Kamphuis W, Dooves S, Kooijman L, Chan ET, Kirk CJ, . . . Hol EM (2013) Reactive glia show increased immunoproteasome activity in Alzheimer's disease. *Brain* 136:1415-1431
471. Ortiz-Sanz C, Gaminde-Blasco A, Valero J, Bakota L, Brandt R, Zugaza JL, . . . Alberdi E (2020) Early Effects of A β Oligomers on Dendritic Spine Dynamics and Arborization in Hippocampal Neurons. *Front Synaptic Neurosci* 12:2
472. Ostkamp P, Salmen A, Pignolet B, Gorlich D, Andlauer TFM, Schulte-Mecklenbeck A, . . . the BN (2021) Sunlight exposure exerts immunomodulatory effects to reduce multiple sclerosis severity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118
473. Ota M, Matsuo J, Ishida I, Takano H, Yokoi Y, Hori H, . . . Kunugi H (2019) Effects of a medium-chain triglyceride-based ketogenic formula on cognitive function in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 690:232-236
474. Ouma S, Suenaga M, Bolukbasi Hatip FF, Hatip-Al-Khatib I, Tsuboi Y, Matsunaga Y (2018) Serum vitamin D in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Brain Behav* 8:e00936

475. Ozaki T, Li Y, Kikuchi H, Tomita T, Iwatsubo T, Nakagawara A (2006) The intracellular domain of the amyloid precursor protein (AICD) enhances the p53-mediated apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 351:57-63
476. Pai VV, Phadke D, Shukla P, Naik K (2019) Fixed Tapering Dosage of Acitretin in Patients with Psoriasis: A Short-Term Analysis of Clinical Efficacy and its Effects on Biochemical Parameters. *Indian J Dermatol* 64:213-216
477. Panuwet P, Hunter RE, Jr., D'Souza PE, Chen X, Radford SA, Cohen JR, . . . Barr DB (2016) Biological Matrix Effects in Quantitative Tandem Mass Spectrometry-Based Analytical Methods: Advancing Biomonitoring. *Crit Rev Anal Chem* 46:93-105
478. Pardossi-Piquard R, Petit A, Kawarai T, Sunyach C, Alves da Costa C, Vincent B, . . . Checler F (2005) Presenilin-dependent transcriptional control of the Abeta-degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of betaAPP and APLP. *Neuron* 46:541-554
479. Pardossi-Piquard R, Checler F (2012) The physiology of the beta-amyloid precursor protein intracellular domain AICD. *J Neurochem* 120 Suppl 1:109-124
480. Pardridge WM, Sakiyama R, Coty WA (1985) Restricted transport of vitamin D and A derivatives through the rat blood-brain barrier. *J Neurochem* 44:1138-1141
481. Parhizkar S, Arzberger T, Brendel M, Kleinberger G, Deussing M, Focke C, . . . Haass C (2019) Loss of TREM2 function increases amyloid seeding but reduces plaque-associated ApoE. *Nat Neurosci* 22:191-204
482. Park G, Nhan HS, Tyan SH, Kawakatsu Y, Zhang C, Navarro M, Koo EH (2020) Caspase Activation and Caspase-Mediated Cleavage of APP Is Associated with Amyloid beta-Protein-Induced Synapse Loss in Alzheimer's Disease. *Cell Rep* 31:107839
483. Paroni G, Bisceglia P, Seripa D (2019) Understanding the Amyloid Hypothesis in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 68:493-510
484. Patel KK, Sehgal VS, Kashfi K (2022) Molecular targets of statins and their potential side effects: Not all the glitter is gold. *Eur J Pharmacol* 922:174906
485. Peleg S, Sastry M, Collins ED, Bishop JE, Norman AW (1995) Distinct conformational changes induced by 20-epi analogues of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 are associated with enhanced activation of the vitamin D receptor. *J Biol Chem* 270:10551-10558
486. Penna I, Vella S, Gigoni A, Russo C, Cancedda R, Pagano A (2011) Selection of candidate housekeeping genes for normalization in human postmortem brain samples. *Int J Mol Sci* 12:5461-5470
487. Pennington ER, Funai K, Brown DA, Shaikh SR (2019) The role of cardiolipin concentration and acyl chain composition on mitochondrial inner membrane molecular organization and function. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1864:1039-1052
488. Pereira F, Barbachano A, Singh PK, Campbell MJ, Munoz A, Larriba MJ (2012) Vitamin D has wide regulatory effects on histone demethylase genes. *Cell Cycle* 11:1081-1089
489. Perez-Tur J, Froelich S, Prihar G, Crook R, Baker M, Duff K, . . . et al. (1995) A mutation in Alzheimer's disease destroying a splice acceptor site in the presenilin-1 gene. *Neuroreport* 7:297-301
490. Perl DP (2010) Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med* 77:32-42
491. Petersen RC, Lopez O, Armstrong MJ, Getchius TSD, Ganguli M, Gloss D, . . . Rae-Grant A (2018) Practice guideline update summary: Mild cognitive impairment: Report of the Guideline Development, Dissemination, and Implementation Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 90:126-135
492. Pettegrew JW, Panchalingam K, Hamilton RL, McClure RJ (2001) Brain membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease. *Neurochem Res* 26:771-782
493. Pham TM, Petersen I, Walters K, Raine R, Manthorpe J, Mukadam N, Cooper C (2018) Trends in dementia diagnosis rates in UK ethnic groups: analysis of UK primary care data. *Clin Epidemiol* 10:949-960
494. Phuyal S, Hessvik NP, Skotland T, Sandvig K, Llorente A (2014) Regulation of exosome release by glycosphingolipids and flotillins. *FEBS J* 281:2214-2227
495. Pierucci F, Garcia-Gil M, Frati A, Bini F, Martinesi M, Vannini E, . . . Meacci E (2017) Vitamin D3 protects against Abeta peptide cytotoxicity in differentiated human neuroblastoma SH- SY5Y cells: A role for SIP1/p38MAPK/ATF4 axis. *Neuropharmacology* 116:328-342
496. Pike JW, Meyer MB (2010) The vitamin D receptor: new paradigms for the regulation of gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *Endocrinol Metab Clin North Am* 39:255-269, table of contents

497. Pike LJ (2006) Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res* 47:1597-1598
498. Piotrowska A, Wierzbicka J, Nadkarni S, Brown G, Kutner A, Zmijewski MA (2016) Antiproliferative Activity of Double Point Modified Analogs of 1,25-Dihydroxyvitamin D(2) Against Human Malignant Melanoma Cell Lines. *Int J Mol Sci* 17
499. Prakriya M, Lewis RS (2015) Store-Operated Calcium Channels. *Physiol Rev* 95:1383-1436
500. Presse N, Shatenstein B, Kergoat MJ, Ferland G (2008) Low vitamin K intakes in community-dwelling elders at an early stage of Alzheimer's disease. *J Am Diet Assoc* 108:2095-2099
501. Proitsi P, Lupton MK, Velayudhan L, Newhouse S, Fogh I, Tsolaki M, . . . Powell JF (2014) Genetic predisposition to increased blood cholesterol and triglyceride lipid levels and risk of Alzheimer disease: a Mendelian randomization analysis. *PLoS Med* 11:e1001713
502. Puglielli L, Ellis BC, Saunders AJ, Kovacs DM (2003) Ceramide stabilizes beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 and promotes amyloid beta-peptide biogenesis. *J Biol Chem* 278:19777-19783
503. Qian H, Kuang Y, Su J, Chen M, Chen X, Lv C, . . . Zhu W (2021a) Reductive Effect of Acitretin on Blood Glucose Levels in Chinese Patients With Psoriasis. *Front Med (Lausanne)* 8:764216
504. Qian XH, Song XX, Liu XL, Chen SD, Tang HD (2021b) Inflammatory pathways in Alzheimer's disease mediated by gut microbiota. *Ageing Res Rev* 68:101317
505. Qing H, Zhou W, Christensen MA, Sun X, Tong Y, Song W (2004) Degradation of BACE by the ubiquitin-proteasome pathway. *FASEB J* 18:1571-1573
506. Qiu C, Kivipelto M, von Strauss E (2009) Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues Clin Neurosci* 11:111-128
507. Qiu WQ, Ye Z, Kholodenko D, Seubert P, Selkoe DJ (1997) Degradation of amyloid beta-protein by a metalloprotease secreted by microglia and other neural and non-neural cells. *J Biol Chem* 272:6641-6646
508. Qiu WQ, Walsh DM, Ye Z, Vekrellis K, Zhang J, Podlisny MB, . . . Selkoe DJ (1998) Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. *J Biol Chem* 273:32730-32738
509. Qiu WQ, Folstein MF (2006) Insulin, insulin-degrading enzyme and amyloid-beta peptide in Alzheimer's disease: review and hypothesis. *Neurobiol Aging* 27:190-198
510. Quinn JF, Raman R, Thomas RG, Yurko-Mauro K, Nelson EB, Van Dyck C, . . . Aisen PS (2010) Docosahexaenoic acid supplementation and cognitive decline in Alzheimer disease: a randomized trial. *JAMA* 304:1903-1911
511. Rabinovici GD (2019) Late-onset Alzheimer Disease. *Continuum (Minneapolis)* 25:14-33
512. Raha S, Lee HJ, Yumnam S, Hong GE, Venkataram Gowda Saralamma V, Ha YL, . . . Kim GS (2016) Vitamin D2 suppresses amyloid-beta 25-35 induced microglial activation in BV2 cells by blocking the NF-kappaB inflammatory signaling pathway. *Life Sci* 161:37-44
513. Ramesh G, Jarzembowski L, Schwarz Y, Poth V, Konrad M, Knapp ML, . . . Niemeyer BA (2021) A short isoform of STIM1 confers frequency-dependent synaptic enhancement. *Cell Rep* 34:108844
514. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F (2013) Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* 8:2281-2308
515. Rangachari V, Dean DN, Rana P, Vaidya A, Ghosh P (2018) Cause and consequence of A β - Lipid interactions in Alzheimer disease pathogenesis. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1860:1652-1662
516. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N (2008) Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* 22:659-661
517. Record M, Carayon K, Poirot M, Silvente-Poirot S (2014) Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiological processes. *Biochim Biophys Acta* 1841:108-120
518. Refolo LM, Malester B, LaFrancois J, Bryant-Thomas T, Wang R, Tint GS, . . . Pappolla MA (2000) Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol Dis* 7:321-331
519. Refolo LM, Pappolla MA, LaFrancois J, Malester B, Schmidt SD, Thomas-Bryant T, . . . Duff KE (2001) A cholesterol-lowering drug reduces beta-amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 8:890-899
520. Reitz C, Cheng R, Schupf N, Lee JH, Mehta PD, Rogaeva E, . . . Mayeux R (2012) Association between variants in IDE-KIF11-HHEX and plasma amyloid beta levels. *Neurobiol Aging* 33:199 e113-197

521. Reitz C, Mayeux R (2014) Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochem Pharmacol* 88:640-651
522. Rezaei S, Tabrizi R, Nowrouzi-Sohrabi P, Jalali M, Shabani-Borujeni M, Modaresi S, . . . Doaei S (2021) The Effects of Vitamin D Supplementation on Anthropometric and Biochemical Indices in Patients With Non-alcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *Front Pharmacol* 12:732496
523. Ricca C, Aillon A, Bergandi L, Alotto D, Castagnoli C, Silvagno F (2018) Vitamin D Receptor Is Necessary for Mitochondrial Function and Cell Health. *Int J Mol Sci* 19
524. Riepe MW, Adler G, Ibach B, Weinkauff B, Gunay I, Tracik F (2006) Adding memantine to rivastigmine therapy in patients with mild-to-moderate alzheimer's disease: results of a 12-week, open-label pilot study. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry* 8:258-263
525. Ring S, Weyer SW, Kilian SB, Waldron E, Pietrzik CU, Filippov MA, . . . Muller UC (2007) The secreted beta-amyloid precursor protein ectodomain APPs alpha is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice. *J Neurosci* 27:7817-7826
526. Robinson A, Grosgen S, Mett J, Zimmer VC, Hauptenthal VJ, Hundsdorfer B, . . . Grimm MO (2014) Upregulation of PGC-1alpha expression by Alzheimer's disease-associated pathway: presenilin 1/amyloid precursor protein (APP)/intracellular domain of APP. *Aging Cell* 13:263-272
527. Roe DS, Roe CR, Brivet M, Sweetman L (2000) Evidence for a short-chain carnitine-acylcarnitine translocase in mitochondria specifically related to the metabolism of branched-chain amino acids. *Mol Genet Metab* 69:69-75
528. Rogers SL, Friedhoff LT (1996) The efficacy and safety of donepezil in patients with Alzheimer's disease: results of a US Multicentre, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. The Donepezil Study Group. *Dementia* 7:293-303
529. Rohan de Silva HA, Jen A, Wickenden C, Jen LS, Wilkinson SL, Patel AJ (1997) Cell-specific expression of beta-amyloid precursor protein isoform mRNAs and proteins in neurons and astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res* 47:147-156
530. Rosales Jubal E, Schwalm M, Dos Santos Guilherme M, Schuck F, Reinhardt S, Tose A, . . . Stroh A (2021) Acitretin reverses early functional network degradation in a mouse model of familial Alzheimer's disease. *Sci Rep* 11:6649
531. Ross BM, Moszczynska A, Erlich J, Kish SJ (1998) Phospholipid-metabolizing enzymes in Alzheimer's disease: increased lysophospholipid acyltransferase activity and decreased phospholipase A2 activity. *J Neurochem* 70:786-793
532. Ross IL, Marais AD (2014) The influence of glucocorticoids on lipid and lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *S Afr Med J* 104:671-674
533. Ross RA, Spengler BA, Biedler JL (1983) Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J Natl Cancer Inst* 71:741-747
534. Rothhaar TL, Grosgen S, Hauptenthal VJ, Burg VK, Hundsdorfer B, Mett J, . . . Grimm MO (2012) Plasmalogens inhibit APP processing by directly affecting gamma-secretase activity in Alzheimer's disease. *ScientificWorldJournal* 2012:141240
535. Rucker J, Paul J, Pfeifer BA, Lee K (2013) Engineering E. coli for triglyceride accumulation through native and heterologous metabolic reactions. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:2753-2759
536. Russ TC, Gatz M, Pedersen NL, Hannah J, Wyper G, Batty GD, . . . Starr JM (2015) Geographical variation in dementia: examining the role of environmental factors in Sweden and Scotland. *Epidemiology* 26:263-270
537. Russ TC, Murianni L, Icaza G, Slachevsky A, Starr JM (2016) Geographical Variation in Dementia Mortality in Italy, New Zealand, and Chile: The Impact of Latitude, Vitamin D, and Air Pollution. *Dement Geriatr Cogn Disord* 42:31-41
538. Ryan ZC, Craig TA, Folmes CD, Wang X, Lanza IR, Schaible NS, . . . Kumar R (2016) 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 Regulates Mitochondrial Oxygen Consumption and Dynamics in Human Skeletal Muscle Cells. *J Biol Chem* 291:1514-1528
539. Saido T, Leissring MA (2012) Proteolytic degradation of amyloid beta-protein. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a006379
540. Sambra V, Echeverria F, Valenzuela A, Chouinard-Watkins R, Valenzuela R (2021) Docosahexaenoic and Arachidonic Acids as Neuroprotective Nutrients throughout the Life Cycle. *Nutrients* 13
541. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: A laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbour Press

542. Sanchez-Mejia RO, Newman JW, Toh S, Yu GQ, Zhou Y, Halabisky B, . . . Mucke L (2008) Phospholipase A2 reduction ameliorates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* 11:1311-1318
543. Sanchez-Mejia RO, Mucke L (2010) Phospholipase A2 and arachidonic acid in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1801:784-790
544. Sappino AP, Madani R, Huarte J, Belin D, Kiss JZ, Wohlwend A, Vassalli JD (1993) Extracellular proteolysis in the adult murine brain. *J Clin Invest* 92:679-685
545. Sastry PS (1985) Lipids of nervous tissue: composition and metabolism. *Prog Lipid Res* 24:69-176
546. Schachter M (2005) Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundam Clin Pharmacol* 19:117-125
547. Schaefer EJ, Bongard V, Beiser AS, Lamon-Fava S, Robins SJ, Au R, . . . Wolf PA (2006) Plasma phosphatidylcholine docosahexaenoic acid content and risk of dementia and Alzheimer disease: the Framingham Heart Study. *Arch Neurol* 63:1545-1550
548. Schagger H, von Jagow G (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166:368-379
549. Schengrund CL (2010) Lipid rafts: keys to neurodegeneration. *Brain Res Bull* 82:7-17
550. Schmitz G, Langmann T (2001) Structure, function and regulation of the ABC1 gene product. *Curr Opin Lipidol* 12:129-140
551. Schmucker DL (2005) Age-related changes in liver structure and function: Implications for disease? *Exp Gerontol* 40:650-659
552. Schrul B, Kopito RR (2016) Peroxin-dependent targeting of a lipid-droplet-destined membrane protein to ER subdomains. *Nat Cell Biol* 18:740-751
553. Schubert D, Soucek T, Blouw B (2009) The induction of HIF-1 reduces astrocyte activation by amyloid beta peptide. *Eur J Neurosci* 29:1323-1334
554. Sebastiao AM, Colino-Oliveira M, Assaife-Lopes N, Dias RB, Ribeiro JA (2013) Lipid rafts, synaptic transmission and plasticity: impact in age-related neurodegenerative diseases. *Neuropharmacology* 64:97-107
555. Selkoe DJ, Hardy J (2016) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med* 8:595-608
556. Senanayake V, Goodenowe DB (2019) Plasmalogen deficiency and neuropathology in Alzheimer's disease: Causation or coincidence? *Alzheimers Dement (N Y)* 5:524-532
557. Sezgin E, Levental I, Mayor S, Eggeling C (2017) The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18:361-374
558. Sha S, Xing XN, Wang T, Li Y, Zhang RW, Shen XL, . . . Qu L (2022) DNA vaccines targeting amyloid-beta oligomer ameliorate cognitive deficits of aged APP/PS1/tau triple-transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Neural Regen Res* 17:2305-2310
559. Shankar VN, Dilworth FJ, Makin HL, Schroeder NJ, Trafford DJ, Kissmeyer AM, . . . Jones G (1997) Metabolism of the vitamin D analog EB1089 by cultured human cells: redirection of hydroxylation site to distal carbons of the side-chain. *Biochem Pharmacol* 53:783-793
560. Sheikh AM, Michikawa M, Kim SU, Nagai A (2015) Lysophosphatidylcholine increases the neurotoxicity of Alzheimer's amyloid beta1-42 peptide: role of oligomer formation. *Neuroscience* 292:159-169
561. Shen L, Ji HF (2015) Vitamin D deficiency is associated with increased risk of Alzheimer's disease and dementia: evidence from meta-analysis. *Nutr J* 14:76
562. Shendelman S, Jonason A, Martinat C, Leete T, Abeliovich A (2004) DJ-1 is a redox-dependent molecular chaperone that inhibits alpha-synuclein aggregate formation. *PLoS Biol* 2:e362
563. Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, . . . St George-Hyslop PH (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375:754-760
564. Shippy DC, Watters JJ, Ulland TK (2022) Transcriptional response of murine microglia in Alzheimer's disease and inflammation. *BMC Genomics* 23:183
565. Shirotani K, Edbauer D, Prokop S, Haass C, Steiner H (2004) Identification of distinct gamma-secretase complexes with different APH-1 variants. *J Biol Chem* 279:41340-41345
566. Shui G, Stebbins JW, Lam BD, Cheong WF, Lam SM, Gregoire F, . . . Wenk MR (2011) Comparative plasma lipidome between human and cynomolgus monkey: are plasma polar lipids good biomarkers for diabetic monkeys? *PLoS One* 6:e19731

567. Silva MC, Furlanetto TW (2018) Intestinal absorption of vitamin D: a systematic review. *Nutr Rev* 76:60-76
568. Silva MVF, Loures CMG, Alves LCV, de Souza LC, Borges KBG, Carvalho MDG (2019) Alzheimer's disease: risk factors and potentially protective measures. *J Biomed Sci* 26:33
569. Simons M, Keller P, De Strooper B, Beyreuther K, Dotti CG, Simons K (1998) Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6460-6464
570. Sinha S, Anderson JP, Barbour R, Basi GS, Caccavello R, Davis D, . . . John V (1999) Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* 402:537-540
571. Siskind LJ (2005) Mitochondrial ceramide and the induction of apoptosis. *J Bioenerg Biomembr* 37:143-153
572. Skotland T, Hessvik NP, Sandvig K, Llorente A (2019) Exosomal lipid composition and the role of ether lipids and phosphoinositides in exosome biology. *J Lipid Res* 60:9-18
573. Slanzi A, Iannoto G, Rossi B, Zenaro E, Constantin G (2020) In vitro Models of Neurodegenerative Diseases. *Front Cell Dev Biol* 8:328
574. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, . . . Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76-85
575. Snowden SG, Ebshiana AA, Hye A, An Y, Pletnikova O, O'Brien R, . . . Thambisetty M (2017) Association between fatty acid metabolism in the brain and Alzheimer disease neuropathology and cognitive performance: A nontargeted metabolomic study. *PLoS Med* 14:e1002266
576. Soares JZ, Valeur J, Saltyte Benth J, Knapskog AB, Selbaek G, Arefi G, . . . Pettersen R (2022) Vitamin D in Alzheimer's Disease: Low Levels in Cerebrospinal Fluid Despite Normal Amounts in Serum. *J Alzheimers Dis* 86:1301-1314
577. Soderberg M, Edlund C, Kristensson K, Dallner G (1991) Fatty acid composition of brain phospholipids in aging and in Alzheimer's disease. *Lipids* 26:421-425
578. Soderberg M, Edlund C, Alafuzoff I, Kristensson K, Dallner G (1992) Lipid composition in different regions of the brain in Alzheimer's disease/senile dementia of Alzheimer's type. *J Neurochem* 59:1646-1653
579. Song ES, Rodgers DW, Hersh LB (2018) Insulin-degrading enzyme is not secreted from cultured cells. *Sci Rep* 8:2335
580. Song T, Song X, Zhu C, Patrick R, Skurla M, Santangelo I, . . . Du F (2021a) Mitochondrial dysfunction, oxidative stress, neuroinflammation, and metabolic alterations in the progression of Alzheimer's disease: A meta-analysis of in vivo magnetic resonance spectroscopy studies. *Ageing Res Rev* 72:101503
581. Song Y, Liu J, Zhao K, Gao L, Zhao J (2021b) Cholesterol-induced toxicity: An integrated view of the role of cholesterol in multiple diseases. *Cell Metab* 33:1911-1925
582. Sousa L, Guarda M, Meneses MJ, Macedo MP, Vicente Miranda H (2021) Insulin-degrading enzyme: an ally against metabolic and neurodegenerative diseases. *J Pathol* 255:346-361
583. Spector R (1988) Fatty acid transport through the blood-brain barrier. *J Neurochem* 50:639-643
584. Sperling RA, Donohue MC, Raman R, Sun CK, Yaari R, Holdridge K, . . . Team AS (2020) Association of Factors With Elevated Amyloid Burden in Clinically Normal Older Individuals. *JAMA Neurol* 77:735-745
585. Spruance SL, Reid JE, Grace M, Samore M (2004) Hazard ratio in clinical trials. *Antimicrob Agents Chemother* 48:2787-2792
586. Stadelmann-Ingand S, Favreliere S, Fauconneau B, Mauco G, Tallineau C (2001) Plasmalogen degradation by oxidative stress: production and disappearance of specific fatty aldehydes and fatty alpha-hydroxyaldehydes. *Free Radic Biol Med* 31:1263-1271
587. Stahlmann CP (2018) Der Einfluss der Intrazellulären Domäne von APP auf die Lipidhomöostase und der Einfluss von Vitamin E auf die APP-Prozessierung. Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes
588. Stahnke H, Kittlaus S, Kempe G, Alder L (2012) Reduction of matrix effects in liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry by dilution of the sample extracts: how much dilution is needed? *Anal Chem* 84:1474-1482
589. Stargardt A, Gillis J, Kamphuis W, Wiemhoefer A, Kooijman L, Raspe M, . . . Reits E (2013) Reduced amyloid-beta degradation in early Alzheimer's disease but not in the APPswePS1dE9 and 3xTg-AD mouse models. *Aging Cell* 12:499-507
590. Staurengi E, Giannelli S, Testa G, Sottero B, Leonarduzzi G, Gamba P (2021) Cholesterol Dysmetabolism in Alzheimer's Disease: A Starring Role for Astrocytes? *Antioxidants (Basel)* 10

591. Stiller MJ, Pak GH, Kenny C, Jondreau L, Davis I, Wachsmann S, Shupack JL (1992) Elevation of fasting serum lipids in patients treated with low-dose cyclosporine for severe plaque-type psoriasis. An assessment of clinical significance when viewed as a risk factor for cardiovascular disease. *J Am Acad Dermatol* 27:434-438
592. Stokes CE, Hawthorne JN (1987) Reduced phosphoinositide concentrations in anterior temporal cortex of Alzheimer-diseased brains. *J Neurochem* 48:1018-1021
593. Studzinski CM, MacKay WA, Beckett TL, Henderson ST, Murphy MP, Sullivan PG, Burnham WM (2008) Induction of ketosis may improve mitochondrial function and decrease steady-state amyloid-beta precursor protein (APP) levels in the aged dog. *Brain Res* 1226:209-217
594. Su XQ, Wang J, Sinclair AJ (2019) Plasmalogens and Alzheimer's disease: a review. *Lipids Health Dis* 18:100
595. Sultan S, Taimuri U, Basnan SA, Ai-Orabi WK, Awadallah A, Almowald F, Hazazi A (2020) Low Vitamin D and Its Association with Cognitive Impairment and Dementia. *J Aging Res* 2020:6097820
596. Sultana R, Perluigi M, Butterfield DA (2013) Lipid peroxidation triggers neurodegeneration: a redox proteomics view into the Alzheimer disease brain. *Free Radic Biol Med* 62:157-169
597. Sun ZX, Zhou QH, Sui SF (2005) Cholesterol depletion inhibits the degradation of amyloid beta-peptide in rat pheochromocytoma (PC12) cells. *Neurosci Lett* 391:71-75
598. Sung PS, Lin PY, Liu CH, Su HC, Tsai KJ (2020) Neuroinflammation and Neurogenesis in Alzheimer's Disease and Potential Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci* 21
599. Sutherland MK, Somerville MJ, Yoong LK, Bergeron C, Haussler MR, McLachlan DR (1992) Reduction of vitamin D hormone receptor mRNA levels in Alzheimer as compared to Huntington hippocampus: correlation with calbindin-28k mRNA levels. *Brain Res Mol Brain Res* 13:239-250
600. Svedberg J, Stromblad G, Wirth A, Smith U, Bjorntorp P (1991) Fatty acids in the portal vein of the rat regulate hepatic insulin clearance. *J Clin Invest* 88:2054-2058
601. Swanson D, Block R, Mousa SA (2012) Omega-3 fatty acids EPA and DHA: health benefits throughout life. *Adv Nutr* 3:1-7
602. Swomley AM, Forster S, Keeney JT, Triplett J, Zhang Z, Sultana R, Butterfield DA (2014) Aβ, oxidative stress in Alzheimer disease: evidence based on proteomics studies. *Biochim Biophys Acta* 1842:1248-1257
603. Takahashi K, Niidome T, Akaike A, Kihara T, Sugimoto H (2009) Amyloid precursor protein promotes endoplasmic reticulum stress-induced cell death via C/EBP homologous protein-mediated pathway. *J Neurochem* 109:1324-1337
604. Takami M, Nagashima Y, Sano Y, Ishihara S, Morishima-Kawashima M, Funamoto S, Ihara Y (2009) γ-Secretase: successive tripeptide and tetrapeptide release from the transmembrane domain of beta-carboxyl terminal fragment. *J Neurosci* 29:13042-13052
605. Takasugi N, Tomita T, Hayashi I, Tsuruoka M, Niimura M, Takahashi Y, . . . Iwatsubo T (2003) The role of presenilin cofactors in the γ-secretase complex. *Nature* 422:438-441
606. Takenawa T, Suetsugu S (2007) The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:37-48
607. Tamaki C, Ohtsuki S, Terasaki T (2007) Insulin facilitates the hepatic clearance of plasma amyloid beta-peptide (1-40) by intracellular translocation of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1) to the plasma membrane in hepatocytes. *Mol Pharmacol* 72:850-855
608. Tamboli IY, Barth E, Christian L, Siepmann M, Kumar S, Singh S, . . . Walter J (2010) Statins promote the degradation of extracellular amyloid {β}-peptide by microglia via stimulation of exosome-associated insulin-degrading enzyme (IDE) secretion. *J Biol Chem* 285:37405-37414
609. Tan AU, Jr., Levine BS, Mazess RB, Kyllö DM, Bishop CW, Knutson JC, . . . Coburn JW (1997) Effective suppression of parathyroid hormone by 1 α-hydroxy-vitamin D₂ in hemodialysis patients with moderate to severe secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int* 51:317-323
610. Tan JL, Eastment JG, Poudel A, Hubbard RE (2015) Age-Related Changes in Hepatic Function: An Update on Implications for Drug Therapy. *Drugs Aging* 32:999-1008
611. Tarasoff-Conway JM, Carare RO, Osorio RS, Glodzik L, Butler T, Fieremans E, . . . de Leon MJ (2015) Clearance systems in the brain-implications for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 11:457-470
612. Tecalco-Cruz AC, Pedraza-Chaverri J, Briones-Herrera A, Cruz-Ramos E, Lopez-Canovas L, Zepeda-Cervantes J (2022) Protein degradation-associated mechanisms that are affected in Alzheimer's disease. *Mol Cell Biochem* 477:915-925
613. Thinakaran G, Slunt HH, Spitzer L, Lee MK, Sisodia SS (1995) Tissue distribution and developmental expression of the amyloid precursor protein homolog, APLP1. *SocNeurosciAbstr* 21

614. Thompson GR, Lewis B, Booth CC (1966) Absorption of vitamin D₃-³H in control subjects and patients with intestinal malabsorption. *J Clin Invest* 45:94-102
615. Thompson VW, Deluca HF (1964) Vitamin D and Phospholipid Metabolism. *J Biol Chem* 239:984-989
616. Tippmann F, Hundt J, Schneider A, Endres K, Fahrenholz F (2009) Up-regulation of the alpha-secretase ADAM10 by retinoic acid receptors and acitretin. *FASEB J* 23:1643-1654
617. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4350-4354
618. Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L, Wenzel D, Wieland F, . . . Simons M (2008) Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* 319:1244-1247
619. Troesch B, Eggersdorfer M, Laviano A, Rolland Y, Smith AD, Warnke I, . . . Calder PC (2020) Expert Opinion on Benefits of Long-Chain Omega-3 Fatty Acids (DHA and EPA) in Aging and Clinical Nutrition. *Nutrients* 12
620. Tseng BP, Green KN, Chan JL, Blurton-Jones M, LaFerla FM (2008) Abeta inhibits the proteasome and enhances amyloid and tau accumulation. *Neurobiol Aging* 29:1607-1618
621. Tsigelny IF, Crews L, Desplats P, Shaked GM, Sharikov Y, Mizuno H, . . . Masliah E (2008) Mechanisms of hybrid oligomer formation in the pathogenesis of combined Alzheimer's and Parkinson's diseases. *PLoS One* 3:e3135
622. Tsutsumi M, Alvarez U, Avioli LV, Hruska KA (1985) Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on phospholipid composition of rat renal brush border membrane. *Am J Physiol* 249:F117-123
623. Tsyupko AN, Dudnik LB, Evstigneeva RP, Alessenko AV (2001) Effects of reduced and oxidized glutathione on sphingomyelinase activity and contents of sphingomyelin and lipid peroxidation products in murine liver. *Biochemistry (Mosc)* 66:1028-1034
624. Tucker HM, Kihiko M, Caldwell JN, Wright S, Kawarabayashi T, Price D, . . . Estus S (2000) The plasmin system is induced by and degrades amyloid-beta aggregates. *J Neurosci* 20:3937-3946
625. Tully AM, Roche HM, Doyle R, Fallon C, Bruce I, Lawlor B, . . . Gibney MJ (2003) Low serum cholesteryl ester-docosahexaenoic acid levels in Alzheimer's disease: a case-control study. *Br J Nutr* 89:483-489
626. Tundo GR, Sbardella D, Ciaccio C, Grasso G, Gioia M, Coletta A, . . . Coletta M (2017) Multiple functions of insulin-degrading enzyme: a metabolic crosslight? *Crit Rev Biochem Mol Biol* 52:554-582
627. Tuohimaa P, Wang JH, Khan S, Kuuslahti M, Qian K, Manninen T, . . . Lou YR (2013) Gene expression profiles in human and mouse primary cells provide new insights into the differential actions of vitamin D₃ metabolites. *PLoS One* 8:e75338
628. Umeda T, Tomiyama T, Sakama N, Tanaka S, Lambert MP, Klein WL, Mori H (2011) Intraneuronal amyloid beta oligomers cause cell death via endoplasmic reticulum stress, endosomal/lysosomal leakage, and mitochondrial dysfunction in vivo. *J Neurosci Res* 89:1031-1042
629. Usategui-Martin R, De Luis-Roman DA, Fernandez-Gomez JM, Ruiz-Mambrilla M, Perez-Castrillon JL (2022) Vitamin D Receptor (VDR) Gene Polymorphisms Modify the Response to Vitamin D Supplementation: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients* 14
630. Vahlquist C, Selinus I, Vessby B (1988) Serum lipid changes during acitretin (etretin) treatment of psoriasis and palmo-plantar pustulosis. *Acta Derm Venereol* 68:300-305
631. van der Meijden K, Bravenboer N, Dirks NF, Heijboer AC, den Heijer M, de Wit GM, . . . Jaspers RT (2016) Effects of 1,25(OH)₂ D₃ and 25(OH)D₃ on C2C12 Myoblast Proliferation, Differentiation, and Myotube Hypertrophy. *J Cell Physiol* 231:2517-2528
632. van der Schaft J, Koek HL, Dijkstra E, Verhaar HJ, van der Schouw YT, Emmelot-Vonk MH (2013) The association between vitamin D and cognition: a systematic review. *Ageing Res Rev* 12:1013-1023
633. van Echten-Deckert G, Herget T (2006) Sphingolipid metabolism in neural cells. *Biochim Biophys Acta* 1758:1978-1994
634. Vance JE, Hayashi H, Karten B (2005) Cholesterol homeostasis in neurons and glial cells. *Semin Cell Dev Biol* 16:193-212
635. Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, . . . Citron M (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286:735-741

636. Vastiau IM, Anthonio EA, Brams M, Brees C, Young SG, Van de Velde S, . . . Fransen M (2006) Farnesylation of Pex19p is not essential for peroxisome biogenesis in yeast and mammalian cells. *Cell Mol Life Sci* 63:1686-1699
637. Vekrellis K, Ye Z, Qiu WQ, Walsh D, Hartley D, Chesneau V, . . . Selkoe DJ (2000) Neurons regulate extracellular levels of amyloid beta-protein via proteolysis by insulin-degrading enzyme. *J Neurosci* 20:1657-1665
638. Vetter TR (2017) Fundamentals of Research Data and Variables: The Devil Is in the Details. *Anesth Analg* 125:1375-1380
639. Vieth R (2011) Why the minimum desirable serum 25-hydroxyvitamin D level should be 75 nmol/L (30 ng/ml). *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 25:681-691
640. von Rotz RC, Kohli BM, Bosset J, Meier M, Suzuki T, Nitsch RM, Konietzko U (2004) The APP intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor. *J Cell Sci* 117:4435-4448
641. Wahrle S, Das P, Nyborg AC, McLendon C, Shoji M, Kawarabayashi T, . . . Golde TE (2002) Cholesterol-dependent gamma-secretase activity in buoyant cholesterol-rich membrane microdomains. *Neurobiol Dis* 9:11-23
642. Wanders RJ, Waterham HR, Ferdinandusse S (2015) Metabolic Interplay between Peroxisomes and Other Subcellular Organelles Including Mitochondria and the Endoplasmic Reticulum. *Front Cell Dev Biol* 3:83
643. Wang S, Wang R, Chen L, Bennett DA, Dickson DW, Wang DS (2010) Expression and functional profiling of neprilysin, insulin-degrading enzyme, and endothelin-converting enzyme in prospectively studied elderly and Alzheimer's brain. *J Neurochem* 115:47-57
644. Wang S, He F, Wang Y (2015) Association between polymorphisms of the insulin-degrading enzyme gene and late-onset Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 28:94-98
645. Wang W, Zhao F, Ma X, Perry G, Zhu X (2020a) Mitochondria dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease: recent advances. *Mol Neurodegener* 15:30
646. Wang W, Zhu N, Yan T, Shi YN, Chen J, Zhang CJ, . . . Qin L (2020b) The crosstalk: exosomes and lipid metabolism. *Cell Commun Signal* 18:119
647. Wang Y, Si S, Liu J, Wang Z, Jia H, Feng K, . . . Song SJ (2016) The Associations of Serum Lipids with Vitamin D Status. *PLoS One* 11:e0165157
648. Ward A, Tardiff S, Dye C, Arrighi HM (2013) Rate of conversion from prodromal Alzheimer's disease to Alzheimer's dementia: a systematic review of the literature. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra* 3:320-332
649. Webb AR, DeCosta BR, Holick MF (1989) Sunlight regulates the cutaneous production of vitamin D3 by causing its photodegradation. *J Clin Endocrinol Metab* 68:882-887
650. Wells K, Farooqui AA, Liss L, Horrocks LA (1995) Neural membrane phospholipids in Alzheimer disease. *Neurochem Res* 20:1329-1333
651. Whiley L, Sen A, Heaton J, Proitsi P, Garcia-Gomez D, Leung R, . . . AddNeuroMed C (2014) Evidence of altered phosphatidylcholine metabolism in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 35:271-278
652. Wilfling F, Wang H, Haas JT, Kraemer N, Gould TJ, Uchida A, . . . Walther TC (2013) Triacylglycerol synthesis enzymes mediate lipid droplet growth by relocating from the ER to lipid droplets. *Dev Cell* 24:384-399
653. Wisniewski T, Drummond E (2016) Developing therapeutic vaccines against Alzheimer's disease. *Expert Rev Vaccines* 15:401-415
654. Wolfe MS, Xia W, Ostaszewski BL, Diehl TS, Kimberly WT, Selkoe DJ (1999) Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* 398:513-517
655. Wolfe MS (2020) Substrate recognition and processing by gamma-secretase. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1862:183016
656. Woloszynowska-Fraser MU, Kouchmeshky A, McCaffery P (2020) Vitamin A and Retinoic Acid in Cognition and Cognitive Disease. *Annu Rev Nutr* 40:247-272
657. Wood PL, Barnette BL, Kaye JA, Quinn JF, Woltjer RL (2015) Non-targeted lipidomics of CSF and frontal cortex grey and white matter in control, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease subjects. *Acta Neuropsychiatr* 27:270-278
658. Wu H, Mach J, Gnjidic D, Naganathan V, Blyth FM, Waite LM, . . . Hilmer SN (2022) Comparing Effects of Polypharmacy on Inflammatory Profiles in Older Adults and Mice: Implications for Translational Aging Research. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 77:1295-1303

659. Wu YT, Lee HY, Norton S, Chen C, Chen H, He C, . . . Brayne C (2013) Prevalence studies of dementia in mainland china, Hong Kong and taiwan: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 8:e66252
660. Wu-Wong JR, Nakane M, Gagne GD, Brooks KA, Noonan WT (2010) Comparison of the pharmacological effects of paricalcitol and doxercalciferol on the factors involved in mineral homeostasis. *Int J Endocrinol* 2010:621687
661. Xiang Y, Fu L, Xiang HX, Zheng L, Tan ZX, Wang LX, . . . Zhao H (2021) Correlations among Pulmonary DJ-1, VDR and Nrf-2 in patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Case-control Study. *Int J Med Sci* 18:2449-2456
662. Xicoy H, Wieringa B, Martens GJ (2017) The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Mol Neurodegener* 12:10
663. Xu PT, Li YJ, Qin XJ, Kroner C, Green-Odlum A, Xu H, . . . Gilbert JR (2007) A SAGE study of apolipoprotein E3/3, E3/4 and E4/4 allele-specific gene expression in hippocampus in Alzheimer disease. *Mol Cell Neurosci* 36:313-331
664. Xu X, Zhou H, Boyer TG (2011) Mediator is a transducer of amyloid-precursor-protein-dependent nuclear signalling. *EMBO Rep* 12:216-222
665. Xu X, Su L, Gao Y, Ding Y (2017) The Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Related Metabolic Comorbidities Was Associated with Age at Onset of Moderate to Severe Plaque Psoriasis: A Cross-Sectional Study. *PLoS One* 12:e0169952
666. Yamada T, Sasaki H, Furuya H, Miyata T, Goto I, Sakaki Y (1987) Complementary DNA for the mouse homolog of the human amyloid beta protein precursor. *Biochem Biophys Res Commun* 149:665-671
667. Yang WS, Kim HW, Lee JM, Han NJ, Lee MJ, Park SK (2015) 1,25-dihydroxyvitamin D3 causes ADAM10-dependent ectodomain shedding of tumor necrosis factor receptor 1 in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 87:533-542
668. Yang X, Sheng W, Sun GY, Lee JC (2011) Effects of fatty acid unsaturation numbers on membrane fluidity and alpha-secretase-dependent amyloid precursor protein processing. *Neurochem Int* 58:321-329
669. Yang X, Sun GY, Eckert GP, Lee JC (2014) Cellular membrane fluidity in amyloid precursor protein processing. *Mol Neurobiol* 50:119-129
670. Yassine HN, Feng Q, Chiang J, Petrosspour LM, Fonteh AN, Chui HC, Harrington MG (2016) ABCA1-Mediated Cholesterol Efflux Capacity to Cerebrospinal Fluid Is Reduced in Patients With Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. *J Am Heart Assoc* 5
671. Ye J, DeBose-Boyd RA (2011) Regulation of cholesterol and fatty acid synthesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3
672. Ye J (2020) Transcription factors activated through RIP (regulated intramembrane proteolysis) and RAT (regulated alternative translocation). *J Biol Chem* 295:10271-10280
673. Yin F (2022) Lipid metabolism and Alzheimer's disease: clinical evidence, mechanistic link and therapeutic promise. *FEBS J*
674. Yin K, Agrawal DK (2014) Vitamin D and inflammatory diseases. *J Inflamm Res* 7:69-87
675. Yoshino Y, Mori T, Yoshida T, Yamazaki K, Ozaki Y, Sao T, . . . Ueno SI (2016) Elevated mRNA Expression and Low Methylation of SNCA in Japanese Alzheimer's Disease Subjects. *J Alzheimers Dis* 54:1349-1357
676. Young C, Gean PW, Chiou LC, Shen YZ (2000) Docosahexaenoic acid inhibits synaptic transmission and epileptiform activity in the rat hippocampus. *Synapse* 37:90-94
677. Yu J, Gattoni-Celli M, Zhu H, Bhat NR, Sambamurti K, Gattoni-Celli S, Kindy MS (2011) Vitamin D3-enriched diet correlates with a decrease of amyloid plaques in the brain of AbetaPP transgenic mice. *J Alzheimers Dis* 25:295-307
678. Yu Y, Li X, Blanchard J, Li Y, Iqbal K, Liu F, Gong CX (2015) Insulin sensitizers improve learning and attenuate tau hyperphosphorylation and neuroinflammation in 3xTg-AD mice. *J Neural Transm (Vienna)* 122:593-606
679. Zahednasab H, Balood M, Harirchian MH, Mesbah-Namin SA, Rahimian N, Siroos B (2014) Increased autotaxin activity in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 273:120-123
680. Zaloga GP (2021) Narrative Review of n-3 Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation upon Immune Functions, Resolution Molecules and Lipid Peroxidation. *Nutrients* 13
681. Zhang D, Li M, Dong Y, Zhang X, Liu X, Chen Z, . . . Shen Y (2017a) 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 up-regulates IL-34 expression in SH-SY5Y neural cells. *Innate Immun* 23:584-591

682. Zhang H, Liu D, Wang Y, Huang H, Zhao Y, Zhou H (2017b) Meta-analysis of expression and function of neprilysin in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 657:69-76
683. Zhang J, Liu Q (2015) Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain. *Protein Cell* 6:254-264
684. Zhang M, Deng Y, Luo Y, Zhang S, Zou H, Cai F, . . . Song W (2012) Control of BACE1 degradation and APP processing by ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1. *J Neurochem* 120:1129-1138
685. Zhang S, Wang D, Huang J, Hu Y, Xu Y (2020) Application of capsaicin as a potential new therapeutic drug in human cancers. *J Clin Pharm Ther* 45:16-28
686. Zhang W, Yi J, Liu D, Wang Y, Jamilian P, Gaman MA, . . . Fan J (2022) The effect of vitamin D on the lipid profile as a risk factor for coronary heart disease in postmenopausal women: a meta-analysis and systematic review of randomized controlled trials. *Exp Gerontol* 161:111709
687. Zhang Y, Lee DH (2011) Sink hypothesis and therapeutic strategies for attenuating Abeta levels. *Neuroscientist* 17:163-173
688. Zhang YW, Thompson R, Zhang H, Xu H (2011) APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain* 4:3
689. Zhao J, Tan BK, Marcelis S, Verstuyf A, Bouillon R (1996) Enhancement of antiproliferative activity of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 (analog) by cytochrome P450 enzyme inhibitors is compound- and cell-type specific. *J Steroid Biochem Mol Biol* 57:197-202
690. Zhao J, Li L, Leissring MA (2009) Insulin-degrading enzyme is exported via an unconventional protein secretion pathway. *Mol Neurodegener* 4:4
691. Zhao Z, Xiang Z, Haroutunian V, Buxbaum JD, Stetka B, Pasinetti GM (2007) Insulin degrading enzyme activity selectively decreases in the hippocampal formation of cases at high risk to develop Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 28:824-830
692. Zhou LX, Nemere I, Norman AW (1992) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 analog structure-function assessment of the rapid stimulation of intestinal calcium absorption (transcaltachia). *J Bone Miner Res* 7:457-463
693. Zinser E (2009) Dissertation.
694. Zinser EG, Hartmann T, Grimm MO (2007) Amyloid beta-protein and lipid metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1768:1991-2001
695. Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F (2004) Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res* 32:e103
696. Zito PM, Mazzoni T (2022). Acitretin. In *StatPearls* (Treasure Island (FL)).
697. Zmijewski MA, Carlberg C (2020) Vitamin D receptor(s): In the nucleus but also at membranes? *Exp Dermatol* 29:876-884
698. Zoeller RA, Lake AC, Nagan N, Gaposchkin DP, Legner MA, Lieberthal W (1999) Plasmalogens as endogenous antioxidants: somatic cell mutants reveal the importance of the vinyl ether. *Biochem J* 338 (Pt 3):769-776
699. Zukunft S, Prehn C, Rohring C, Moller G, Hrabe de Angelis M, Adamski J, Tokarz J (2018) High-throughput extraction and quantification method for targeted metabolomics in murine tissues. *Metabolomics* 14:18
700. Zverova M (2019) Clinical aspects of Alzheimer's disease. *Clin Biochem* 72:3-6

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen danken, die mich in der Promotionsphase unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen voran ein großes Dankeschön an meinen Doktorvater Prof. Dr. Marcus Grimm, dessen Tür für meine Fragen immer offenstand und dessen Anregungen, Ideen und Diskussionen für diese Arbeit essenziell waren. Danke Marcus, dass du mir darüber hinaus Einblicke in die Aufgaben eines Laborleiters gegeben und mich das wissenschaftliche Arbeiten gelehrt hast. Danke für dein Vertrauen, mich mit immer neuen Aufgaben zu konfrontieren, an denen ich wachsen konnte.

Danke an Prof. Dr. Tobias Hartmann für die Möglichkeit, meine Arbeit in der Arbeitsgruppe Experimentelle Neurologie anfertigen zu können. Ich weiß deine stetige Unterstützung, dein Vertrauen sowie die einzigartigen Gelegenheiten an internationalen Kooperationen mitwirken zu dürfen zu schätzen.

Zudem möchte ich allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Experimentelle Neurologie für die schöne Zeit, die auch über den Laboralltag hinaus ging, danken. Es ist schön zu erleben, dass aus Teammitgliedern Freunde werden.

Ein besonders großer Dank gilt Dr. Heike Grimm dafür, dass ich ständig auf dich zählen konnte und du mir nicht nur hinsichtlich der Anfertigung von Manuskripten immer ein Vorbild bleiben wirst. Ein ausdrücklicher Dank an Daniel Janitschke für die immer verfügbare Hilfe bei (technischen) Problemen, die konstruktiven Diskussionen bei jeglichen Statistikfragen sowie die Gesellschaft während vielen Laborstunden. Dankeschön an Dr. Janine Mett und Dr. Christoph Stahlmann für die hervorragende Einarbeitung und die Wissensvermittlung, die mir den Einstieg in die Promotionsphase angenehm gestalteten. Ein besonderer Dank gilt Andrea Thiel und Manuel Bachmann für die vielen lustigen gemeinsamen Erinnerungen. Danke an Vincent Erhardt für das sorgfältige Korrekturlesen.

Ein herzliches Dankeschön an Dr. Vivien Becker, auf die ich mich immer verlassen kann und die mir seit Beginn unseres Bachelorstudiums uneingeschränkt zur Seite steht. Danke für deine Unterstützung, dein Verständnis, dein offenes Ohr, deine Tipps, deine psychologische Betreuung und diese einzigartige Freundschaft.

Abschließend richtet sich das größte Dankeschön an meine Familie! Besonders Johannes, Andrea und Dietmar danke ich dafür, dass ihr mir immer ermöglicht meine Ziele zu erreichen und mich dabei ohne Einschränkungen unterstützt und ermutigt. Danke, dass ihr mir jederzeit zur Seite steht. Felix, danke für alles!

9 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.