

# **Identifizierung und Charakterisierung neuartiger und spezifischer Liganden für das Alzheimer Amyloid- $\beta$ -Peptid (A $\beta$ )**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Yeliz Çınar**

aus Wesel

Düsseldorf, Oktober 2011

aus dem Institut für Physikalische Biologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Dieter Willbold  
Korreferent: Prof. Dr. Christine R. Rose

Tag der mündlichen Prüfung:

*Arif olu da vermeyen 'cahil'dir*  
(The one who is wise but does not share is ignorant)  
Hacı Bektaş Veli

*Meinen Eltern*



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>I</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1 DIE ALZHEIMERSCHE DEMENZ .....	1
1.1.1 <i>Die Pathogenese der Alzheimerschen Demenz</i> .....	1
1.1.1.1 Die Pathologie der Alzheimerschen Demenz .....	2
1.1.1.2 Prozessierung von APP zu A $\beta$ .....	3
1.1.1.3 Mutationsbedingte Veränderungen der APP-Prozessierung .....	4
1.1.1.4 Aggregation und Toxizität von A $\beta$ .....	4
1.1.1.5 Pyroglutamat-A $\beta$ .....	7
1.2 DIAGNOSE UND THERAPIE .....	9
1.2.1 <i>Diagnose</i> .....	9
1.2.2 <i>Therapie</i> .....	10
1.2.2.1 Therapie mit Peptiden .....	10
1.2.2.2 Immuntherapie .....	11
1.2.3 <i>Phagendisplektion von Peptiden für Therapie und Diagnose</i> .....	14
1.2.3.1 Spiegelbild-Phagendisplay zur Selektion von D-Peptiden .....	16
<b>2 ZIELSETZUNG</b> .....	<b>18</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>19</b>
3.1 MATERIAL .....	19
3.1.1 <i>Peptide und Peptidverbindungen</i> .....	19
3.1.2 <i>Puffer, Medien und Kits</i> .....	20
3.1.3 <i>Antikörper und Seren</i> .....	21
3.2 METHODEN .....	23
3.2.1 <i>Dynamische Lichtstreuung</i> .....	23
3.2.2 <i>Präparation und Charakterisierung von A<math>\beta</math>-Monomeren, -Oligomeren und -Fibrillen</i> .....	23
3.2.2.1 Gelfiltrationschromatographie von A $\beta$ -Monomeren und -Oligomeren .....	23
3.2.2.2 Präparation von Fibrillen .....	24
3.2.2.3 Proteinkonzentrationsbestimmung in A $\beta$ -Monomeren, -Oligomeren und -Fibrillen .....	24
3.2.2.4 Thioflavin T-Test mit A $\beta$ -Monomeren, -Oligomeren- und -Fibrillen .....	24
3.2.2.5 Dot-Blot mit A $\beta$ -Monomeren, -Oligomeren- und -Fibrillen .....	25
3.2.3 <i>Western-Blot mit A<math>\beta</math>-Monomeren, -Oligomeren- und -Fibrillen</i> .....	25
3.2.3.1 ELISA zur Detektion von A $\beta$ -Monomeren, -Oligomeren- und -Fibrillen .....	25
3.2.4 <i>Phagendisplay</i> .....	26
3.2.4.1 Präparation von verschiedenen Konformeren von Pyroglutamat-A $\beta$ .....	26
3.2.4.2 Präparation von A $\beta$ 1-42-Oligomeren .....	27
3.2.4.3 Durchführung der Selektionsrunden .....	27
3.2.4.4 Anreicherungs-ELISA .....	28
3.2.4.5 Einzelphagenamplifikation .....	28
3.2.5 <i>Einzelphagen-ELISA</i> .....	29
3.2.5.1 Einzelphagen-DNA Präparation .....	29
3.2.6 <i>Charakterisierung der selektierten D-Peptide</i> .....	30
3.2.6.1 Gegen Pyroglutamat-A $\beta$ selektierte D-Peptide .....	30
3.2.6.2 Gegen A $\beta$ 1-42-Oligomere selektierte D-Peptide .....	31
3.2.7 <i>ELISA mit Säugetierseren</i> .....	33

<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>34</b>
4.1	AGGREGATIONSANALYSE VON A $\beta$ -ISOFORMEN .....	34
4.2	PRÄPARATION UND CHARAKTERISIERUNG VON A $\beta$ -MONOMEREN, -OLIGOMEREN UND -FIBRILLEN .....	36
4.2.1	<i>Präparation von A<math>\beta</math>-Monomeren und -Oligomeren mittels Gelfiltrationschromatographie.....</i>	36
4.2.2	<i>Thioflavin T-Test zum Nachweis von A<math>\beta</math>-Fibrillen .....</i>	37
4.2.3	<i>Analyse von A<math>\beta</math>-Monomeren, -Oligomeren und -Fibrillen mit Dot-Blot und Western-Blot .....</i>	38
4.2.4	<i>ELISA-Detektion von A<math>\beta</math>-Monomeren, -Oligomeren und -Fibrillen .....</i>	40
4.3	QUANTIFIZIERUNG VON ANTI-A $\beta$ -ANTIKÖRPERTITERN IN SEREN VON DEMENZPATIENTEN .....	42
4.4	QUANTIFIZIERUNG VON ANTI-A $\beta$ -ANTIKÖRPERTITERN IN MURINEN SEREN NACH EINER AKTIVEN IMMUNOTHERAPIE MIT AFFITOPEN	46
4.5	D-PEPTIDE ALS POTENTIELLE DIAGNOSE- ODER THERAPIESUBSTANZ.....	49
4.5.1	<i>Pyroglutamat-A<math>\beta</math>-bindende D-Peptide als potentielle diagnostische Plaquesonden.....</i>	49
4.5.1.1	Phagendisplayselektion der D-Peptide D4, D5, D6 und D7 .....	49
4.5.1.2	Bestimmung des A $\beta$ -Bindepitops mittels PepSpot-Membran .....	55
4.5.1.3	<i>Ex vivo</i> -Plaquebindeigenschaften in transgenen Mäusen.....	56
4.5.2	<i>A<math>\beta</math>1-42-Oligomer bindende D-Peptide als potentielle Aggregationsinhibitoren .....</i>	59
4.5.2.1	Phagendisplayselektion der D-Peptide DO1, DO2 und DO3.....	59
4.5.2.2	<i>In vitro</i> -Bindeigenschaften der D-Peptide .....	63
4.5.2.3	Einfluss der D-Peptide auf die <i>in vitro</i> -Fibrillation von A $\beta$ 1-42.....	65
4.5.2.4	Einfluss von DO3 auf die Partikelgröße von A $\beta$ 1-42 .....	68
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>70</b>
5.1	VERGLEICH DER AGGREGATION VERSCHIEDENER A $\beta$ -ISOFORMEN .....	71
5.2	ETABLIERUNG EINER PRÄPARATION VON A $\beta$ -MONOMEREN, -OLIGOMEREN UND -FIBRILLEN FÜR <i>IN VITRO</i> -STUDIEN .....	73
5.3	A $\beta$ -ANTIKÖRPERAKTIVITÄT IN SEREN VON DEMENZPATIENTEN.....	75
5.4	AKTIVE IMMUNOTHERAPIE DER ALZHEIMERSCHEN DEMENZ MIT AFFITOPEN IN TRANSGENEN MÄUSEN .....	77
5.5	D-PEPTIDE ZUR DIAGNOSE DER ALZHEIMERSCHEN DEMENZ .....	80
5.6	D-PEPTIDE ZUR THERAPIE DER ALZHEIMERSCHEN DEMENZ .....	82
5.7	AUSBLICK .....	85
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>86</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>87</b>
	<b>ANHANG .....</b>	<b>88</b>
	SCHEMA DER PEPSPOT-MEMBRAN .....	88
	ELISA-BINDUNGSSTUDIEN VON D3 AN A $\beta$ 1-42-KONFORMERE .....	89
	PARTIKELDISTRIBUTION VON A $\beta$ 1-42 IN GEGENWART VON DO3.....	90
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	91
	EIN-BUCHSTABEN-KODIERUNG DER AMINOSÄUREN .....	93
	PUBLIKATIONEN UND POSTERPRÄSENTATIONEN.....	94
	LITERATURVERZEICHNIS.....	95
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	104
	TABELLENVERZEICHNIS.....	106
	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>107</b>
	<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>108</b>





---

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 DIE ALZHEIMERSCHE DEMENZ

Die Alzheimersche Demenz (AD) ist mit derzeit 35 Millionen Erkrankten die häufigste neurodegenerative Krankheit weltweit. Aufgrund der demographischen Entwicklung unserer Gesellschaft, die durch eine fortschreitende Alterung der Bevölkerung gekennzeichnet ist, wird für die nächsten 30 Jahre ein Anstieg dieser Zahl auf 80 Millionen prognostiziert (Ballard *et al.*, 2011). Die Entdeckung dieser Demenzform durch Alois Alzheimer liegt mehr als 100 Jahre zurück (Alzheimer, 1907), dennoch sind derzeit weder eine zuverlässige Diagnose (vgl. 1.2.1) noch eine effektive Therapie (vgl. 1.2.2) verfügbar und ein sicherer Befund ist gegenwärtig nur *post mortem* möglich. Dies erhöht die Gefahr einer Fehldiagnose der AD, was letztlich zu einer suboptimalen Behandlung der Patienten führt. Als Konsequenz entstehen enorme finanzielle Kosten für das Gesundheitssystem und starke psychische Belastungen für Patienten und Angehörige.

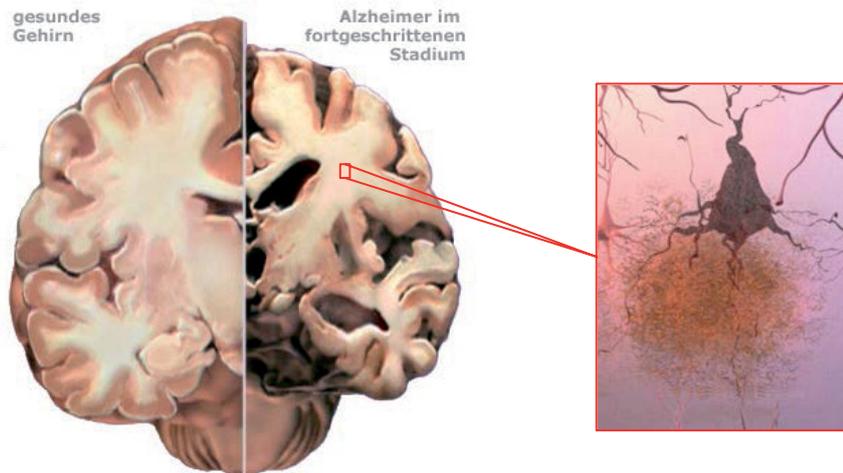
Die molekularen Ursachen der AD sind nicht vollständig geklärt, es werden aber unterschiedliche Faktoren diskutiert. Nur 5 % aller bekannten Fälle lassen sich auf erbliche Mutationen zurückführen. Diese Fälle werden der familiären AD (FAD) zugeordnet, die wiederum in sogenannte *late-onset* sowie *early-onset* Formen klassifiziert werden, welche demzufolge durch einen späten bzw. frühen Krankheitsbeginn gekennzeichnet sind. Die Mehrheit der Fälle mit bis zu 95 % lässt keine genetische Ursache erkennen und wird daher als sporadische AD bezeichnet (Avramopoulos, 2009). Der bisher einzige belegte Risikofaktor, abgesehen von genetischen Komponenten, ist das Alter, wobei die Zahl der Krankheitsfälle positiv mit dem Patientenalter korreliert. Faktoren wie Herz-Kreislauf-Störungen, Übergewicht, erhöhte Cholesterinwerte, Tabak- und Alkoholkonsum werden zwar mit einer erhöhten Inzidenz in Verbindung gebracht, konnten aber bisher nicht zweifelsfrei bestätigt werden (Burns und Iliffe, 2009).

### 1.1.1 DIE PATHOGENESE DER ALZHEIMERSCHEN DEMENZ

Eins der Hauptmerkmale der AD ist die Akkumulation verschiedener fehlgefalteter, gesundheitsschädlicher Proteine im Gehirn der Patienten. Die Anreicherung dieser toxischen Aggregate führt zu schweren Ausfallerscheinungen, die insbesondere im kognitiven und affektiven Bereich auftreten, wie etwa Lern-, Erinnerungs- und Orientierungsdefizite, Depressionen, Angstzustände, aber auch Sprach- und Verhaltensstörungen sind symptomatisch für eine progressive Demenz (Ritchie und Lovestone, 2002). In den letzten Jahren sind zwar große Fortschritte in unserem Verständnis der Ätiologie der AD gelungen, viele Vorgänge sind jedoch noch immer rätselhaft und ungeklärt. Im Folgenden soll deshalb genauer auf die Ursachen sowie Pathomechanismen eingegangen werden.

### 1.1.1.1 DIE PATHOLOGIE DER ALZHEIMERSCHEN DEMENZ

Welches Protein und welche Aggregatform genau die Hauptursache für die Entwicklung der AD darstellt ist nicht vollständig geklärt. Im Fokus der Forschung stehen das Tau-Protein und das Amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) Peptid, wobei Tau zu intraneuronalen, hyperphosphorylierten, helikalen Fibrillenbündeln, genannt *tangles*, und A $\beta$  zu extraneuronalen, fibrillären,  $\beta$ -Faltblatt-reichen Amyloidablagerungen, genannt Plaques, aggregiert. Diese Aggregate treten zusammen mit einem Verlust des Hirnvolumens im Endstadium auf. Abbildung 1 zeigt die typischen Krankheitsmerkmale der AD im Gehirn eines Patienten in der fortgeschrittenen Phase der Demenz.



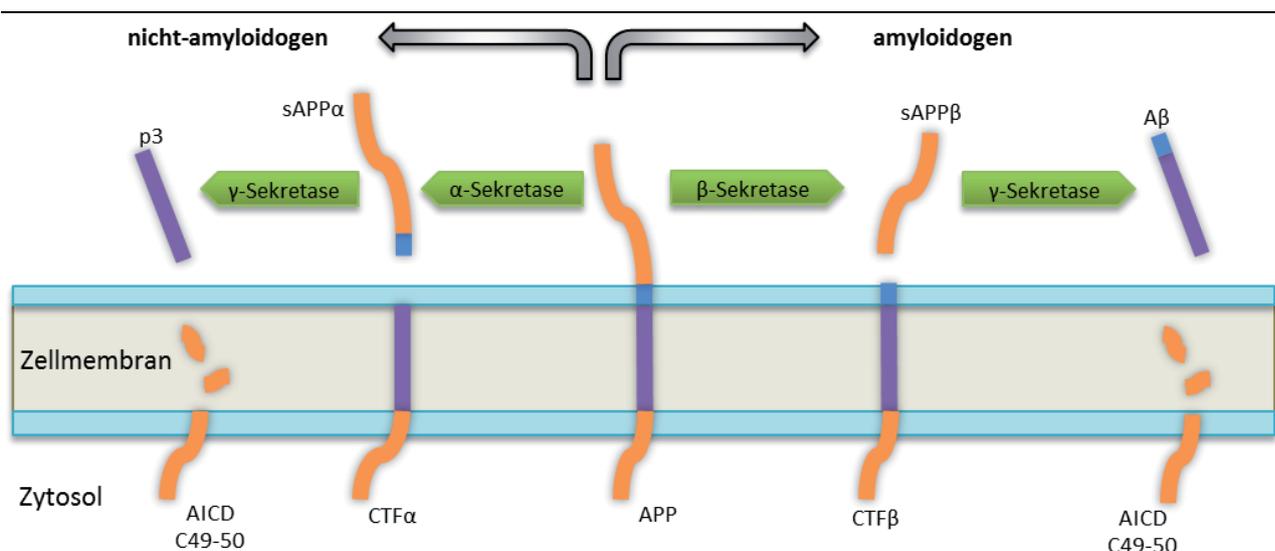
**Abbildung 1: Schematische Darstellung der fortgeschrittenen Alzheimerschen Pathologie.** Abgebildet ist das geschrumpfte Hirnvolumen eines Alzheimerpatienten im fortgeschrittenen Demenzstadium im Vergleich zu gesunden Personen. Deutlich zu erkennen sind die verkleinerten Hirnwindungen sowie die vergrößerten Hirnfurchen. Die mikroskopisch-anatomische Zeichnung zeigt die unterschiedlichen Ablagerungen im Detail: Die hellbraunen extrazellulären Plaques sowie die dunkelbraunen intrazellulären *tangles* in den Zellsoma (abgeändert nach [www.alz.org](http://www.alz.org)).

Im Allgemeinen werden drei verschiedene parenchymale Depositionstypen von A $\beta$  beschrieben (1) Großflächige diffuse Plaques (2) Stellare Astrozyten-ähnliche Plaques und (3) Fokale Plaques mit einer dichten und fibrillären Ablagerung des A $\beta$ -Peptids. Neben diesen parenchymalen Ablagerungen sind auch vaskuläre Plaques in den Blutgefäßen im Hirn von Alzheimerpatienten üblich. Diese als zerebrale amyloide Angiopathie bezeichnete Pathologie variiert jedoch von Typ zu Typ und ist vor allem bei mutationsbedingten AD-Fällen stärker ausgeprägt (Duyckaerts *et al.*, 2009). Pathologisch werden nach Thal *et al.* fünf Phasen der graduellen Verbreitung der Plaques unterschieden. Zu Beginn der Demenz sind vor allem der Neo- und Isokortex betroffen, gefolgt vom Entorhinalkortex sowie Hippocampus. Striatum und Diencephalon werden im dritten Stadium von Plaques besiedelt und im weiteren Verlauf wichtige Zellkerne im Hirnstamm wie die Substantia nigra. Zuletzt werden das Kleinhirn und weitere Zellkerne geschädigt (Thal *et al.*, 2002). Symptome der AD treten hingegen erst zu späteren Stadien auf, allerdings können sich sogenannte leichte kognitive Beeinträchtigungen (MCI = *mild cognitive impairment*) schon früher manifestieren (Burns und Iliffe, 2009). Eine MCI führt aber nicht zwangsläufig zur Ausbildung der AD. Die durchschnittliche Lebenserwartung der Alzheimerpatienten nach der Diagnose beträgt etwa acht Jahre (Barclay *et al.*, 1985).

Im Folgenden wird ein detaillierter Überblick über den derzeitigen Wissensstand zu den biochemischen Prozessen der AD gegeben. A $\beta$  spielt dabei eine wichtige Rolle in der Krankheitsentwicklung. Nachfolgend werden deshalb insbesondere das A $\beta$ -Peptid und dessen diverse Aggregat- und Isoformen genauer beschrieben und die beteiligten neurobiologischen Vorgänge erklärt.

### 1.1.1.2 PROZESSIERUNG VON APP ZU A $\beta$

Das Amyloid-Präkursor-Protein (APP) ist ein hauptsächlich neuronal exprimiertes Membranprotein. Die genaue physiologische Funktion ist nicht bekannt, eine potentielle Rolle als neurotropher Faktor und eine Beteiligung an der Transkription werden aber diskutiert. Die Prozessierung von APP unterliegt zahlreichen komplexen Prozessierungsmöglichkeiten, was in einer Vielzahl von A $\beta$ -Isoformen resultiert. Je nachdem ob  $\alpha$ -,  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Sekretasen beteiligt sind, wird dabei zwischen einem amyloidogenen sowie nicht-amyloidogenen Prozessierungsweg unterschieden. Aus dem nicht-amyloidogenen Typ geht das lösliche, nicht-toxische Protein p3 hervor, während der amyloidogene Weg zur Bildung des aggregationsanfälligen A $\beta$ -Peptids führt (Evin und Weidemann, 2002). Abbildung 2 gibt einen Überblick über die verschiedenen beteiligten Proteine und Enzyme.



**Abbildung 2: Schematische Übersicht der APP-Prozessierung.** APP ist ein Transmembranprotein und besteht aus je einem zytosolischen und membranintegrierten Teil. Bei der nicht-amyloidogenen Prozessierung wird der Transmembranbereich von der  $\alpha$ -Sekretase gespalten, so dass ein 83 Aminosäuren langes Carboxy-terminales Fragment (CTF $\alpha$ ) und das lösliche APP $\alpha$  (sAPP $\alpha$ ) freigesetzt werden. CTF $\alpha$  wird von der  $\gamma$ -Sekretase weiter zur Amyloid-Intrazellulär-Domäne verdaut (AICD = amyloid intracellular domain), was zur Freisetzung von löslichem p3 führt. Bei der Spaltung von APP durch die  $\beta$ -Sekretase wird der amyloidogene Weg initiiert. Hierbei werden das verkürzte sAPP $\beta$  sowie das 99 Aminosäuren lange CTF $\beta$  freigesetzt. Die weitere Prozessierung von CTF $\beta$  durch die  $\gamma$ -Sekretase resultiert in der Sezernierung von A $\beta$  (abgeändert nach Querfurth und LaFerla, 2010).

Die monomere Form von A $\beta$  ist ein 4,5 kDa großes Peptid, dessen physiologische Funktion ungeklärt ist, verschiedene Experimente implizieren aber eine synaptische sowie neuroprotektive Funktion des Monomers (Pearson und Peers, 2006; Giuffrida *et al.*, 2009). Aufgrund von multiplen Schnittstellen der  $\gamma$ -Sekretase innerhalb von APP entstehen verschiedene A $\beta$ -

Isoformen, deren Länge zwischen 38 und 43 Aminosäuren variiert. Hauptsächlich dominieren das 40 Aminosäuren lange A $\beta$ 1-40 sowie das A $\beta$ 1-42 mit zwei zusätzlichen Carboxy-terminalen Resten (Chiang *et al.*, 2008), aber die Mehrheit des exprimierten A $\beta$  gehört zur verkürzten Form A $\beta$ 1-40 (90 - 95 %). Nur ein kleiner Anteil der A $\beta$ -Gesamtmenge besteht aus der A $\beta$ 1-42-Isoform (5 - 10 %), welches aufgrund der zwei zusätzlichen aliphatischen Aminosäuren Isoleucin und Alanin einen hydrophoberen Charakter hat und aggregationsanfälliger ist als A $\beta$ 1-40 (Murphy und Levine, 2010). Sowohl in der familiären als auch sporadischen AD liegen die gleichen prozentualen Verhältnisse zwischen den beiden Isoformen vor (Portelius *et al.*, 2010).

Amino-terminale Verkürzungen und Modifikationen sind ebenfalls von Bedeutung und können die Aggregations- und Toxizitätseigenschaften von A $\beta$  verändern. Auf diese soll in einem späteren Kapitel näher eingegangen werden (vgl. 1.1.1.5).

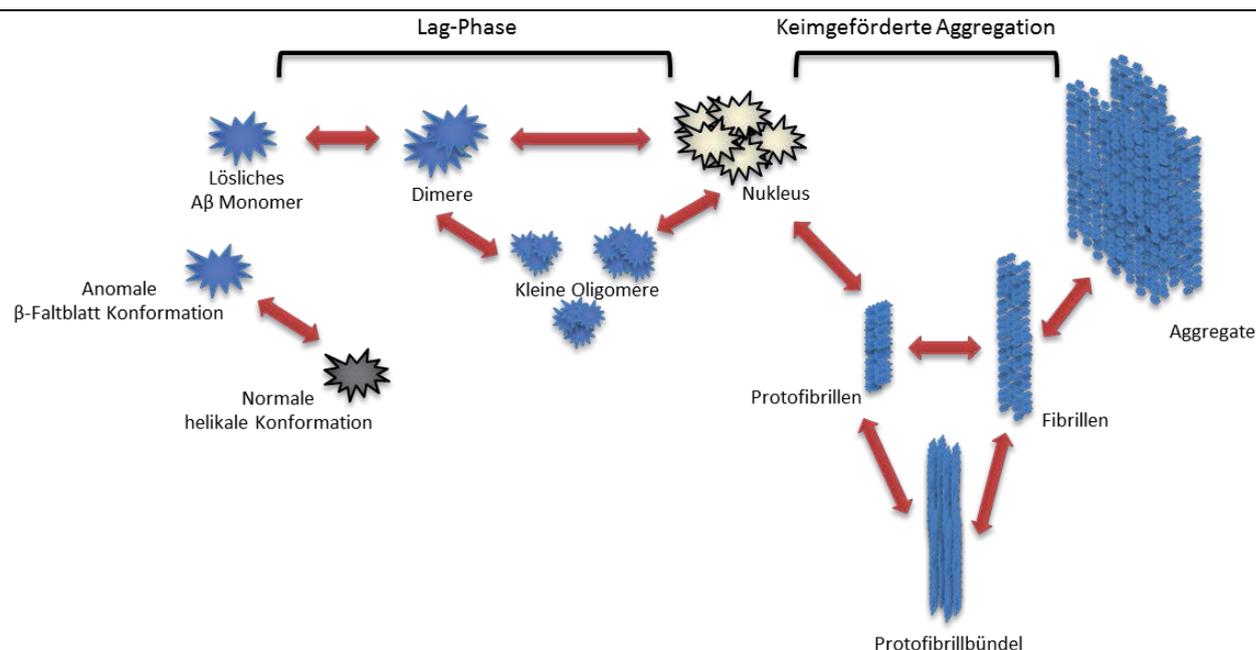
### **1.1.1.3 MUTATIONSBEDINGTE VERÄNDERUNGEN DER APP-PROZESSIERUNG**

Verschiedene Mutationen können die Prozessierung von APP beeinflussen und so zu einem veränderten Gleichgewicht zugunsten der A $\beta$ 1-42-Bildung führen. Es sind zahlreiche Mutationsvarianten im APP-Gen in der Nähe der Sekretase-Schnittstellen bekannt (van Dam und De Deyn, 2006). Ein bekanntes transgenes Mausmodell mit der Bezeichnung Tg2576 exprimiert das humane A $\beta$ -Peptid mit der schwedischen Mutation (APP<sub>SWE</sub>). In diesem Fall liegen zwei Substitutionsmutationen vor, in denen das Lysin an der Position 670 durch ein Asparagin und das Methionin an der Position 671 durch ein Leucin ersetzt wurden. Dieses Tiermodell entwickelt kognitive Störungen, hat eine gesteigerte A $\beta$ -Expression sowie vermehrte Plaquebildung im Kortex (Hsiao *et al.*, 1996) und weist somit ähnliche Pathologien auf wie die humane AD. Mutationen in den katalytisch aktiven  $\gamma$ -Sekretase-Untereinheiten Presenilin 1 und 2 (Levy-Lahad *et al.*, 1995) werden zu den seltenen autosomal-dominanten *early-onset* FAD-Fällen gezählt. Die unterschiedliche Allelausbildung des Suszeptibilitätsgens *ApoE* kann den Krankheitsbeginn beschleunigen und folglich das Demenzrisiko beeinflussen. Diese Formen werden den *late-onset* FAD-Fällen zugeordnet (Khachaturian *et al.*, 2004).

### **1.1.1.4 AGGREGATION UND TOXIZITÄT VON A $\beta$**

Die monomere Form von A $\beta$  zeichnet sich durch einen amphipathischen Charakter aus, dessen sekundäre Struktur, abhängig von der chemischen Umgebung, sowohl als  $\alpha$ -Helix als auch  $\beta$ -Faltblatt oder *random coil* vorliegen kann (Coles *et al.*, 1998; Crescenzi *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2000). Viele Hinweise deuten darauf hin, dass zu Beginn der eigentlichen Aggregation eine Konformationsänderung in eine  $\beta$ -Faltblatt-reiche Form der Monomere stattfindet, welches die Aggregation begünstigen kann (Lazo *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2005). Ausgehend vom löslichen Monomer erfolgt die Oligomerisierung zu weiteren löslichen Multimeren und bis hin zu unlöslichen fibrillären Aggregaten. Die Theorie zur Bildung dieser Aggregate ist vielfältig, kompliziert und keinesfalls unumstritten. Eine schematische Darstellung des Aggregations-

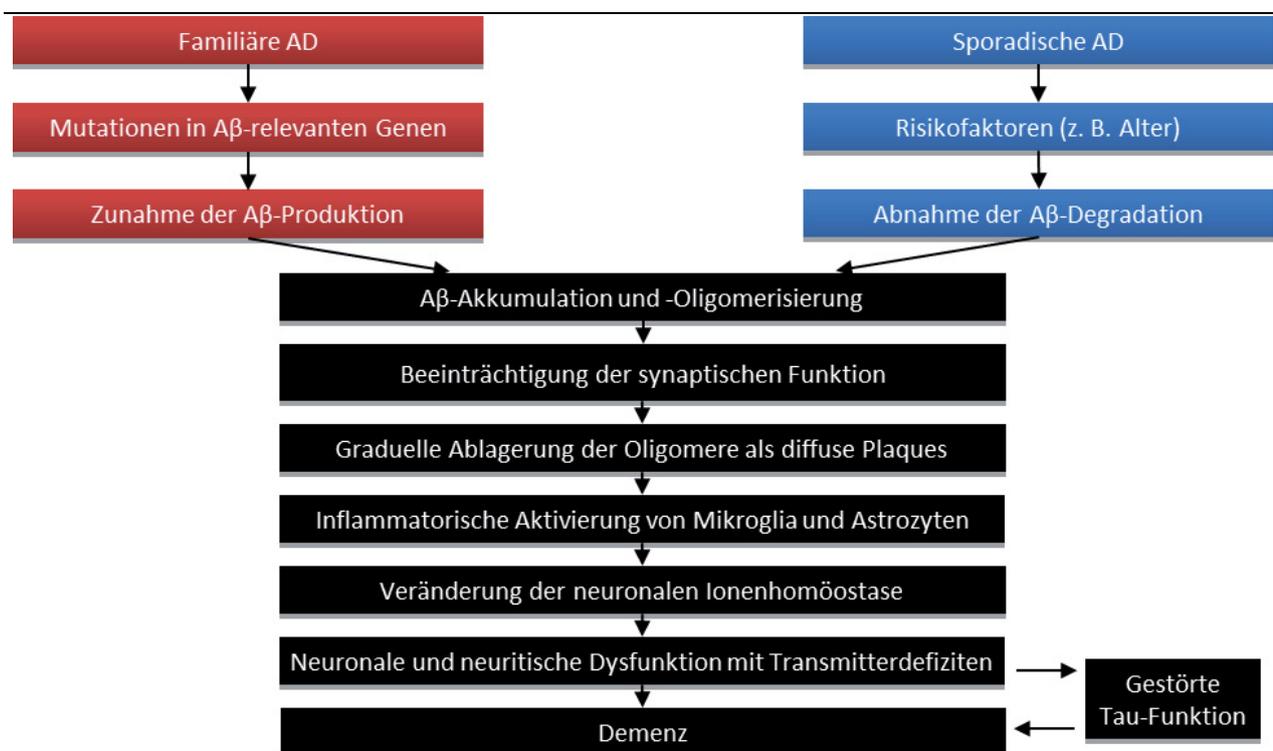
mechanismus ist in Abbildung 3 gezeigt. Die Grafik macht deutlich, wie dynamisch, komplex und multidirektional dieser Prozess sein kann.



**Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung des Aggregationsmechanismus von Aβ.** Aβ-Monomere können einer Konformationsänderung aus einem  $\alpha$ -helikalen Zustand in eine anomale  $\beta$ -Faltblatt-Struktur unterliegen, die aggregationsanfälliger ist. Über dimere Vorstufen werden kleinere lösliche Oligomere gebildet. Diese Oligomere können als Aggregationskeime (Nukleus) dienen und eine beschleunigte Fibrillation bewirken, wodurch die Lag-Phase in die keimgeförderte Aggregationsphase übergehen kann. Intermediate wie Protofibrillen und Protofibrillbündel stellen den Zwischenschritt zu den dichtgepackten Fibrillen und deren Assoziation zu fibrillären Aggregaten dar. Diese werden letztendlich in Plaques abgelagert. Wie die roten Pfeile verdeutlichen, ist der gesamte Prozess sehr dynamisch und eine Rückbildung in die jeweiligen transienten Vorstufen kann jederzeit stattfinden (abgeändert nach Finder und Glockshuber, 2007).

Lange war die allgemeine Vermutung, dass Fibrillen die eigentliche toxische Form des Aβ-Peptids darstellen. Die ursprüngliche Amyloid-Kaskaden-Hypothese besagt, dass ein Ungleichgewicht zwischen der Aβ-Produktion und dem -Abbau zu einer vermehrten Ablagerung von Aβ in Plaques führt und diese der Hauptgrund für die AD sind. Prozesse wie die Ausbildung neurofibrillärer *tangles*, Apoptose sowie die Demenz seien direkte Folgen dieser Aβ-Plaques (Hardy und Higgins, 1992). Allerdings war keine Korrelation zwischen dem Grad der Demenz und der Manifestation der fibrillären Plaques im Gehirn zu belegen (Ingelsson *et al.*, 2004), auch wenn die Aβ-Gesamtmenge in Patienten deutlich höher ist als in Kontrollgruppen und die Bildung der Plaques der der *tangles* vorangeht (Naslund *et al.*, 2000). Im Gegensatz zu den fibrillären Plaques lässt sich hingegen ein schlüssiger Zusammenhang zwischen der Oligomerbildung und dem Demenzzustand erstellen, bei der die kognitiven Störungen direkt mit der Menge von löslichen Oligomeren im Gehirn korrelieren (Gong *et al.*, 2003; Lacor *et al.*, 2004; Tomic *et al.*, 2009). Zusätzlich konnte in Zellkulturstudien eine deutlich toxischere Wirkung der Oligomere auf neuronale Zellen im Vergleich zu Fibrillen und Monomeren nachgewiesen werden (Cizas *et al.*, 2010; Deshpande *et al.*, 2006). Dies wird unter anderem durch eine leichtere Internalisierung der Oligomere in die Zellen (Chafekar *et al.*, 2008) und die Initiierung des Zelltods durch oxidativen

Stress erklärt (Mattson, 1997). Zudem deuten verschiedene Studien darauf hin, dass A $\beta$  an der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, Lipidperoxidierung, Proteinoxidierung, Kalziumdyshomöostase, mitochondriellen Schäden und zahlreichen anderen apoptotischen Prozessen beteiligt ist (Butterfield *et al.*, 2001). Außerdem wurde gezeigt, dass sowohl synthetische als auch endogene Oligomere kognitive Störungen in Tiermodellen auslösen können (Cleary *et al.*, 2005; Lesné *et al.*, 2006; Reed *et al.*, 2009). Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass anstatt der Fibrillen eher die kleinen, löslichen Oligomere vielfältige primäre und toxische Auswirkungen auf unterschiedliche zelluläre Funktionen haben können und weitere Symptome wie die Ausbildung der *tangles* und der neuronale Zelltod direkte, nachgeschaltete Prozesse sind (Blennow *et al.*, 2006). Ein veranschaulichendes Diagramm dieser aktualisierten Theorie ist in Abbildung 4 dargestellt.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der aktualisierten Amyloid-Kaskaden-Hypothese.** Sowohl die Entstehung der familiären als auch sporadischen AD ist kompatibel mit dieser Theorie, aufbauend auf unterschiedlichen Ausgangssituationen. Beide Umstände führen zu der Anreicherung von Oligomeren, die bereits im frühen Stadium die synaptische Funktion hemmen können. Nach der Ablagerung der Aggregate in extrazellulären Plaques erfolgen die entzündungsbedingte Aktivierung von neuronalen Gliazellen sowie die Störung der neuronalen Ionenhomöostase. Letztendlich ist auch die Transmitterfunktion beeinträchtigt. In bisher ungeklärter Weise wird in nachgeschalteten Prozessen die Tau-Funktion ebenfalls eingeschränkt. All diese Faktoren führen nach dem heutigen Stand der Kenntnis zur Ausbildung der Demenz (abgeändert nach Blennow *et al.*, 2006).

Die Struktur der Oligomere ist sehr vielfältig, so dass viele unterschiedlich große Oligomere definiert werden. Das Spektrum reicht von Dimeren und Trimeren über kleinere Oligomere und sogenannte ADDLs (*A $\beta$ -derived diffusible ligands* = A $\beta$ -abgeleitete diffundierende Liganden) bis hin zu Protofibrillen. All diesen Konformationen ist aber gemeinsam, dass sie toxisch auf Neurone wirken.

Endogene Dimere und Trimere sind erst seit kurzem als toxisch potente Konformere bekannt (Shankar *et al.*, 2008; Reed *et al.*, 2009). Beide Oligomerformen werden mit einer erhöhten Neurotoxizität in Zusammenhang gebracht (Hung *et al.*, 2008). Endogene Trimere inhibieren zudem die für die Gedächtnisfunktion wichtige Langzeitpotenzierung (Townsend *et al.*, 2006).

Größere lösliche Oligomere scheinen ebenfalls eine wichtige pathogene Funktion zu haben. So zeigten Lambert *et al.*, dass bis zu 42 kDa große, synthetische Multimere bereits in physiologischen, nanomolaren Konzentrationen toxisch auf neuronale Gewebekulturen wirken und die Langzeitpotenzierung hemmen (Lambert *et al.*, 1998). Dies wurde durch eine weitere Gruppe später nochmal verifiziert (Chromy *et al.*, 2004).

Protofibrillen, die eine Intermediatform zu den Fibrillen darstellen, wurden erstmals *in vitro* nachgewiesen (Harper *et al.*, 1999) und bewirken ebenfalls toxische Effekte in neuronalen Zellkulturmodellen (Ward *et al.*, 2000).

In den letzten Jahren hat das A $\beta$ 1-42 immer mehr an Bedeutung gewonnen und die Funktion von A $\beta$ 1-40 hinsichtlich der Ätiologie ist teilweise in den Hintergrund gerückt. Aktuelle Studien heben aber wieder die Bedeutung beider Isoformen hervor, indem sie komplexe Interaktionen zwischen den beiden Formen nachweisen. Es wurde z. B. gezeigt, dass das molare Verhältnis zwischen A $\beta$ 1-42 und A $\beta$ 1-40 die gegenseitige Aggregation beeinflussen kann. Eine äquimolare Konzentration von A $\beta$ 1-40- und A $\beta$ 1-42-Monomeren inhibiert die Fibrillation von A $\beta$ 1-42, während eine geringere A $\beta$ 1-40-Konzentration die Oligomerisierung stört (Jan *et al.*, 2008; Murray *et al.*, 2009). Kuperstein *et al.* konnten zudem zeigen, dass das Verhältnis zwischen diesen beiden Isoformen die synaptische Funktion beeinflussen kann (Kuperstein *et al.*, 2010).

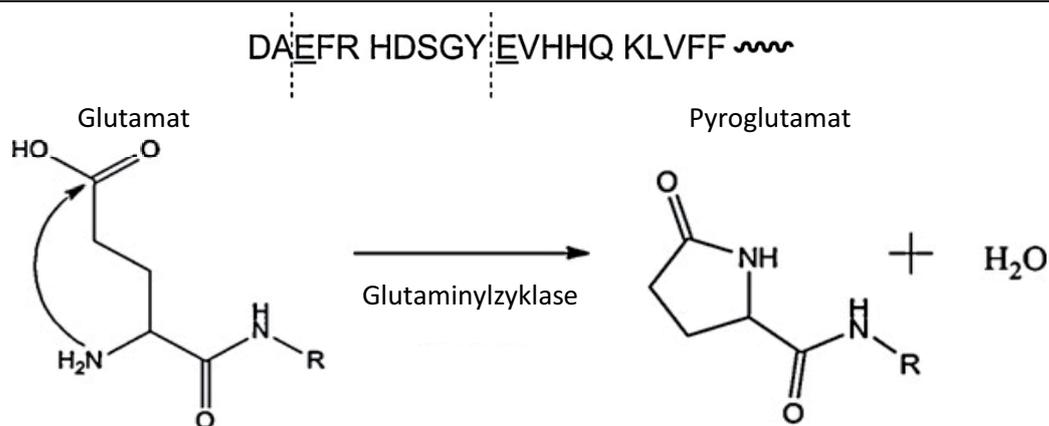
Diese Befunde fügen eine zusätzliche Dimension zu der Ursachenkomplexität hinzu und verdeutlichen, wie vielseitig die einzelnen Isoformen miteinander agieren können. All diese Tatsachen verdeutlichen zudem, dass toxische Oligomere als äußerst potente Einheiten vermutlich eine wichtige Rolle in der Pathogenese der AD einnehmen und deshalb einen vielversprechenden Fokus zur Diagnose und Therapie präsentieren.

#### 1.1.1.5 PYROGLUTAMAT-A $\beta$

Die genaue Bedeutung des A $\beta$ -Peptids wurde bereits ausführlich beschrieben und auf die toxischen Effekte der verschiedenen Konformationen eingegangen (vgl. 1.1.1.4). Im Folgenden soll das Pyroglutamat-A $\beta$  (A $\beta$ pE), das bestimmte Amino-terminale Modifikationen im Vergleich zu den Vollängen-Peptiden A $\beta$ 1-40 und A $\beta$ 1-42 aufweist, detaillierter vorgestellt werden. Obwohl diese Isoform schon seit fast zwei Jahrzehnten bekannt ist, wurde erst in den letzten Jahren ein verstärkter Schwerpunkt auf diese Spezies gelegt.

A $\beta$ pE ist ein Amino-terminal verkürztes Peptid, dessen freiliegender Glutaminsäure-Rest an der Position 3 bzw. 11 in zyklisierter Pyroglutamatform vorliegt, woher auch die Bezeichnung A $\beta$ pE3-x bzw. A $\beta$ pE11-x abgeleitet wird. Diese Peptide wurden erstmals 1992 massenspektroskopisch im Gehirn von Alzheimerpatienten nachgewiesen (Mori *et al.*, 1992). Die chemische

Umwandlung der Glutaminsäure und die Peptidsequenzposition vom Pyroglutamat sind in Abbildung 5 dargestellt.



**Abbildung 5: Chemische Katalyse der Pyroglutamatbildung.** Die Umwandlung eines Vollängen-A $\beta$ -Peptids in die Pyroglutamatform ist ein vielstufiger Prozess. Zuerst erfolgt die Verkürzung des Amino-terminalen Endes bis zur Position E3 bzw. E11. Die freigelegte Glutaminsäure dissoziiert zum Glutamat und wird mittels Glutaminylykase unter Abspaltung von Wasser zum Pyroglutamat zyklisiert (Abgeändert nach Gunn *et al.*, 2010).

Bisher konnten mehrere Formen vom A $\beta$ pE-Peptid im Gehirn von AD-Patienten nachgewiesen werden (Hosoda *et al.*, 1998; Russo *et al.*, 1997), von denen das A $\beta$  mit dem Pyroglutamat an Position 3 (A $\beta$ pE3-x) in den Plaques am häufigsten vorkommt (Saido *et al.*, 1996). Mehrere Studien weisen darauf hin, dass A $\beta$ pE die dominante Isoform im Hirn von Alzheimerpatienten ist (Piccini *et al.*, 2005) und sich auch in Blutgefäßen ansammelt (Harigaya *et al.*, 2000). Diese Befunde deuten auf eine wichtige Rolle des A $\beta$ pE-Peptids in der AD-Pathogenese hin. Dies wird dadurch unterstützt, dass das A $\beta$ pE potentielle pathogenesefördernde Eigenschaften hat, denn sowohl die verkürzte Form A $\beta$ 3-40 als auch dessen Pyroglutamatform zeigen eine deutlich gesteigerte Aggregationsanfälligkeit im Vergleich zum A $\beta$ 1-40/42-Peptid (Pike *et al.*, 1995; He und Barrow, 1999; Schilling *et al.*, 2006). Dies ist vermutlich auf eine gesteigerte Hydrophobizität und damit reduzierte Löslichkeit zurückzuführen (Kuo *et al.*, 1997).

Zur toxischen Wirkung der A $\beta$ -Pyroglutamatform wurden unterschiedliche Ergebnisse publiziert. Während Russo *et al.* in *in vitro*-Applikationen auf Neurone von einer erhöhten toxischen Wirkung von A $\beta$ pE im Vergleich zu den anderen Isoformen berichten (Russo *et al.*, 2002), können Tekirian *et al.* keinen Unterschied bzgl. der Neurotoxizität feststellen (Tekirian *et al.*, 1999).

Die *in vivo*-Bedeutung von A $\beta$ pE wird durch weitere zahlreiche Beobachtungen gestützt. So konnten Marcello *et al.* etwa nachweisen, dass in AD-Patienten der gegen A $\beta$ pE-gerichtete IgM-Antikörpertiter deutlich reduziert ist (Marcello *et al.*, 2009). Sehr interessant ist auch die Tatsache, dass die Behandlung mit einem Glutaminylykase-Inhibitor in transgenen Mäusen zu einer deutlichen Reduktion der Plaquebildung, einer Verringerung von inflammatorischen Prozessen sowie einer verbesserten kognitiven Leistung führt (Schilling *et al.*, 2008).

Die Summe dieser Beobachtungen macht das A $\beta$ pE-Peptid zu einem interessanten und wichtigen Faktor in der Pathogenese der AD, dessen weitere Untersuchung vielversprechende Kenntnisse zur Aufklärung, Diagnose und Therapie der Demenz in Aussicht stellt.

## 1.2 DIAGNOSE UND THERAPIE

Wie bereits im Einleitungskapitel erwähnt gestaltet sich die Diagnose der AD als äußerst schwierig, da immer noch zu wenig über die genauen pathologischen Ursachen und Vorgänge bekannt ist. Während die Diagnose sich zurzeit auf neuropsychologische Tests und der unterstützenden Anwendung bildgebender Verfahren beschränkt, zielt die derzeitige Therapie auf palliative Methoden, da die Ursachenbehandlung der AD mit heutigen Methoden nicht möglich ist. In den folgenden Kapiteln soll daher eine kurze Übersicht über aktuelle Diagnose- und Therapiemaßnahmen mit einem Schwerpunkt auf innovativen Möglichkeiten gegeben werden, um die Ziele dieser Arbeit in den nötigen Kontext zu setzen.

### 1.2.1 DIAGNOSE

Eine zweifelsfreie Diagnose der AD ist ausschließlich *post mortem* nach der histopathologischen Analyse des Hirns der Verstorbenen möglich. Deshalb wird meist anhand einer Vielzahl von Kriterien versucht, einen relativ gesicherten Befund zu erstellen. Hierbei werden zum einen klinische Symptome, wie der Abfall kognitiver Leistungen bei Patienten, beurteilt, um eine Demenz nachzuweisen. Zur Abgrenzung von anderen Demenzkrankheiten, wie der MCI oder frontotemporalen Demenz, werden zusätzlich bildgebende Verfahren wie Magnetresonanztomographie (MRT) und Positronenemissionstomographie (PET) eingesetzt sowie zunehmend Versuche zu Biomarkermessungen in Körperflüssigkeiten durchgeführt (Mucke, 2009).

MRT-Messungen dienen zur Beurteilung des Hirnvolumens und sollen eine Abnahme der Gehirnmasse nachweisen. Allerdings ist diese Methode erst im Spätstadium der AD einsetzbar, wenn das Organ bereits großflächig von der Pathologie betroffen ist und schwere Demenzercheinungen vorliegen (Jagust, 2006).

PET-Messungen dienen zur Evaluation der allgemeinen Gehirnaktivität in Form vom Glukosemetabolismus. Eine neuere Alternative ist der Einsatz des A $\beta$ -bindenden Radioliganden *Pittsburgh Compound B* (PIB) (Klunk *et al.*, 2004). AD-Patienten zeigten eine erhöhte PIB-Bindung im Hirn im Vergleich zu Kontrollfällen (Klunk *et al.*, 2005). Allerdings sind PET-Untersuchungen mit PIB noch in der Versuchsphase und werden noch nicht weitläufig eingeführt, da diese Methode nicht immer eine zweifelsfreie Diagnose ermöglicht.

Zusätzliche neue experimentelle Diagnoseverfahren ermöglichen die Erfassung von Biomarker-Leveln in verschiedenen Körperflüssigkeiten wie etwa Zerebrospinalflüssigkeit (CSF = *Cerebrospinal fluid*) oder Blutplasma. Als AD-relevante Biomarker im CSF sind das APP (Lannfelt *et al.*, 1995), die  $\beta$ -Sekretase (Holsinger *et al.*, 2006) oder A $\beta$ 1-42 selbst (Strozyk *et al.*, 2003) bekannt. Allerdings sind die Korrelationen zwischen dem Biomarker-Level und dem Demenzgrad nicht immer eindeutig, so dass eine alleinige Diagnose mittels bisheriger Biomarker nicht möglich ist.

## 1.2.2 THERAPIE

Die allgemein zugelassenen Therapien der AD beschränken sich zurzeit auf die symptomatische Behandlung der Demenzercheinungen. Hierbei kommen zumeist die drei Cholinesteraseinhibitoren Donezepil, Rivastigmin sowie Galantamin zum Einsatz, die den fortschreitenden Verlust der Neurone durch die Reduktion des Azetylcholin-Transmitterabbaus kompensieren sollen. Zusätzlich werden die psychiatrischen Beschwerden mit einer Kombination aus Antidepressiva und Antikonvulsiva behandelt (Ballard *et al.*, 2011). Da jedoch keine Ursachenbekämpfung durchgeführt wird, handelt es sich ausschließlich um palliative Therapiemöglichkeiten, der Krankheitsfortschritt wird nicht aufgehalten. Einige Therapieentwicklungen nehmen die eigentlichen ätiologischen Komponenten, etwa das A $\beta$ -Peptid, in den Fokus. Dabei wird die möglichst frühzeitige Modulation des Krankheitsverlaufs mit A $\beta$ -Aggregationsinhibitoren und Enzyminhibitoren der A $\beta$ -Produktion zum Ziel gesetzt. Immuntherapeutische Ansätze sind ebenfalls eine Möglichkeit, die Pathologie zu beeinflussen (van Marum, 2008). In den folgenden Abschnitten sollen insbesondere peptidartige Aggregationsinhibitoren sowie immuntherapeutische Ansätze im Detail vorgestellt werden.

### 1.2.2.1 THERAPIE MIT PEPTIDEN

Die Therapie mit Peptidinhibitoren kann einige aussichtsreiche Erfolge vorweisen (Kokkoni *et al.*, 2006; Taddei *et al.*, 2008; Frydman-Marom *et al.*, 2009). Die Prämisse für den Einsatz von Peptidinhibitoren ist die Bildung eines Bindungskomplexes des Peptids mit A $\beta$  und die anschließende Modulation der Aggregation. Verschiedene Wirkmechanismen sind dabei denkbar. Ladiwala *et al.* definieren drei unterschiedliche Kategorien, nach denen etwa aromatische Moleküle die Oligomerbildung remodulieren können: (1) Überführung von Oligomeren vom regulären Fibrillationsweg weg in amorphe, nicht-toxische Aggregate (2) Überführung von toxischen Oligomeren in reguläre Fibrillen (3) Disassemblierung von löslichen Oligomeren und Fibrillen zu niedermolekularen, nicht-toxischen Einheiten (Ladiwala *et al.*, 2011). Ähnliche Mechanismen können auch bei der Aggregationsmodulierung durch Peptide stattfinden. Die Möglichkeiten sind also vielseitig, so dass viele verschiedene Peptidsubstanzen entwickelt wurden und werden.

Grundvoraussetzung aller pharmakologischer Substanzen sind verschiedene Charakteristika: Proteolyse-Resistenz und eine ausreichend lange Halbwertszeit für eine funktionelle *in vivo*-Aktivität, eine geringe Immunogenität zur Vermeidung inflammatorischer Reaktionen, Blut-Hirn-Schranken-Permeabilität und natürlich keine *in vivo*-Toxizität. Diese Eigenschaften müssen selbstverständlich auch auf potentiell therapeutische Peptide zutreffen (Amijee und Scopes, 2009). Bei der Konzeption dieser Peptide kommt sowohl die rationale Wirkstoffplanung anhand bestimmter erwünschter Eigenschaften (Ghanta *et al.*, 1996) als auch die Selektion unter vorgegebenen Konditionen, etwa im Phagendisplay, zur Anwendung. Die Peptidselektion beruht auf einer Anreicherungsprozedur aus meist kombinatorischen Peptidbibliotheken, aus denen

durch einen definierten Selektionsdruck Varianten unabhängig von Struktur und Chemie selektiert werden, die aufgrund der Kombination individueller Eigenschaften an das Zielpeptid binden können (Brakmann *et al.*, 1995). Einige Kandidaten aus beiden Ansätzen haben ihre *in vivo*-Eignung bereits unter Beweis gestellt und werden im Folgenden näher dargestellt.

Eines der ersten rational geplanten inhibitorischen Peptide mit therapeutischen Eigenschaften ist das sogenannte iA $\beta$ 5-Peptid von Soto *et al.*, welches von der zentralen hydrophoben Peptidregion LVFFA in A $\beta$  abgeleitet wurde. Dieses kurze Hexamer löst vorgeformte Fibrillen auf, hemmt die A $\beta$ -induzierte Neurotoxizität *in vitro* und verringert die Plaquebildung in Ratten *in vivo* (Soto *et al.*, 1998). Folgestudien bestätigen den therapeutischen Effekt in transgenen Mäusen und weisen nach, dass das Peptid Blut-Hirn-Schranken permeabel ist (Permanne *et al.*, 2002).

Basierend auf diesen Ergebnissen wurden noch weitere Peptide, basierend auf der zentralen A $\beta$ -Region, konzipiert (Pallitto *et al.*, 1999; Akikusa *et al.*, 2003; Gibson und Murphy, 2005; Rangachari *et al.*, 2009), allerdings konnte für diese bisher keine *in vivo*-Wirkung gezeigt werden.

Die Selektion aus kombinatorischen Peptidbibliotheken unter definierten Bedingungen brachte ebenfalls vielversprechende Peptide hervor. Die orale Applikation des sogenannten D-4F-Peptids reduziert z. B. die Plaquebildung und verbessert die kognitiven Funktionen in transgenen Tieren (Handattu *et al.*, 2009).

Ein Peptid mit ebenfalls interessanten Eigenschaften ist D3, welches aus einer Phagendisplayselektion abgeleitet wurde. Dieses Dodekamer besteht aus Aminosäuren in nicht-physiologischer D-Enantiomerkonformation und zeigt aggregationshemmende sowie anti-toxische Eigenschaften *in vitro* (Wiesehan *et al.*, 2008). Sowohl die intrazerebrale Injektion als auch die orale Verabreichung von D3 in transgenen Tg2576 Mäusen reduziert die Plaquebildung und die inflammatorischen Reaktionen und verbessert die kognitiven Fähigkeiten der Mäuse signifikant (van Groen *et al.*, 2008; Funke *et al.*, 2010), wodurch die *in vivo*-Effizienz bestätigt wird. Dieses D-enantiomere Peptid erfüllt wichtige Kriterien für effektive therapeutische Wirkstoffe, denn Peptide mit D-enantiomeren Aminosäuren sind Proteolyse-resistenter als diejenigen mit L-enantiomeren Aminosäuren und im Allgemeinen weniger immunogen (Van Regenmortel und Muller, 1998; Poduslo *et al.*, 1999).

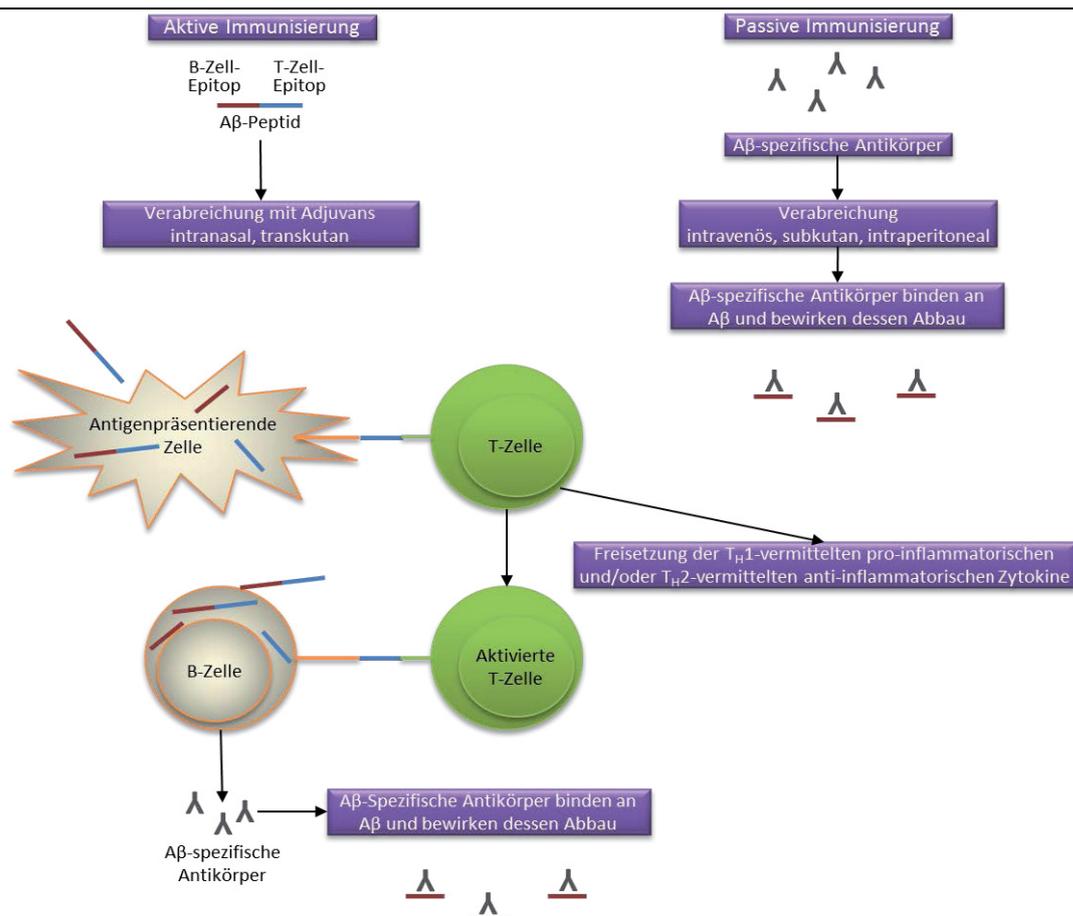
Neben D3 sind noch weitere aus Phagendisplay gewonnene Peptide bekannt, die ebenfalls vielversprechende Resultate erzielten (Orner *et al.*, 2006; Kawasaki *et al.*, 2010; Larbanoix *et al.*, 2011). Diese haben allerdings bisher noch keine *in vivo*-Tauglichkeit bewiesen.

### 1.2.2.2 IMMUNTHERAPIE

Der immuntherapeutische Ansatz zur Behandlung von AD basiert auf der Stärkung des natürlichen Immunsystems gegen toxische A $\beta$ -Formen. Humane Plasmapräparationen weisen bereits A $\beta$ -Antikörperaktivität vor (Szabo *et al.*, 2008; O'Nuallain *et al.*, 2010), wobei eine Affinität für diverse A $\beta$ -Konformationen möglich ist (Szabo *et al.*, 2010).

In Bezug auf den anti-A $\beta$ -Antikörpergehalt in der AD sind widersprüchliche Ergebnisse bekannt. Während in einigen Fällen keine abweichenden anti-A $\beta$ -Antikörpertiter in AD-Patienten und Kontrollen festgestellt wurden (Hyman *et al.*, 2001; Baril *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2008; Britschgi *et al.*, 2009), zeigen andere, dass der Titer in Demenzfällen höher liegt (Nath *et al.*, 2003; Gruden *et al.*, 2004; Mruthinti *et al.*, 2004; Gustaw *et al.*, 2008). Es wird aber auch zugleich von signifikant reduzierten Antikörpermengen in AD-Patienten berichtet (Jiangping *et al.*, 2006; Brettschneider *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2007; Sohn *et al.*, 2009).

Die Erhöhung der anti-A $\beta$ -Antikörperaktivität – über körpereigene Antikörper hinaus – kann zur Verbesserung bzw. Vermeidung der AD-Pathologie führen. Dabei gibt es die Option, entweder A $\beta$  bzw. dessen Derivat als Antigen einzusetzen, oder passiv mit A $\beta$ -spezifischen Antikörpern zu immunisieren. Bei der aktiven Immunisierung wird die humorale Immunantwort zur Produktion Antigen-spezifischer Antikörper ausgelöst. Dagegen wird bei der passiven Immunisierung die Aktivierung der Immunantwort durch den direkten Transfer von vorselektierten Antikörpern umgangen. Abbildung 6 veranschaulicht die immunologischen Vorgänge bei der aktiven und passiven Immuntherapie.



**Abbildung 6: Schematischer Vergleich der aktiven und passiven Immuntherapie.** Bei der aktiven Immunisierung werden das komplette A $\beta$ -Peptid bzw. -Fragmente unter Zuhilfenahme eines Adjuvans verabreicht und eine humorale Immunantwort ausgelöst. Dabei internalisieren antigen-präsentierende Zellen die A $\beta$ -Antigene und übermitteln dessen T-Zellepitop an T-Zellen, die dadurch aktiviert werden und pro- bzw. anti-inflammatorische Zytokine aktivieren. Derweil aktiviert das B-Zellepitop die B-Zellen und diese bilden mit Unterstützung der aktivierten T-Zellen A $\beta$ -spezifische Antikörper. Bei der passiven Immunisierung werden vorselektierte A $\beta$ -spezifische Antikörper verabreicht, die die A $\beta$ -Antigene direkt binden und deren Abbau auslösen (abgeändert nach Lemere und Masliah, 2010).

Die potentiellen Wirkmechanismen der induzierten Immunantwort sind nicht vollständig geklärt, es werden aber verschiedene Theorien angenommen: (1) Antikörper treten in das zentrale Nervensystem ein und binden Fibrillen, wodurch eine  $F_C$ -vermittelte Phagozytose durch aktivierte Mikroglia stattfindet (2) Der Abbau von  $A\beta$  im Plasma verursacht ein gestörtes Gleichgewicht zu zerebralem  $A\beta$ , weshalb ein Efflux des neuronalen Peptids in die Peripherie stattfindet (3) Antikörper binden an  $A\beta$  und verhindern so die weitere Aggregation bzw. lösen vorgeformte Aggregate auf (Gelinas *et al.*, 2004). Bei der tatsächlichen Immunreaktion ist es durchaus möglich, dass nicht nur ein Mechanismus eingreift, sondern vielmehr eine Kombination aus verschiedenen Prozessen stattfindet.

Die erste Studie zur aktiven Immuntherapie führten Schenk *et al.* 1999 mit der Immunisierung von transgenen Mäusen mit synthetischen  $A\beta$ -Aggregaten durch. Diese Behandlung verhinderte die Plaquebildung, bewirkte den Abbau vorhandener Deposite und verbesserte die kognitiven Fähigkeiten in transgenen Mäusen (Schenk *et al.*, 1999; Janus *et al.*, 2000; Morgan *et al.*, 2000). Aufbauend auf diesen erfolgreichen Versuchen wurde die erste Studie in AD-Patienten gestartet, die Behandlung wurde aber vorzeitig abgebrochen, nachdem etwa 6 % der Patienten Meningoenzephalitis und Leukoenzephalopathie entwickelten (Orgogozo *et al.*, 2003; Gilman *et al.*, 2005). Nach der Auswertung der vorhandenen Daten wurde aber im Hirn der später verstorbenen Patienten eine reduzierte Plaquebildung festgestellt (Nicoll *et al.*, 2003; Ferrer *et al.*, 2004; Masliah *et al.*, 2005).

Basierend auf den Resultaten aus diesen Versuchen werden  $A\beta$ -Impfstoffe für die aktive Immuntherapie so konzipiert, dass B-Zellen aktiviert werden, die Beteiligung der gegen  $A\beta$  gerichteten T-Zellen möglichst reduziert (Morgan, 2010) und sowohl präventiv als auch rückwirkend die Pathologie und Kognition verbessert werden (Tabira, 2010).

Die Vorteile der passiven Immunisierung gegenüber der aktiven Immuntherapie liegen zum einen darin, dass die Applikation von starken Adjuvantien entfällt und das Risiko unerwünschter Immunreaktionen sinkt, zum anderen passive Therapien im Gegensatz zu den aktiven jederzeit gestoppt werden können falls starke Nebenwirkungen auftreten. Das wichtigste Argument einer passiven Immuntherapie ist jedoch, dass Antikörper, die spezifisch für bestimmte  $A\beta$ -Konformere sind, verabreicht werden können, um so z. B. gezielt den Abbau von Oligomeren zu fördern. Monomere werden nicht gebunden, so dass die physiologische Funktion der Monomere unverändert bleibt. Ein Nachteil dieser Vorgehensweise ist allerdings, dass eine ununterbrochene Immunisierung der Patienten erfolgen muss, die im Vergleich zur einmaligen Immunisierung in der aktiven Immuntherapie sehr kostenintensiv ist. Außerdem besteht die Gefahr, dass neutralisierende Antikörper gebildet werden können (Lemere und Masliah, 2010).

Nichtsdestotrotz wurden zahlreiche anti- $A\beta$ -Antikörper entwickelt, die interessante *in vivo*-Eigenschaften haben. So hat ein protofibrillenspezifischer Antikörper die Amyloidogenese in Ratten verhindert (Lord *et al.*, 2009) und ein oligomerspezifischer Antikörper in transgenen Mäusen signifikante Verbesserungen im Lern- und Erinnerungsvermögen bewirkt (Lee *et al.*,

2006). Klinische Studien in AD-Patienten konnten jedoch bisher keine überzeugende therapeutische Wirkung verzeichnen. Stattdessen traten unerwünschte Nebeneffekte auf, bei denen es sich hauptsächlich um A $\beta$ -Ablagerungen in zerebralen Blutgefäßen handelte (Boche *et al.*, 2008).

Eine innovative Methode zur aktiven Immunisierung ermöglicht die von der AFFIRIS AG entwickelte Affitom-Technologie. Mittels dieser Technik wird eine Bibliothek aus sogenannten Affitopen mittels Selektionsantikörper gescreent. Affitope sind hexamere Peptide, die die A $\beta$ -Struktur funktionell imitieren. Die Bindungseigenschaften bestimmter Antikörper werden an die selektierten Affitope weitergegeben. Diese Affitope werden anschließend zur aktiven Immunisierung eingesetzt, so dass die aktivierten endogenen Antikörper dieselben Eigenschaften tragen wie die zum Screening eingesetzten synthetischen Antikörper (Schneeberger *et al.*, 2009). Diese Antikörper erkennen ausschließlich ein A $\beta$ -Epitop, das nach der Abspaltung von A $\beta$  von APP entsteht. Die Vorteile dieser Affitom-Technologie sind wie folgt:

- (1) Es sind körperfremde Peptide, so dass leichter eine Immunantwort ausgelöst werden kann
- (2) Die kurze Länge von sechs Aminosäuren schließt die Aktivierung A $\beta$ -spezifischer T-Zellen aus
- (3) Es erfolgt keine Kreuzreaktion mit APP und anderen humanen Proteinen. Es sind zurzeit mehrere Affitop-Kandidaten in der Entwicklung, die sich in Wirksamkeitsstudien beweisen müssen (Schneeberger *et al.*, 2010).

### **1.2.3 PHAGENDISPLAYSELEKTION VON PEPTIDEN FÜR THERAPIE UND DIAGNOSE**

Das Phagendisplay ist ein innovatives Verfahren zur Identifikation von Interaktionen zwischen unterschiedlichen Biomolekülen und vielfältigen Ligandentypen. Das Prinzip des Phagendisplays beruht auf der Expression von Peptid- bzw. Proteinliganden auf der Oberfläche von Phagen, wobei die Aminosäuresequenzen in das Phagen genom inseriert und als Fusionskonstrukt zusammen mit dem Hüllprotein auf der Phagenoberfläche exprimiert werden (Smith und Petrenko, 1997).

Es existieren unterschiedliche Varianten des Phagendisplays, in denen verschiedene Parameter variiert werden können: Die Wahl des Phagenvektors, des Zielmolekültyps, des präsentierten Molekültyps, des Fusionskonstrukts und der Insertsequenzlänge. Bei den meisten Methoden erfolgt die grundlegende Selektion nach Affinität der präsentierten Liganden für die Zielmoleküle unter einem genau definierten Selektionsdruck.

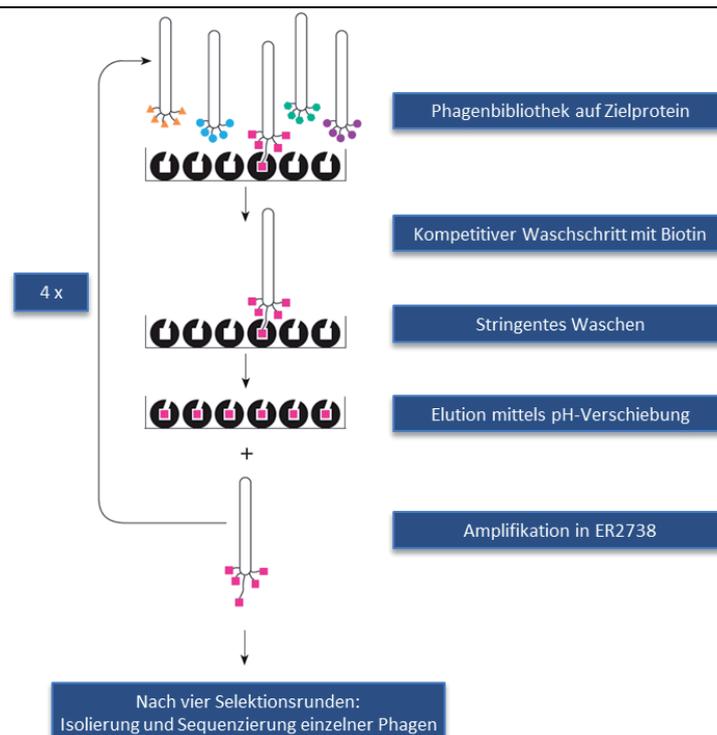
Der am häufigsten im Phagendisplay zum Einsatz kommende Phage ist der Bakteriophage M13. Dieser Phage zählt zu den filamentösen Bakteriophagen und zeichnet sich durch eine längliche, dünne Form sowie zirkuläre einzelsträngige DNA aus. Filamentöse Phagen werden zusätzlich noch in sogenannte Ff-Phagen unterteilt, die nur Bakterien mit einem F<sup>+</sup>-Plasmid infizieren können. Eine Besonderheit der filamentösen Phagen ist, dass sie zwar die replizierten Viruspartikel freisetzen, aber nicht lytisch sind und die Wirtszelle intakt lassen. Daher hat dieser

Phage zwar einen hohen Titer, die Kolonien der Phagen sind aber aufgrund der unversehrten *E. coli*-Zellen trüb statt klar wie bei lytischen Phagen (Hofschneider, 1963).

Eine verbreitete Anwendung im Phagendisplay ist die Selektion von Antikörpern, bei der verschiedene Fragmente, etwa Antigen-bindende Arme oder deren variablen Fragmente, auf Phagen oder *E. coli*- sowie Hefezellen präsentiert werden können (Azzazy und Highsmith, 2002).

Ein weiterer Einsatz ergibt sich aus der Selektion von Peptiden gegen diverse Zielproteine. Hierbei können Liganden gegen Rezeptoren, virale Proteine, Bindedomänen, Hitzeschockproteine etc. identifiziert werden. Diese Liganden sind vielseitig einsetzbar, um etwa die Sequenz bioinformatisch zu verarbeiten und durch Genomsequenzvergleich physiologische Interaktionspartner zu identifizieren. Zudem können die selektierten Peptide als *in vivo*- oder *in vitro*-Interaktionspartner eingesetzt werden (Kay *et al.*, 2001).

Die allgemeine Durchführung einer Phagendisplayselektion ist in Abbildung 7 zusammengefasst. Zur Immobilisierung der Zielproteine auf festen Oberflächen stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung, wobei sowohl hydrophobe Wechselwirkungen als auch kovalente Bindungen zum Einsatz kommen. Als weiterer Immobilisierungsmechanismus wird auch die hohe Streptavidin-Biotin-Affinität genutzt. Hierbei werden die biotinylierten Zielmoleküle auf einer Streptavidin-beschichteten Oberfläche gebunden (Menendez und Scott, 2005).

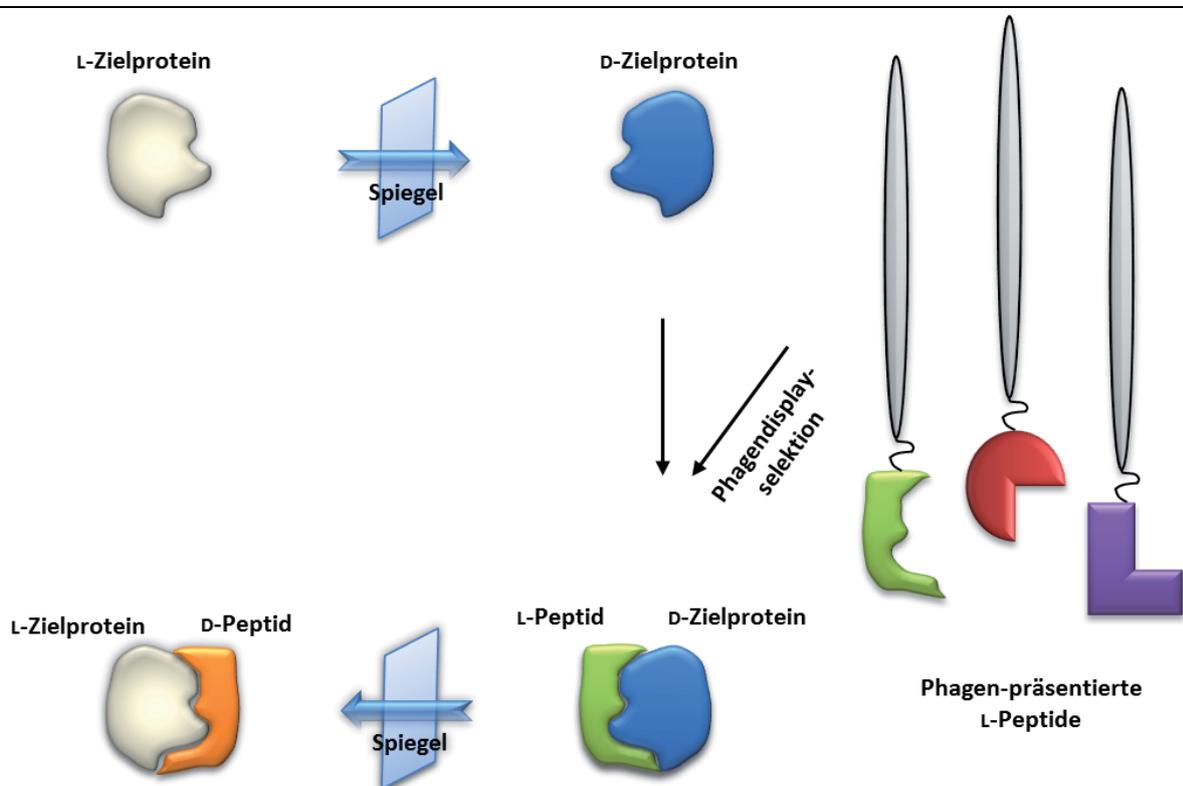


**Abbildung 7: Schematische Übersicht der Phagendisplayselektion.** Das biotinylierte Zielprotein wird auf einer Streptavidin-beschichteten Platte immobilisiert und die Phagenbibliothek appliziert. Nach ausreichender Inkubationszeit wird Biotin zugegeben, um Streptavidin-bindende Phagen kompetitiv zu verdrängen. Anschließend werden ungebundene Phagen abgenommen und die gebundenen Phagen stringent gewaschen, um unspezifische Binder zu entfernen. Die Elution der spezifisch-bindenden Phagen erfolgt mittels pH-Verschiebung in den aziden Bereich, um die Bindung der Phagen an das Zielprotein zu unterbrechen. Die freigewordenen Phagen werden abgenommen und durch Zugabe eines alkalischen Puffers neutralisiert. Nach der Amplifikation der Phagen in *ER2738 E. coli*-Zellen werden diese Phagen erneut auf das Zielprotein gegeben und selektiert. Nach vier Selektionsrunden werden einzelne Phagen isoliert und die Einzelstrang-DNA sequenziert (abgeändertes Schema aus der Phagendisplay-Anleitung von New England Biolabs, 2009).

Im optimalen Fall werden insgesamt vier Selektionsrunden durchgeführt, damit die Diversität der angereicherten Phagen durch Peptidsequenzaffinität zum Zielprotein gewährleistet wird und nicht etwa, weil Replikations-, Infektions- oder Elutionsvorteile bestimmter Phagen während der Amplifikation vorliegen (Kay *et al.*, 2001). Die Phagendisplayselektion zur Identifikation von A $\beta$ -Liganden ist eine effiziente Methode zur Selektion von affinen Bindern. Insbesondere die Selektion von Antikörpern als Einzelketten-Fragmente ist äußerst erfolgreich und kann bereits einige vielversprechende Ergebnisse vorweisen (Habicht *et al.*, 2007; Lafaye *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009). Die therapeutische und diagnostische Wirksamkeit lässt sich durch die Reduktion von Amyloidablagerungen (Medecigo *et al.*, 2010) sowie die spezifische Bindung an Plaques im Hirn transgener Mäuse (Larbanoix *et al.*, 2011) bestätigen.

### 1.2.3.1 SPIEGELBILD-PHAGENDISPLAY ZUR SELEKTION VON D-PEPTIDEN

Eine elegante Methode zur Optimierung der therapeutischen Eigenschaften von Peptiden bietet das sogenannte Spiegelbild-Phagendisplay. Hierbei wird die Chiralität von Aminosäuren zu Nutze gemacht, um letztendlich Peptide mit D-enantiomeren Aminosäuren aus der Selektion von spiegelbildlichen L-Peptiden abzuleiten. Die pharmakologischen Vorteile dieser sogenannten D-Peptide wurden bereits beschrieben (vgl. 1.2.2.1). Ein Schema für diese besondere Form des Phagendisplays ist in Abbildung 8 beschrieben.



**Abbildung 8: Prinzip eines Spiegelbild-Phagendisplays.** Die Strategie dieser modifizierten Form des Phagendisplays beruht auf der Chiralität von Aminosäuren. Statt des L-Zielproteins mit natürlich vorkommenden L-enantiomeren Aminosäuren wird dessen Spiegelbild als D-Zielprotein mit D-enantiomeren Aminosäuren eingesetzt. Phagen-präsentierte Peptide mit L-enantiomeren Aminosäuren (L-Peptid), die an das D-Zielprotein binden, können somit als spiegelbildliche D-enantiomere Aminosäureketten (D-Peptid) auch an das natürlich vorkommende L-Zielprotein binden (abgeändert nach Funke und Willbold, 2009).

Das Spiegelbild-Phagendisplay ist eine verhältnismäßig neue Methode, die wenigen Publikationen dazu sind aber äußerst erfolgversprechend. So wurde etwa das Peptid D1 selektiert, das interessante diagnostische Eigenschaften vorweist. Dieses D-Peptid färbt ausschließlich A $\beta$ -Amyloidplaques in Hirnschnitten von Alzheimerpatienten an, während Amyloidosen aus anderen Krankheiten nicht erkannt werden (Wiesehan *et al.*, 2003). Diese Spezifität ist ausgesprochen wichtig, um bei der bildgebenden Diagnose der AD die Abgrenzung von anderen Demenzkrankheiten zu gewährleisten.

## 2 ZIELSETZUNG

Die Alzheimersche Demenz ist eine neurodegenerative Krankheit, die auf einer Fehlfaltung und Anreicherung von gesundheitsschädlichen Proteinen im Gehirn beruht. Als das ätiologisch relevante Protein gilt das A $\beta$ -Peptid, dessen Aggregation zu löslichen Oligomeren als treibender Faktor gesehen wird. A $\beta$ -Oligomere lösen zahlreiche zelltoxische Prozesse aus, die letztendlich den Verlust von Neuronen bewirken und eine Verschlechterung der kognitiven und affektiven Fähigkeiten zur Konsequenz haben. Dabei ist die Interaktion von verschiedenen A $\beta$ -Spezies miteinander möglich, die von 40 bzw. 42 Aminosäuren langen Peptidketten bis hin zu Pyroglutamatisoformen reichen. Bisher ist weder eine frühzeitige, sichere Diagnose noch eine kausale Therapiemöglichkeit verfügbar, so dass die Versorgung der Patienten immer noch sehr schwierig und ungenügend ist. Innovative Diagnose- und Therapiemethoden sind daher von großer Bedeutung und stellen den Hauptschwerpunkt der gegenwärtigen Alzheimerforschung dar. Folgende Ziele wurden für diese Dissertation gesetzt:

- Zur Grundlagenforschung wurde in Kooperation mit der Probiodrug AG (Halle) die *in vitro*-Aggregation von unterschiedlichen A $\beta$ -Isoformen mittels dynamischer Lichtstreuung charakterisiert und verglichen, um zur Aufklärung der Pathogenese beizutragen.
- Es wurde ein Präparationsprotokoll für Monomere, Oligomere und Fibrillen etabliert. Anschließend wurden, in Kooperation mit Carsten Korth (Institut für Neuropathologie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf), die freien, A $\beta$ -bindenden Antikörper in Seren von Demenz- und Kontrollpatienten bzgl. der Bindung an unterschiedliche Konformere quantitativ bestimmt. Unterschiede zwischen den Gruppen können mögliche Erklärungsansätze für die unterschiedliche Suszeptibilität der Patienten für die toxischen Formen von A $\beta$  liefern.
- Analog erfolgte die Quantifizierung von freien, A $\beta$ -bindenden Antikörpern in Seren transgener Mäusen nach einer aktiven immuntherapeutischen Behandlung mit Affitopen in Kooperation mit der AFFIRIS AG (Wien, Österreich). Es sollte gezeigt werden, ob die Antikörperaktivität gezielt gegen bestimmte toxische A $\beta$ -Formen moduliert werden konnte. Dies würde eine gerichtete und präzise Behandlung der AD mit definierten therapeutischen Zielkonformeren ermöglichen.
- Es wurden therapeutische und diagnostische Ansätze konzipiert und evaluiert. Hierfür wurden mittels Spiegelbild-Phagendisplay D-Peptide selektiert, die entweder als diagnostische Sonden oder therapeutische Substanzen einsetzbar sind. Im Fokus waren unter anderem toxische Oligomere, um eine optimale Detektion und Modifikation der AD im Anfangsstadium zu ermöglichen. Es wurde dabei gegen die Isoformen A $\beta$ 1-42 und A $\beta$ pE3-x selektiert, um mehrere kausale Aspekte der AD-Pathogenese zu berücksichtigen. Die selektierten D-Peptide wurden bzgl. ihrer plaquebindenden sowie aggregationshemmenden Eigenschaften analysiert, um den diagnostischen sowie therapeutischen Nutzen dieser Peptide zu evaluieren.

## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 MATERIAL

#### 3.1.1 PEPTIDE UND PEPTIDVERBINDUNGEN

Folgende synthetische A $\beta$ -Peptide wurden in dieser Dissertation verwendet. Die Lyophilisate wiesen eine Reinheit von mindestens 95 % auf und wurden bei -20 °C gelagert.

**Tabelle 1: Auflistung der synthetischen A $\beta$ -Peptide.** Angegeben sind Isoformbezeichnung, Aminosäuresequenz mit Amino- und Carboxy-terminalen Modifikationen, Enantiomerform, Anwendung und Herstellerfirma. Es gilt die Ein-Buchstaben-Kodierung der Aminosäuren. Abk.: Bio = Biotin; p = pyro; PEG = Polyethylenglykol.

Isoform	Aminosäuresequenz	Enantiomer	Anwendung	Hersteller
A $\beta$ 1-42	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA-OH			Bachem (Bubendorf, Schweiz)
Bio-A $\beta$ 1-42	Bio-DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA-OH	L	ELISA	AnaSpec
A $\beta$ 1-42-Bio	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA-K-Bio			(Fremont, USA)
A $\beta$ 1-42	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA-OH			JPT
Bio-A $\beta$ 1-42	Bio-A-DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA-OH	D	Phagen- display	(Berlin)
A $\beta$ 1-40	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV-OH			
A $\beta$ 1-42	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA-OH			
A $\beta$ E3-40	EFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV-OH	L	Dynamische Lichtstreuung	Probiodrug AG
A $\beta$ pE3-40	pEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV-OH			(Halle)
A $\beta$ pE3-40	pEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV-OH			
A $\beta$ pE3-38-Bio	pEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG-PEG-Bio	D	Phagen- display	
A $\beta$ pE3-38	pEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG-OH			

Folgende D-Peptide wurden in dieser Dissertation mittels Phagendisplay selektiert und von der Firma JPT (Berlin) synthetisiert. Die Lyophilisate wiesen eine Reinheit von mindestens 95 % auf und wurden bei -20 °C gelagert.

**Tabelle 2: Auflistung der synthetischen D-Peptide.** Angegeben sind Peptidbezeichnung, Aminosäuresequenz, Carboxy-terminale Konjugate und Molekulargewicht. Alle Aminosäuren bis auf Glycin und FAM-gekoppeltes Lysin lagen als D-Enantiomer vor. Es gilt die Ein-Buchstaben-Kodierung der Aminosäuren. Abk.: FAM = 5(6)-Carboxyfluoreszein.

Bezeichnung	Aminosäuresequenz	Konjugat	Molekulargewicht (Da)
D4	H-KMEHPNHPPPQR-NH <sub>2</sub>	-	1467
D4-F	H-KMEHPNHPPPQR-K-(FAM)-NH <sub>2</sub>	5(6)-Carboxyfluoreszein	1954
D5	H-NGAPNKIPRDRE-NH <sub>2</sub>	-	1365
D5-F	H-NGAPNKIPRDRE-K-(FAM)-NH <sub>2</sub>	5(6)-Carboxyfluoreszein	1852
D6	H-AGERLKFIDEHV-NH <sub>2</sub>	-	1412
D6-F	H-AGERLKFIDEHV-K-(FAM)-NH <sub>2</sub>	5(6)-Carboxyfluoreszein	1900
D7	H-HTRFEYVYHMS-NH <sub>2</sub>	-	1632
D7-F	H-HTRFEYVYHMS-K-(FAM)-NH <sub>2</sub>	5(6)-Carboxyfluoreszein	2199
DO1	H-SQPLWPP-NH <sub>2</sub>	-	823
DO1-F	H-SQPLWPP-K-(FAM)-NH <sub>2</sub>	5(6)-Carboxyfluoreszein	1310
DO2	Acetyl-QPHSRLP-NH <sub>2</sub>	-	875
DO2-F	H-QPHSRLP-K-(FAM)-NH <sub>2</sub>	5(6)-Carboxyfluoreszein	1362
DO3	H-SGWHYNWQYWVK-NH <sub>2</sub>	-	1740
DO3-F	H-SGWHYNWQYWVK-K-(FAM)-NH <sub>2</sub>	5(6)-Carboxyfluoreszein	1095

### 3.1.2 PUFFER, MEDIEN UND KITS

In den Tabellen 3 und 4 sind die verwendeten Puffer und Medien aufgelistet. Zum Ansetzen wurde ausschließlich hochreines, zweifach-deionisiertes Wasser verwendet. Die Sterilisation erfolgte durch Autoklavieren für 20 Minuten bei 1,2 bar und 121 °C.

**Tabelle 3: Auflistung der Puffer.** Angegeben sind Bezeichnung, Zusammensetzung mit Angaben zur Molarität und zum pH sowie Anwendung. . Abk.: IPTG = Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid; X-Gal = 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid.

Bezeichnung	Zusammensetzung	Anwendung
PBS	140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; pH 7,4	
PBS-T	PBS; 0,1 % (v/v) Tween-20	Dilution und Waschen
TBS	25 mM Tris/HCl; 0,9 % NaCl; pH 7,4	
TBS-T	TBS; 0,1 % (v/v) Tween-20	
Immobilisierungspuffer	100 mM NaHCO <sub>3</sub> ; pH 9,3	
Blockpuffer	PBS; 1 % (w/v) BSA	ELISA
Dilutionspuffer	PBS-T; 0,1 % (w/v) BSA	
Substratpuffer	50 mM Phosphatziptrat; 10 % (v/v) Tetramethylbenzidin in DMSO	
Blockpuffer	TBS-T; 3 % (w/v) BSA	Western- und Dot-Blot
Elutionspuffer	50 mM NaP <sub>i</sub> ; 150 mM NaCl; 0,6 % (v/v) Tween-20; pH 7,4	Gelfiltration
Phosphatpuffer	50 mM NaP <sub>i</sub> ; 100 mM NaCl; pH 7,5	
Natriumhydroxid	100 mM	Dynamische Lichtstreuung
Salzsäure	100 mM	
Tris-HCl	1 M Tris-HCl; pH 9,1	
Glycin-HCl	200 mM Glycin-HCl; pH 2,2	
PEG/NaCl	20 % (w/v) Polyethylenglykol-8000; 2,5 M NaCl	Phagendisplay
IPTG/X-Gal	Dimethylformamid; 5 % (w/v) IPTG; 4 % (w/v) X-Gal	
Natriumacetatpuffer	3 M Natriumacetat:Tris-EDTA 10:1	

**Tabelle 4: Auflistung der Medien.** Angegeben sind Bezeichnung und Zusammensetzung. Abk.: IPTG = Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid; Tet = Tetrazyklin; X-Gal = 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid.

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB-Tet-Flüssigmedium	1 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefe; 0,5 % (w/v) NaCl; vor Gebrauch 0,1 % (v/v) Tetrazyklin
LB-Tet-IPTG/X-Gal-Festmedium	1 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefe; 0,5 % (w/v) NaCl; 1,5 % (w/v) Agar; 0,1 % (v/v) Tetrazyklin; 0,1 % (v/v) IPTG/X-Gal
TOP-Agar	1 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefe; 0,5 % (w/v) NaCl; 0,7 % (w/v) Agarose

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders beschrieben, von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) bezogen.

Die in Tabelle 5 aufgezählten Kits wurden für verschiedene Anwendungen eingesetzt.

**Tabelle 5: Auflistung der Kits.** Angegeben sind Bezeichnung, Komponenten, Anwendung und Hersteller.

Bezeichnung	Komponenten	Anwendung	Hersteller
MicroBCA-Kit	Lösung MA	Proteinkonzentrations- bestimmung	Thermo Scientific (Waltham, USA)
	Lösung MB		
	Lösung MC		
SuperSignal West Dura	Luminol/Verstärkerlösung Peroxidaselösung	Substratdetektion im Western- und Dot-Blot	
Amyloid Stain, Congo Red Kit	Natriumchlorid; 80 %	Histologische Färbungen	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
	Natriumhydroxid; 1 %		
	Kongorotlösung; 0,2 %		
Phagedisplay	Peptidbibliotheken 12- und 7-mer	Phagedisplay	New England Biolabs (Ipswich, USA)
	Biotin, 10 mM		
LMW Gel Filtration Calibration Kit	Conalbumin (75 kDa)	Kalibration der Gelfiltrationssäule	GE Healthcare (Little Chalfont, UK)
	Carboanhydrase (29 kDa)		
	Ribonuklease (14 kDa)		
	Aprotinin (6,5 kDa)		

### 3.1.3 ANTIKÖRPER UND SEREN

Im Rahmen dieser Dissertation wurden unterschiedliche Antikörper eingesetzt. Eine Auflistung aller verwendeten Antikörper findet sich in folgender Tabelle.

**Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Antikörper.** Angegeben sind Bezeichnung, Antigen, Spezifität, Konjugat und Hersteller.

Bezeichnung	Antigen	Spezifität	Konjugat	Hersteller
6E10	Humanes A $\beta$	Maus-anti-A $\beta$	—	Covance (Princeton, USA)
NAB 228				Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
A11	Oligomer	Hase-anti-Oligomer		Millipore (Billerica, USA)
goat- $\alpha$ -mouse	IgG1	Ziege-anti-Maus		Southern Biotech (Birmingham, USA)
mouse- $\alpha$ -human		Maus-anti-Human		
Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	IgG (H+L)	Ziege-anti-Maus	HRP	Thermo Scientific (Waltham, USA)
HRP/Anti-M13	M13	Maus-anti-gp8		GE Healthcare (Little Chalfont, UK)
Sheep Anti FITC:HRP	FITC	Schaaf-anti-FITC		AbD Serotec (Düsseldorf)

Zusätzlich wurden Seren sowohl murinen als auch humanen Ursprungs verwendet.

An transgenen Tg2576-Mäusen wurde eine aktive immuntherapeutische Behandlung mit den beiden Affitopen AD03 und AD02 durchgeführt. Im Alter von 6 Monaten wurden die Tiere sechsmal im Abstand von einem Monat immunisiert. Anschließend erfolgte die Blutentnahme im Alter von 12 bis 14 Monaten. Die verschiedenen untersuchten Gruppen sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

**Tabelle 7: Übersicht der murinen Seren.** Angegeben sind die Serennummer und die jeweilige Behandlungsgruppe mit dem entsprechenden Affitop.

Serennummer	Affitop-Gruppe	Serennummer	Affitop-Gruppe	Serennummer	Affitop-Gruppe
MV04_08 5/3767	Keine Immunisierung	MV02_09 2/5991	AD03	MV02_09 4/6079	AD02
MV04_08 5/3828		MV02_09 2/5953		MV02_09 4/6066	
MV04_08 5/3829		MV02_09 2/5952		MV02_09 4/6063	
MV04_08 5/3830		MV02_09 2/5950		MV02_09 4/5987	
MV04_08 5/3859		MV02_09 2/5949		MV02_09 4/6010	

Zur Beurteilung der Antikörperaktivität in Seren wurden humane Seren aus unterschiedlichen Patientengruppen untersucht. Diese sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

**Tabelle 8: Übersicht der humanen Seren.** Angegeben sind Serennummer und Befundgruppe. Abk.: AD = Alzheimersche Demenz; MCI-CO = MCI an der Basislinie, kognitiv unauffällig bei Folgeuntersuchung, regressive MCI; MCI-MCI = stabile MCI; MCI-AD = progressive MCI.

Serennummer	Befund
AA-1006, AA-1007, AA-1010, v-1004, v-890, v-96	Kontrolle
EX-1018, EX-1030, EX-1079, EX-1086	MCI-CO
EX-1032, EX-1038, EX-1039, v-1008, v-279, v-279	MCI-MCI
EX-1005, EX-1019, EX-1078, F-809, F-823, v-1017, v-369	MCI-AD
ARI-151, F-286, F-447, F-799, F-924, F-940	AD

## 3.2 METHODEN

### 3.2.1 DYNAMISCHE LICHTSTREUUNG

A $\beta$ 1-40, A $\beta$ 1-42, A $\beta$ 3-40 und A $\beta$ pE3-40 wurden in 99 % 1,1,1,3,3,3,-Hexafluoro-2-propanol (HFIP; Fluka, Neu-Ulm) zu einer Konzentration von 1 mM aufgenommen und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die A $\beta$ -Lösungen wurden zu je 100  $\mu$ l aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Für die Präparation von A $\beta$  ohne Aggregationskeime wurde das HFIP in den Aliquots über Nacht abgedampft. Der Peptidfilm wurde für 10 Minuten in 100 mM Natriumhydroxid (NaOH) angelöst und mit dem Phosphatpuffer zu einer A $\beta$ -Endkonzentration von 5  $\mu$ M aufgefüllt. Durch die Zugabe von 100 mM Salzsäure (HCl) und der daraus resultierenden pH-Verschiebung wurde die Aggregation gestartet. Sämtliche Puffer und Lösungen wurden zuvor gefiltert.

Die Messungen erfolgten am DynaPro Dynamischen Lichtstreuungssystem (Protein Solutions, Lakewood, USA) in einer Quartzküvette mit 3 mm Lichtweg (Hellma, Mühlheim). Messwerte wurden bei Raumtemperatur und einem festen Winkel von 90° aufgenommen. Die Datenakquisition erfolgte alle 3 Sekunden über einen Zeitraum von 10 Minuten mit einem 655,6 nm Laser. Die Analyse und Durchschnittsberechnung erfolgte mit der Software Dynamic V6 (Protein Solutions, Lakewood, USA). Nach der Berechnung der Autokorrelationsfunktion und der Regularisationsanpassung wurde das Größenverteilungsprofil ermittelt.

### 3.2.2 PRÄPARATION UND CHARAKTERISIERUNG VON A $\beta$ -MONOMEREN, -OLIGOMEREN UND -FIBRILLEN

#### 3.2.2.1 GELFILTRATIONSCHROMATOGRAPHIE VON A $\beta$ -MONOMEREN UND -OLIGOMEREN

Zur Präparation von A $\beta$ -Oligomeren und -Monomeren wurde eine Gelfiltrationschromatographie durchgeführt. Hierfür wurde das Protokoll von Johansson *et al.* (2006) in abgeänderter Form verwendet. A $\beta$  wurde zuvor in HFIP zu einer Konzentration von 2 mg/ml aufgenommen und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die entsprechende Menge wurde dann aliquotiert und das HFIP in der Vakuumzentrifuge abgedampft (1 Stunde, Raumtemperatur). Restliche Lösungsmittelreste wurden durch offene Inkubation über Nacht entfernt. Dieser Peptidfilm wurde im Elutionspuffer zu einer Konzentration von etwa 400 bis 450  $\mu$ M aufgenommen und auf eine Superdex 75 10/300 Säule (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) appliziert. Die unterschiedlichen Fraktionen wurden bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,6 ml/min zu je 200  $\mu$ l aliquotiert. Die Absorption wurde bei 214 nm detektiert. Die Oligomere eluierten bei 8 ml und Monomere bei etwa 14,5 ml.

Die Kalibration der Säule erfolgte nach Angaben des Herstellers (LMW Gel Filtration Calibration Kit; GE Healthcare, Little Chalfont, UK).

### **3.2.2.2 PRÄPARATION VON FIBRILLEN**

Zusätzlich zu den Oligomeren und Monomeren wurden Fibrillen präpariert. Hierfür wurde der Peptidfilm zu ca. 600 µg/ml in 1xPBS aufgenommen und für 24 Stunden bei 37 °C sowie 350 rpm inkubiert. Anschließend wurde diese Fibrillenpräparation zentrifugiert (20 Minuten, 13000 rpm, Raumtemperatur) und das Pellet vorsichtig im Gelfiltrations-Elutionspuffer resuspendiert, um eine homogene Mischung der Fibrillen zu erhalten.

### **3.2.2.3 PROTEINKONZENTRATIONSBESTIMMUNG IN A $\beta$ -MONOMEREN, -OLIGOMEREN UND -FIBRILLEN**

Zur Bestimmung der Peptidkonzentration in den Monomer- und Oligomer-Fractionen sowie in der Fibrillenprobe wurde eine Bicinchoninsäure-Proteinkonzentrationsbestimmung mit den verschiedenen Präparationen durchgeführt. Die generelle Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers (MicroBCA Assay; Thermo Scientific, Waltham, USA). Zuerst wurde ein Aliquot der verschiedenen Peptidlösungen im Verhältnis 1:1 mit Harnstoff (Endkonzentration 3 M) versetzt, gründlich gevortext und anschließend für 30 Minuten bei 60 °C inkubiert, um die Aggregate in ihre monomere Form zurückzuführen. Zur Erstellung der Eichgerade wurde als Standardprotein Rinderserumalbumin Fraktion V (*Bovine serum albumin*, BSA; Roche, Basel, Schweiz) in den Konzentrationen 0, 10, 20 und 40 µg/ml verwendet und die Absorption in Abhängigkeit der Konzentration aufgetragen. Anhand dessen wurde die Konzentration der Monomere, Oligomere und Fibrillen bestimmt.

### **3.2.2.4 THIOFLAVIN T-TEST MIT A $\beta$ -MONOMEREN, -OLIGOMEREN UND -FIBRILLEN**

Zur Bestimmung des relativen Fibrillengehalts wurde Thioflavin T (ThT; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) als  $\beta$ -Faltblatt-bindender Fluoreszenzfarbstoff verwendet. Durch die Anlagerung von ThT an fibrilläre  $\beta$ -Faltblatt-reiche Strukturen lässt sich die Fluoreszenzemission mit dem relativen Fibrillengehalt in der Probe korrelieren. Zur Bestimmung des Fibrillengehalts in den Monomer-, Oligomer- und Fibrillenproben wurden je 4 µM der jeweiligen Lösungen mit 10 µM ThT versetzt und mit dem Elutionspuffer auf 50 µl aufgefüllt. Für die Pufferkontrollen wurden je eine 10 µM ThT- sowie 1xPBS-Lösung ohne A $\beta$ 1-42 angesetzt. Die Proben wurden zu jeweils 50 µl in eine 384-Well Polypropylenplatte (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) pipettiert. Die Messung der Fluoreszenzintensität ( $\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 440 \text{ nm}$ ) erfolgte bei Raumtemperatur. Bei der Auswertung wurde ein Mittelwert aus der vierfachen Bestimmung gebildet und davon anschließend die Fluoreszenz der ThT-Kontrolle abgezogen.

### 3.2.2.5 DOT-BLOT MIT A $\beta$ -MONOMEREN, -OLIGOMEREN UND -FIBRILLEN

Für die Dot-Blot Analysen wurden je 13 ng der Monomer-, Oligomer- und Fibrillenproben auf eine Nitrozellulosemembran (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) pipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur immobilisiert. Nach dem Blockieren mit 10 mg/ml BSA und anschließendem 15-minütigem Waschen erfolgte die Inkubation mit dem nicht-konformerspezifischen anti-A $\beta$ -Antikörper NAB 228 (1:1000). Danach wurde dreimal für 5 Minuten gewaschen und mit dem Ziege-anti-Maus HRP-Konjugat (1:10000; Thermo Scientific, Waltham, USA) inkubiert. Alle Inkubationsschritte erfolgten für 1 Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln. Als Wasch- und Inkubationspuffer wurde TBS-T eingesetzt. Die Substratdetektion erfolgte mit dem Kit SuperSignal West Dura nach Angaben des Herstellers (Thermo Scientific, Waltham, USA).

### 3.2.3 WESTERN-BLOT MIT A $\beta$ -MONOMEREN, -OLIGOMEREN UND -FIBRILLEN

Die Monomer-, Oligomer- und Fibrillenproben wurden mittels semi-nativer Proteingelelektrophorese nach Angaben des Herstellers aufgetrennt (Invitrogen, Carlsbad, USA). Hierfür wurden vorgefertigte 4-12%-ige Bis-Tris-Gradientengele verwendet. Die Proben wurden im Lithiumdodecylsulfat 1x-Ladepuffer nach Angaben des Herstellers ins Sammelgel aufgetragen. Nach 45 Minuten bei 200 V mit 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure als 1x-Laufpuffer wurde der Elektrophoreselauf beendet und der Proteintransfer auf eine PVDF-Membran (Roth, Karlsruhe) in einer Semi-Dry Blotkammer (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Der Transfer erfolgte für 40 Minuten bei 80 mA. Die Membran wurde in 3 % BSA für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und die anschließende Proteindetektion erfolgte mit dem nicht-konformerspezifischen anti-A $\beta$ -Antikörper NAB 228 (1:1000, 4 °C, über Nacht). Nach einem zweimal 5- und einmal 15-minütigem Waschschrift wurde anschließend das Ziege-anti-Maus-HRP-Konjugat (1:10000, Raumtemperatur, 1 Stunde; Thermo Scientific, Waltham, USA) zugegeben. Als Wasch- und Inkubationspuffer wurde TBS-T eingesetzt. Die Substratdetektion erfolgte mit dem Kit SuperSignal West Dura nach Angaben des Herstellers (Thermo Scientific, Waltham, USA).

#### 3.2.3.1 ELISA ZUR DETEKTION VON A $\beta$ -MONOMEREN, -OLIGOMEREN UND -FIBRILLEN

Die Monomer-, Oligomer- und Fibrillenproben wurden im ELISA eingesetzt und detektiert. Hierfür wurden Amino-terminal biotinylierte A $\beta$ -Peptide zu je 0,5 und 5  $\mu$ g/ml in Streptavidin-beschichteten 96-Well Polystyrolplatten (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln für 1 Stunde immobilisiert. Die Blockierung erfolgte mit dem ELISA-Blockpuffer. Danach wurde der nicht-konformerspezifische anti-A $\beta$ -Antikörper 6E10 eingesetzt (1:1000). Anschließend wurde das Ziege-anti-Maus-HRP-Konjugat (1:10000; Thermo Scientific, Waltham, USA) zugegeben. Alle Inkubationsschritte erfolgten für 1 Stunde bei

Raumtemperatur unter leichtem Schütteln und dreifachen Waschsritten mit PBS-T zwischen den einzelnen Inkubationen. Abschließend wurde die Substratdetektion durchgeführt, bei der Tetramethylbenzidin-Lösung zu den Wells gegeben und der Substratumsatz anhand des Farbwechsels beobachtet wurde. Bei ausreichender Farbentwicklung nach etwa 5 bis 10 Minuten wurde die Reaktion durch die Zugabe einer 2 M Schwefelsäurelösung gestoppt und die Absorption bei 450 nm gemessen.

### **3.2.4 PHAGENDISPLAY**

#### **3.2.4.1 PRÄPARATION VON VERSCHIEDENEN KONFORMEREN VON PYROGLUTAMAT-A $\beta$**

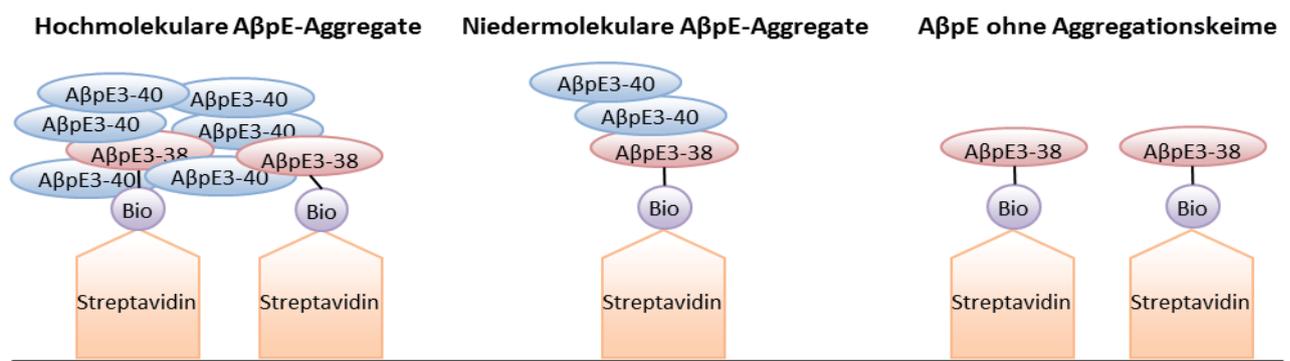
Sämtliche Pyroglutamat-A $\beta$ -Peptide wurden in HFIP zu einer Konzentration von 1 mM aufgenommen und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend entsprechend des jeweiligen Präparationsprotokolls aliquotiert. Das HFIP wurde über Nacht abgedampft und alle Aliquots bis zum weiteren Gebrauch bei -20 °C gelagert. Die Immobilisierung der verschiedenen Präparationen erfolgte auf Streptavidin-beschichteten 96-Well Polystyrolplatten (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln.

Für die Präparation von hochmolekularen Aggregaten von Pyroglutamat-A $\beta$  wurden A $\beta$ pE3-38-Bio sowie A $\beta$ pE3-40 zu jeweils 10 sowie 100  $\mu$ M in HFIP verdünnt. Anschließend wurden beide Peptide in einem Verhältnis von 1:20 zusammen zu 15  $\mu$ g aliquotiert. Zur Präparation von hochmolekularen Aggregaten wurde der Peptidfilm in 5  $\mu$ l Dimethylsulfoxid angelöst und in 95  $\mu$ l 1xPBS aufgenommen. Anschließend erfolgte die Inkubation bei 37 °C und 500 rpm für 3 Tage, gefolgt von einer 1-stündigen Immobilisierung.

Für die Präparation von niedermolekularen Aggregaten wurden ebenfalls A $\beta$ pE3-38-Bio und A $\beta$ pE3-40 eingesetzt. Zunächst wurde 871 ng A $\beta$ pE3-38-Bio als Peptidfilm in NaOH angelöst und in Natriumphosphat (NaP<sub>i</sub>) aufgenommen und zu 87 ng pro Well aliquotiert. Nach einer 20-minütigen Immobilisierung wurde die Lösung abgenommen und verworfen. Anschließend wurde 871 ng A $\beta$ pE3-40 ebenfalls in NaOH angelöst und in 250  $\mu$ l NaP<sub>i</sub> aufgenommen, zu dem prä-immobilisierten Well gegeben und für weitere 2 Stunden immobilisiert.

Für die Präparation von Peptiden ohne Aggregationskeime wurde die 1 mM Stammlösung von A $\beta$ pE3-38-Bio in HFIP zu 1  $\mu$ M weiterverdünnt und zu je 871 ng aliquotiert. Nach dem Abdampfen vom HFIP über Nacht wurde der Peptidfilm in 53  $\mu$ l NaOH angelöst, 947  $\mu$ l NaP<sub>i</sub> zugegeben und jeweils 100  $\mu$ l mit 87 ng A $\beta$  in die Wells pipettiert. Es folgte eine Immobilisierung für 30 Minuten.

Eine Übersicht über die verschiedenen Präparationen und deren Zusammensetzung ist in Abbildung 9 zusammengestellt.



**Abbildung 9: Schematische Darstellung der immobilisierten AβpE-Peptidpräparationen.** Zusammengefasst sind die unterschiedlichen AβpE-Peptid-Bestandteile der Präparationen für die hoch- und niedermolekularen Aggregate sowie Aggregationskeim-freien AβpE-Präparationen für das Phagendisplay. Die Immobilisierung erfolgte in Streptavidin-beschichteten 96-Well Polystyrolplatten (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich).

### 3.2.4.2 PRÄPARATION VON Aβ1-42-OLIGOMEREN

Zur Präparation von Aβ-Oligomeren wurde eine Gelfiltrationschromatographie durchgeführt (vgl. 3.2.2.1). Hierfür wurde Aβ1-42 mit einem 1/10 Anteil des biotinylierten Aβ1-42-Peptids verwendet. Für die Phagendisplayselektion wurde daraufhin eine Oligomerkonzentration von 10 µg/ml in 100 mM NaHCO<sub>3</sub> (100 mM, pH 9,3) erstellt und in einem Volumen von 100 µl pro Well mit 1 µg immobilisiert. Nach einer 1-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln wurde die Lösung verworfen und das Well nach einem einmaligen Waschschrift mit dem Immobilisierungspuffer im selbigen Puffer über Nacht bei 4 °C bis zum weiteren Einsatz gelagert.

### 3.2.4.3 DURCHFÜHRUNG DER SELEKTIONSRUNDEN

Für jedes immobilisierte Zielpeptid wurden je vier Selektionsrunden durchgeführt. Die Selektionen erfolgten modifiziert nach Anleitung des Herstellers (Phage Display Libraries Instruction Manual, New England Biolabs, Ipswich, USA). Nach einem 1-stündigen Blockschrift der Wells mit 10 mg/ml BSA in TBS-T erfolgte das sechsmalige Waschen der Platten mit TBS-T. Anschließend wurden pro Well  $2 \times 10^{11}$  Phagen in 100 µl TBS eingesetzt und 20 Minuten lang inkubiert. Anschließend erfolgte die direkte Zugabe von Biotin in die Wells (Endkonzentration 100 mM in TBS) für weitere 5 Minuten zur kompetitiven Verdrängung von Phagen mit Streptavidin-bindenden Peptidsequenzen. Diese Inkubationslösung wurde abgenommen und die Wells zehnmals mit TBS-T gewaschen. Die Elution mittels pH-Verschiebung erfolgte durch Zugabe von 100 µl Glycin-HCl (pH 2,2). Die Neutralisation der eluierten Phagenlösung erfolgte mit 25 µl Tris-HCl (pH 9,1). Die anschließende Bestimmung des Output-Titers wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt (Phage Display Libraries Instruction Manual; New England Biolabs, Ipswich, USA). Ein Teil der Phagenlösung wurde hierzu entsprechend in 100 µl LB-Lösung verdünnt und mit 100 µl einer ER2738 *E. coli*-Kultur (o.D. 0,6) sowie 800 µl TOP-Agar auf einer

LB-Tet-IPTG/X-Gal-Platte ausplattiert. Es wurden jeweils Verdünnungen von  $10^{-2}$  bis  $10^{-9}$  ausplattiert. Die Inkubation der Kolonien erfolgte über Nacht bei 37 °C.

Die Amplifikation der Phagen erfolgte nach modifizierten Angaben des Herstellers. Einer 20 ml ER2738 *E. coli*-Kultur (o.D. 0,1) wurden die restlichen eluierten Phagen zugegeben. Die Amplifikation erfolgte für 4,5 Stunden bei 37 °C und 160 rpm. Zusätzlich wurden einmalig  $1 \times 10^{11}$  Phagen aus der Phagenbibliothek parallel dazu amplifiziert, um später die Affinität der nicht-selektierten Phagen für das Zielpeptid beurteilen zu können. Anschließend wurde die Bakterienkultur zentrifugiert (20 Minuten, 5000 rpm, 4 °C) und 1 ml des Überstands für spätere Anreicherungs-ELISA bei 4 °C verwahrt. Der Rest wurde durch Zugabe von 7 ml der PEG/NaCl-Lösung über Nacht bei 4 °C gefällt. Am folgenden Tag wurde die Lösung zentrifugiert (60 Minuten, 5000 rpm, 4 °C). Das Pellet wurde in 1 ml TBS gelöst und nochmals zentrifugiert (5 Minuten, 10000 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde abgenommen und mit 200 µl der PEG/NaCl-Lösung versetzt. Nach einer 1-stündigen Inkubation auf Eis folgte der letzte Zentrifugations-schritt (20 Minuten, 13000 rpm, 4 °C). Zur Resuspension des Pellets wurde 100 µl TBS verwendet. Die Input-Titer Bestimmung erfolgte ebenfalls nach Angaben des Herstellers analog zum Output-Titer mit den Verdünnungen  $10^{-8}$  bis  $10^{-15}$ . Die Zahl der *plaque forming units* wurde ermittelt und in den sukzessiven Selektionsrunden wie zu Beginn ca.  $2 \times 10^{11}$  Phagen eingesetzt.

#### **3.2.4.4 ANREICHERUNGS-ELISA**

Der Anreicherungs-ELISA dient zur Untersuchung der Affinität der gesamten Phagenpopulation für das Zielpeptid über den kompletten Selektionsverlauf. Die Präparation der Zielpeptide erfolgte exakt wie diejenige der eigentlichen Selektionen. Parallel dazu wurden nicht-immobilisierte, leere Streptavidin-beschichtete Wells eingesetzt, die zur Beurteilung der unspezifischen Bindung der Phagen an die Polystyroloberfläche sowie das Streptavidin dienen. Nach der Immobilisierung wurden alle Wells mit 10 mg/ml BSA in TBS-T geblockt. Anschließend erfolgte die Zugabe der jeweiligen Phagenlösungen aus den verschiedenen Runden 1:1 versetzt mit dem Blockpuffer. Der anschließende HRP-konjugierte Antikörper ist spezifisch für das Oberflächenprotein gp8 vom M13-Phagen (1:5000, TBS-T). Alle Inkubationsschritte erfolgten für 1 Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln mit fünffachen Waschschritten zwischen den jeweiligen Inkubationsschritten. Als Waschpuffer diente TBS-T. Die Substratdetektion erfolgte wie in Kapitel 3.2.3.1 beschrieben.

#### **3.2.4.5 EINZELPHAGENAMPLIFIKATION**

Die Amplifikation der Phagen diente für weitere Einzelphagen-ELISA Versuche sowie zur Präparation der Phagen-DNA. Sie erfolgte modifiziert nach Angaben des Herstellers (Phage Display Libraries Instruction Manual; New England Biolabs, Ipswich, USA). Einzelne Phagenkolonien von den jeweiligen Output-Titerplatten der vierten Runde wurden in 5 ml einer ER2738 *E. coli*-Kultur (o.D. 0,1) angeimpft und amplifiziert (4,5 Stunden, 160 rpm, 37 °C).

Anschließend wurde die gesamte Bakterienkultur zentrifugiert (20 Minuten, 5000 rpm, 4 °C). Der Überstand mit den amplifizierten Phagen wurde daraufhin für verschiedene weitere Anwendungen aufgeteilt: Je 0,5 ml wurden 1:1 mit 80 % Glycerin versetzt und für den weiteren Gebrauch bei -80 °C gelagert; je 2 ml wurden für die DNA-Präparation und Einzelphagen-ELISA aliquotiert.

### **3.2.5 EINZELPHAGEN-ELISA**

Der Einzelphagen-ELISA diente zur Analyse der Spezifität und Affinität von einzelnen Klonen für das Zielpeptid. Er erfolgte analog zum Anreicherungs-ELISA mit dem einzigen Unterschied, dass statt der Phagenamplifikation aus den jeweiligen Runden die Amplifikate der Einzelphagenklone eingesetzt wurden.

#### **3.2.5.1 EINZELPHAGEN-DNA PRÄPARATION**

Die Präparation der Phagen-DNA erfolgte nach einem modifizierten Protokoll vom Hersteller mit Anpassungen aus einer Diplomarbeit (Phage Display Libraries Instruction Manual; New England Biolabs, Ipswich, USA; Identifizierung und Charakterisierung artifizierender SH3-Liganden, Glück, 2006). Dem Überstand eines zweifach zentrifugierten Phagenklonamplikats wurde 400 µl der PEG/NaCl-Lösung zugefügt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (10 Minuten, 13000 rpm, 4 °C) wurde das Pellet in Natriumazetatpuffer resuspendiert und 500 µl 99%-iges Ethanol zugegeben. Das Gemisch wurde für weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und erneut zentrifugiert (13000 rpm, 10 Minuten, 4 °C). Das Pellet wurde mit 250 µl 70%-igem Ethanol gewaschen und wie zuvor zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das restliche Ethanol in der Vakuumzentrifuge abgedampft (ca. 15 Minuten, 30 °C). Das DNA-Pellet wurde in 100 µl Wasser aufgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert. Die Sequenzierung der DNA erfolgte durch die Firma GATC (Konstanz), die eingesandte DNA wurde hierfür nach den entsprechenden Vorgaben präpariert und eingeschickt. Zur Sequenzierung wurde der Primer -96 gpIII mit der Primersequenz 5-CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG verwendet. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit dem Programm MAP2 (A Multiple Alignment Program for synthetic genomic sequences, Iowa State University, USA).

## **3.2.6 CHARAKTERISIERUNG DER SELEKTIERTEN D-PEPTIDE**

### **3.2.6.1 GEGEN PYROGLUTAMAT-A $\beta$ SELEKTIERTE D-PEPTIDE**

#### **3.2.6.1.1 A $\beta$ -BINDEEPI TOP-ANALYSE VON D4, D5, D6 UND D7 MITTELS PEPSPOT MEMBRAN**

Zur Bestimmung des Bindeepitops der einzelnen D-Peptide wurde eine PepSpot-Membran aus Zellulose (JPT, Berlin) eingesetzt, auf der unterschiedlich lange A $\beta$ -Fragmente via Carboxy-Terminus immobilisiert vorlagen (vgl. Anhang, Abbildung 47). Hierfür wurde die Membran erst für 5 Minuten in 100 % Methanol aktiviert und anschließend für weitere 10 Minuten in Wasser äquilibriert. Nach einem zusätzlichen 10-minütigen Äquilibrierungsschritt in TBS erfolgte die Inkubation in Blockpuffer (TBS, 10 % (v/v) Western Blocking Reagent; Roche, Basel, Schweiz). Die weitere Inkubation mit dem jeweiligen Fluoreszein-D-Peptid erfolgte bei einer Konzentration von 35  $\mu$ M in TBS-T. Nach einem zweimaligen 5-minütigen Waschschrift wurde zur D-Peptid-Detektion ein anti-FITC HRP-Konjugat eingesetzt (TBS-T, 1:5000). Alle Inkubationsschritte erfolgten für 1 Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln. Als Waschpuffer wurde TBS-T eingesetzt. Die Substratdetektion erfolgte mit dem Kit SuperSignal West Dura nach Angaben des Herstellers (Thermo Scientific, Waltham, USA).

#### **3.2.6.1.2 HISTOLOGISCHE FÄRBUNGEN IM HIRN TRANSGENER MÄUSE MIT D4, D5, D6 UND D7**

Für die Färbung von frontalen Hirnschnitten wurden Präparate transgener Tg2576-Mäuse im Alter von 10 bis 11 Monaten verwendet, die aufgrund des humanen APP-Gens mit der schwedischen Mutation eine erhöhte A $\beta$ 1-42 Expression vorweisen. Die Hirnschnittpräparate wurden von Dirk Bier (Institut für Nuklearchemie, Forschungszentrum Jülich, Jülich) bereit gestellt. Kryofixierte Schnitte der transgenen Mäuse und Geschwistertiere mit einem Wildtypintergrund wurden zuerst für 10 Minuten in 1xPBS gewaschen und anschließend für 1 Stunde in der jeweiligen Inkubationslösung (Fluoreszein-markiertes D-Peptid in Ethanol/Wasser 1/1; 1:30 in 1xPBS) inkubiert. Nach einem nochmaligen Waschschrift in 1xPBS für 3 und 7 Minuten wurden die Schnitte kurz in Wasser gespült, um anschließend die Aufnahmen der Fluoreszeinfluoreszenz ( $\lambda_{\text{ex}} = 480 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 535 \text{ nm}$ ) durchzuführen. Anschließend erfolgte die Kongorotfärbung der Schnitte nach Anleitung des Herstellers (Congo Red Kit; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) und die Aufnahme der Kongorotfluoreszenz ( $\lambda_{\text{ex}} = 553 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 610 \text{ nm}$ ). Abschließend wurden die Präparate mit Fluoreszenz-Eindeckmedium (Dako, Hamburg) eingedeckt und dunkel aufbewahrt.

### 3.2.6.2 GEGEN A $\beta$ 1-42-OLIGOMERE SELEKTIERTE D-PEPTIDE

#### 3.2.6.2.1 PRÄPARATION VON A $\beta$ -MONOMEREN, -OLIGOMEREN UND -FIBRILLEN FÜR ELISA

Zur detaillierten Bestimmung der Affinität der selektierten D-Peptide wurden ELISA-Versuche durchgeführt, bei denen die Bindungsaffinitäten der Fluoreszein-markierten D-Peptide für A $\beta$ -Monomere,- Oligomere und -Fibrillen mittels eines HRP-konjugierten anti-FITC-Antikörpers ermittelt wurden.

Für die Herstellung der Oligomere und Monomere wurde eine Gelfiltrationschromatographie durchgeführt und Fibrillen separat präpariert (vgl. 3.2.2.1 und 3.2.2.2). Für die Gelfiltrationschromatographie wurde komplett Amino-terminal biotinyliertes A $\beta$ 1-42 verwendet, um eine Bindung der gesamten Monomere an das Streptavidin zu gewährleisten. Für die Fibrillenpräparation wurde A $\beta$ 1-42 mit einem 1/10 Anteil desselben am Amino-Terminus biotinylierten Peptids eingesetzt. Zusätzlich zu diesen Präparationen von Amino-terminal biotinylierten A $\beta$ 1-42-Monomeren wurde Carboxy-terminal biotinyliertes A $\beta$ 1-42 präpariert. Dieses diente dazu die Bindung der Peptide an Monomere selbst dann detektieren zu können falls die D-Peptide aufgrund des Amino-terminalen Biotins nicht am Amino-Terminus von A $\beta$  binden können. Das Carboxy-terminal biotinylierte Peptid wurde nicht mittels Gelfiltration präpariert, sondern als HFIP-vorbehandelter Peptidfilm in NaHCO<sub>3</sub> (100 mM, pH 9,3) zu einer Konzentration von 45  $\mu$ g/ml aufgenommen. Diese Monomerpräparation wird fortan stets als *seedless*-Monomer bezeichnet.

Sämtliche Peptidpräparationen wurden zu 5  $\mu$ g/ml weiterverdünnt und zügig in die Wells zur direkten Immobilisierung gegeben. Der alkalische pH des Puffers diente dazu, die Aggregation des Peptids in größere Multimere zu verhindern.

#### 3.2.6.2.2 ELISA-DETEKTION VON A $\beta$ -MONOMEREN, -OLIGOMEREN UND -FIBRILLEN MIT DO1, DO2 UND DO3

Sämtliche Wells wurden nach der Immobilisierung für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit Blockpuffer inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der Fluoreszein-markierten D-Peptide zu jeweils 10 und 20  $\mu$ g/ml. Als qualitative Kontrolle der Immobilisierung wurde der nicht-konformerspezifische anti-A $\beta$ -Antikörper 6E10 eingesetzt (1:1000). Anschließend wurde der HRP-konjugierte anti-FITC-Antikörper (1:5000) in den D-Peptid-inkubierten Wells und das Ziege-anti-Maus HRP-Konjugat (1:1000; Southern Biotech, Birmingham, USA) in 6E10-inkubierten Wells eingesetzt. Sämtliche Inkubationsschritte erfolgten für 1 Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln und dreifachen Waschschritten mit TBS-T zwischen den Antikörperinkubationen. Abschließend fand die Substratdetektion wie zuvor beschrieben statt (vgl. 3.2.4.4).

### **3.2.6.2.3 THIOFLAVIN T-TEST MIT A $\beta$ 1-42 IN GEGENWART VON DO1, DO2 UND DO3**

A $\beta$ 1-42 wurde zu 2 mg/ml in HFIP aufgenommen und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Stocklösung wurde aliquotiert und das HFIP in der Vakuumentrifuge abgedampft (1 Stunde, Raumtemperatur). Für die Kontrollen wurde der A $\beta$ -Peptidfilm in jeweils 10  $\mu$ M ThT in 1xPBS zu einer Endkonzentration von 10  $\mu$ M aufgenommen. Für die Koinkubation mit den D-Peptiden wurde das jeweilige Peptid in einer Endkonzentration von je 1, 5 und 10  $\mu$ M in 1xPBS zugegeben, wobei das Peptid DO3 in Wasser vorgelöst wurde. Für die D-Peptid Kontrollen wurden die Peptide in gleicher Weise ohne A $\beta$  verdünnt. Für die Pufferkontrollen wurden eine 10  $\mu$ M ThT- sowie 1xPBS-Lösung ohne A $\beta$  und D-Peptid angesetzt. Die Lösungen wurden zu je 50  $\mu$ l in eine 384-Well Polypropylenplatte (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) pipettiert. Die Messung der Fluoreszenz ( $\lambda_{ex} = 490$  nm;  $\lambda_{em} = 440$  nm) erfolgte für 16 Stunden in einem Messintervall von 30 Minuten bei Raumtemperatur. Bei der Auswertung wurde ein Mittelwert aus der vierfachen Bestimmung gebildet und davon anschließend die Fluoreszenz der ThT-Kontrolle abgezogen.

### **3.2.6.2.4 MESSUNG DER DYNAMISCHEN LICHTSTREUUNG VON A $\beta$ 1-42 IN GEGENWART VON DO3**

A $\beta$ 1-42 wurde in HFIP zu einer Konzentration von 2 mg/ml aufgenommen und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die A $\beta$ -Lösung wurde aliquotiert und das HFIP in der Vakuumentrifuge entfernt (1 Stunde, Raumtemperatur). Das restliche HFIP wurde über Nacht bei offener Inkubation abgedampft. Der Peptidfilm wurde für 10 Minuten in 100 mM NaOH angelöst und mit dem Phosphatpuffer zu einer A $\beta$ -Endkonzentration von 5  $\mu$ M aufgefüllt. Bei der Koinkubation von A $\beta$  und D-Peptid wurde das D-Peptid in den Konzentrationen von 0,5, 2,5 und 5  $\mu$ M zugegeben. Das D-Peptid wurde hierfür in Wasser vorgelöst. Durch die Zugabe von 100 mM HCl und der daraus resultierenden pH-Verschiebung wurde die Aggregation gestartet. Als Kontrollen wurden separate Messungen von 5  $\mu$ M A $\beta$  und dem D-Peptid bei einer Konzentration von 0,5, 2,5 und 5  $\mu$ M durchgeführt. Sämtliche Puffer und Lösungen wurden zuvor gefiltert.

Die Messungen erfolgten am DynaPro Dynamischen Lichtstreuungssystem (Protein Solutions, Lakewood, USA) in einer Quatzküvette mit 3 mm Lichtweg (Hellma, Mühlheim). Messwerte wurden bei Raumtemperatur und einem festen Winkel von 90° aufgenommen. Die Datenakquisition erfolgte alle 5 Sekunden über einen Zeitraum von 10 bis 20 Minuten mit einem 655,6 nm Laser. Die Analyse erfolgte mit der Software Dynamic V6 (Protein Solutions, Lakewood, USA). Nach der Berechnung der Autokorrelationsfunktion und der Regularisationsanpassung wurde das Größenverteilungsprofil ermittelt.

### 3.2.7 ELISA MIT SÄUGETIERSEREN

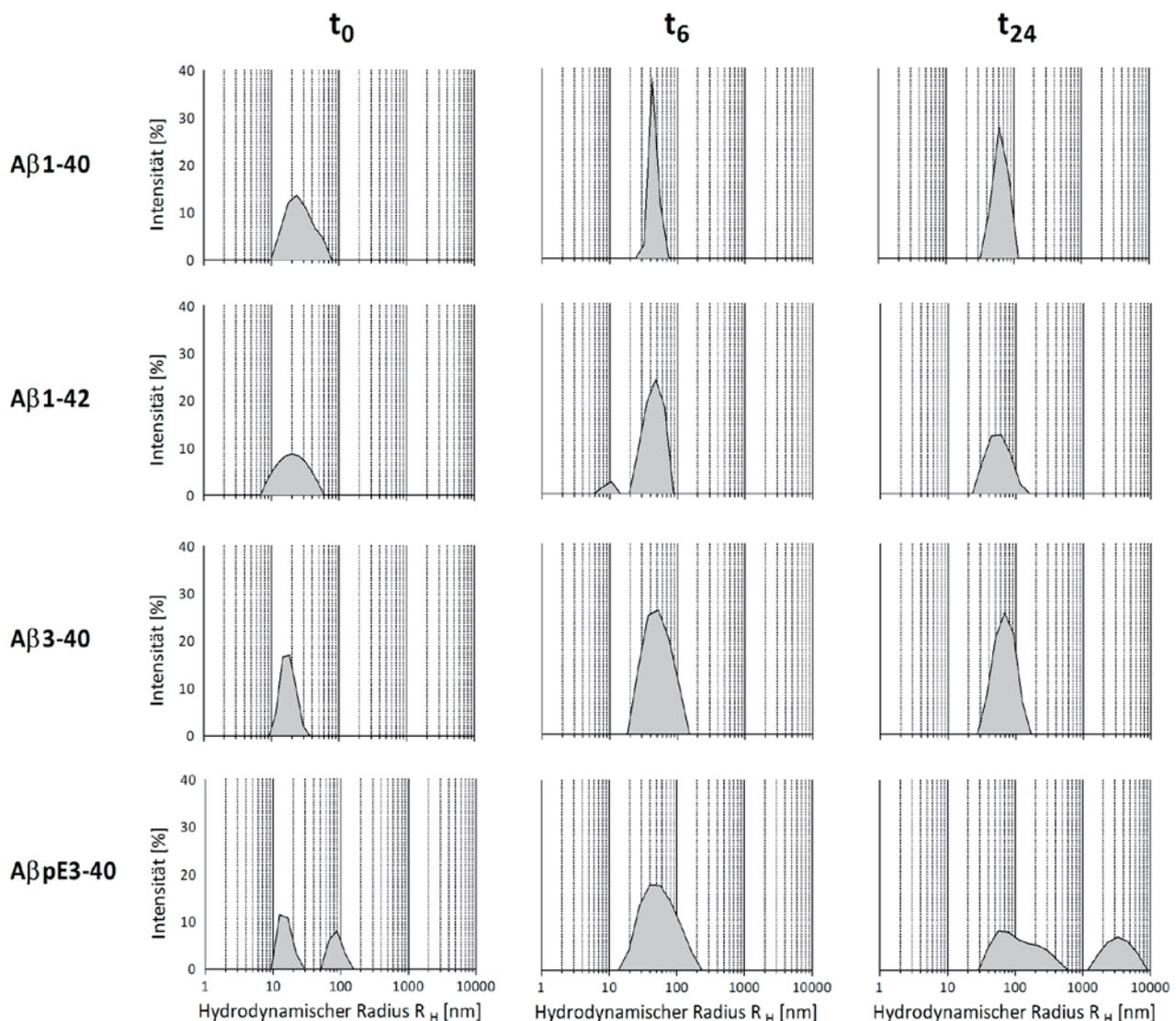
Zur Quantifizierung von freien anti-A $\beta$ -Antikörpern in humanen Seren und freien anti-A $\beta$ -Antikörpern in immunisierten, transgenen Tg2576-Mäusen bzgl. der Bindung an unterschiedliche A $\beta$ -Konformere wurde das ELISA-Nachweisverfahren eingesetzt. Hierfür wurden A $\beta$ -Monomere, -Oligomere sowie -Fibrillen nach den bereits beschriebenen Protokollen (vgl. 3.2.2.1 und 3.2.2.2) hergestellt und in Streptavidin-beschichteten 384-Well Polypropylenplatten (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) immobilisiert. Das Carboxy-terminal biotinylierte A $\beta$ 1-42 wurde ebenfalls eingesetzt und analog zu Kapitel 3.2.6.2.1 als *seedless*-Monomer präpariert. Die Konzentration der immobilisierten A $\beta$ 1-42-Proben betrug 0,5 und 5  $\mu$ g/ml.

Die Immobilisierung der Peptide erfolgte für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Die Blockierung der unspezifischen Bindestellen erfolgte mit dem ELISA-Blockpuffer. Die murinen Seren wurden 1:500 verdünnt eingesetzt und anschließend mit einem Ziege-anti-Maus-HRP-Konjugat (1:1000; Southern Biotech, Birmingham, USA) behandelt. Die humanen Seren wurden 1:50 verdünnt eingesetzt und anschließend mit einem Maus-anti-Human Antikörper (1:1000) inkubiert. Abschließend wurde dasselbe Ziege-anti-Maus-HRP-Konjugat (1:1000; Southern Biotech, Birmingham, USA) zugegeben. Alle Inkubationsschritte erfolgten für 1 Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln und dreifachen Waschschritten mit PBS-T zwischen den Seren- und Antikörperinkubationen. Die Substratdetektion erfolgte wie in Kapitel 3.2.4.4 beschrieben.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 AGGREGATIONSANALYSE VON A $\beta$ -ISOFORMEN

Die Aggregation verschiedener A $\beta$ -Spezies wurde mittels dynamischer Lichtstreuung untersucht. Hierfür wurde die Partikelbildung von A $\beta$ 1-40, A $\beta$ 1-42, A $\beta$ 3-40 und A $\beta$ pE3-40 bei einer Konzentration von 5  $\mu$ M über einen Zeitraum von 24 Stunden verfolgt. Zu Beginn der Aggregation lagen die Peptide ohne keimfördernde Aggregate vor und erst zum Messbeginn wurde die Aggregation mittels pH-Verschiebung initiiert, um die primäre Wachstumsphase zu beurteilen. Das Ausmaß der Integralfächen ist ein Maß für die Polydispersität einer Partikelpopulation. Diese Polydispersität gibt die Heterogenität der Größe der vorhandenen Aggregate wieder. Der berechnete hydrodynamische Radius beinhaltet sowohl den eigentlichen Partikeldurchmesser als auch die Hydrathülle. Eine Zusammenfassung der Messungen ist in Abbildung 10 gezeigt.



**Abbildung 10: Messung der dynamischen Lichtstreuung von verschiedenen A $\beta$ -Isoformen.** Dargestellt sind die Partikelgrößen von A $\beta$ 1-40, A $\beta$ 1-42, A $\beta$ 3-40 sowie A $\beta$ pE3-40 bei einer Konzentration von 5  $\mu$ M in Natriumphosphatpuffer bei pH 7,4. Die Abbildung zeigt die prozentuale Streuintensität der Partikel in Abhängigkeit vom hydrodynamischen Radius der Partikel in logarithmischer Darstellung. Die Inkubation erfolgte über 24 Stunden bei Raumtemperatur. Abgebildet sind Punktmessungen nach 0, 6 und 24 Stunden.

---

Bei sämtlichen Isoformen war zu Beginn der Messung bereits eine Partikelpopulation mit einem Radius von etwa 20 nm zu detektieren, dessen Streuintensität ca. 10 bis 20 % betrug. Im Fall von A $\beta$ pE3-40 war eine bimodale Partikelverteilung zu erkennen mit einer weiteren Partikelpopulation mit einem Radius von etwa 90 nm, welche im Vergleich zu der kleineren Population relativ heterogen im Durchmesser war.

Nach 6 Stunden waren bereits größere Aggregate vorhanden. Die Partikel haben dabei sowohl im Radius als auch in der Intensität zugenommen. A $\beta$ 1-40 wies eine Population mit einem relativ einheitlichen Radius von etwa 40 nm und einer Intensität von 40 % auf. Die übrigen Isoformen haben größere Partikel geformt mit Intensitäten von etwa 20 bis 30 %. Diese Partikelpopulationen waren deutlich heterogener im Radius als bei A $\beta$ 1-40. Dies war insbesondere bei den Amino-terminal verkürzten Peptiden A $\beta$ 3-40 und A $\beta$ pE3-40 der Fall. Hier betrug die Radii 40 bis 50 nm.

Zum Ende der Messung nach 24 Stunden war eine bimodale Partikelpopulation der A $\beta$ pE3-40-Isoform vorhanden. Die übrigen Isoformen waren unimodal. Während alle Isoformen Partikel mit einem Radius von 60 bis 80 nm vorzuweisen hatten, war im Fall von A $\beta$ pE3-40 eine zusätzliche, vergleichsweise heterogene Population zu verzeichnen, dessen Radius ungefähr 3000 nm betrug. Die Intensitäten haben zum größten Teil abgenommen, was darauf hinweist, dass der Anteil der Partikel mit großem Durchmesser gesunken ist, da unter Umständen teilweise eine Präzipitation der großen Aggregate stattgefunden haben könnte.

## 4.2 PRÄPARATION UND CHARAKTERISIERUNG VON A $\beta$ -MONOMEREN, -OLIGOMEREN UND -FIBRILLEN

Nachfolgend werden die Ergebnisse zur Etablierung eines Präparationsprotokolls von A $\beta$ -Monomeren, -Oligomeren sowie -Fibrillen aufgeführt und die anschließende Charakterisierung der präparierten Konformationen beschrieben. Dieses Protokoll dient dazu, schnell und zuverlässig reproduzierbare und stabile A $\beta$ -Konformere für verschiedene biophysikalische und biochemische Versuche präparieren zu können.

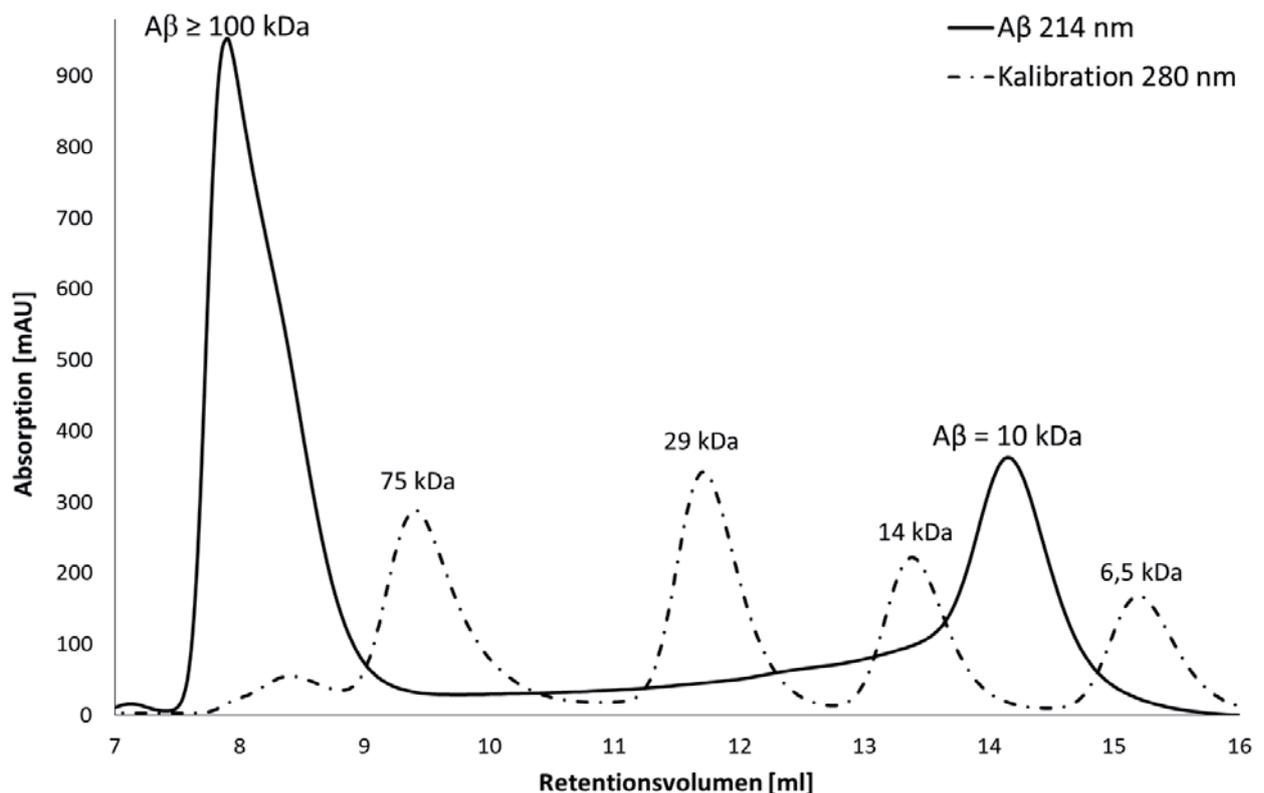
### 4.2.1 PRÄPARATION VON A $\beta$ -MONOMEREN UND -OLIGOMEREN MITTELS GELFILTRATIONSSCHROMATOGRAPHIE

Die Gelfiltrationschromatographie basierte auf dem Protokoll von Johansson *et al.* (2006). Jeweils 400 bis 450  $\mu$ M A $\beta$  wurden im Elutionspuffer aufgenommen und auf die Säule appliziert. Das Chromatogramm ist zusammen mit einem globulären Proteinkalibrationsstandard in Abbildung 11 dargestellt.

Der Partitionskoeffizient eines Proteins wurde aus dem jeweiligen Retentionsvolumen, dem Totvolumen der Säule sowie dem Gesamtvolumen der Säule nach folgender Rechnung abgeleitet:

$$\text{Retentionsvolumen} - \text{Säulentotvolumen} / (\text{Säulengesamtvolumen} - \text{Säulentotvolumen})$$

Mit den Partitionskoeffizienten der Proteinstandards wurde eine Eichgerade mit dem Molekulargewicht des Proteins in Abhängigkeit vom Partitionskoeffizienten erstellt. Anhand der Retentionsvolumina der beiden A $\beta$ -Fraktionen kann man die Partitionskoeffizienten und damit die apparenten Molekulargewichte der Oligomere und Monomere bestimmen. Diese sind aber auf globuläre Proteine bezogen und entsprechen daher nicht der realen molekularen Masse des nicht-globulären A $\beta$ -Peptids.



**Abbildung 11: Gelfiltrationschromatogramm von Aβ.** Dargestellt ist die Absorption (mAU = *milli absorption unit*) bei den angegebenen Wellenlängen in Abhängigkeit vom Retentionsvolumen. Das Chromatogramm der globulären Kalibrationsproteine besteht aus den Absorptionsmaxima für Conalbumin (75 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Ribonuklease A (14 kDa) und Aprotinin (6,5 kDa). Die beiden Fraktionen für oligomeres Aβ ( $\geq 100$  kDa) sowie monomeres Aβ (10 kDa) eluierten nach 8 ml direkt nach dem Totvolumen der Säule sowie nach ca. 14,5 ml. Die Auftrennung erfolgte auf einer Superdex 75 10/300 Säule bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,6 ml/min.

Die erste Aβ-Fraktion eluierte bei 8 ml, die zweite nach 14,5 ml. Nach der Berechnung anhand der Eichgerade ergab sich eine Masse von 10 kDa für die Aβ-Monomere in der zweiten Fraktion (tatsächliche Masse: 4,5 kDa) sowie  $\geq 100$  kDa für die niedermolekularen Aβ-Oligomere in der ersten Fraktion. Da die auf der Säule aufgetrennte Probe frisch präpariert und zentrifugiert wurde (13000 rpm, 1 Minute), befanden sich in dieser Fraktion keine unlöslichen und fibrillären Partikel.

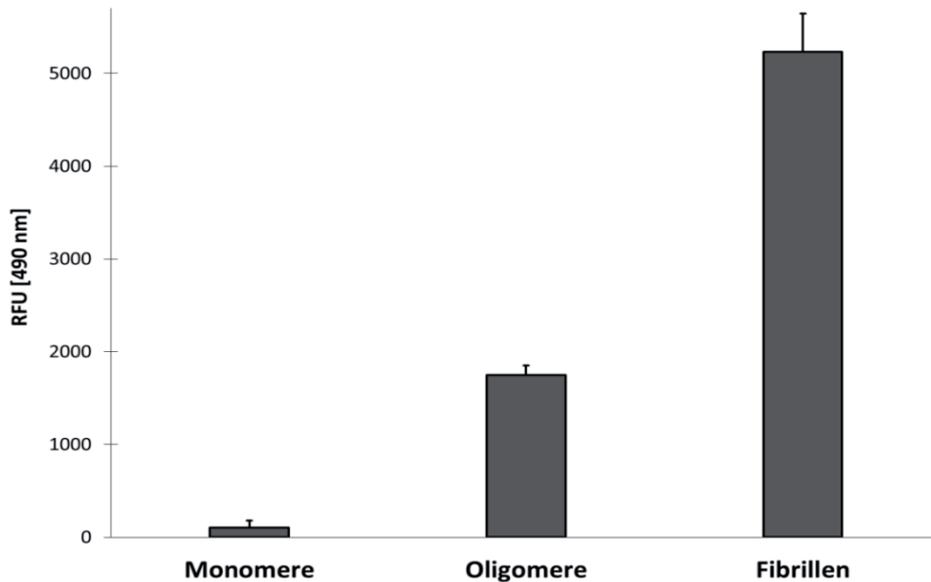
Weil das Aβ-Peptid nur drei Phenylalanine und ein Tyrosin in seiner Aminosäuresequenz vorweist wurde die Absorption deshalb anhand der Peptidkettenbindung bei 214 nm detektiert.

Die Absorptionenwerte der beiden Maxima lassen keine Rückschlüsse auf die eigentliche Peptidmenge in den Fraktionen zu, da Oligomere stärker streuen als Monomere und dies nicht zwangsläufig auf eine höhere Aβ-Konzentration in der ersten Fraktion hinweist.

#### 4.2.2 THIOFLAVIN T-TEST ZUM NACHWEIS VON Aβ-FIBRILLEN

ThT ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich an fibrilläre  $\beta$ -Faltblatt-reiche Strukturen anlagert und dessen Fluoreszenzemission mit dem relativen Fibrillengehalt in der Probe korreliert. Die eluierten oligomeren und monomeren Aβ-Peptide, welche mithilfe der Gelfiltration aufgetrennt wurden, sowie die separat präparierten Fibrillen können so mittels ThT auf ihren relativen

Fibrillengehalt bestimmt werden. Von den Monomer-, Oligomer- und Fibrillenproben wurden je 4  $\mu\text{M}$ , basierend auf der Monomerkonzentration, in einer vierfachen Bestimmung eingesetzt. Nach Abzug der Hintergrundfluoreszenz von ThT ergaben sich die in Abbildung 12 dargestellten Fluoreszenzintensitäten für die Monomere, Oligomere und Fibrillen.

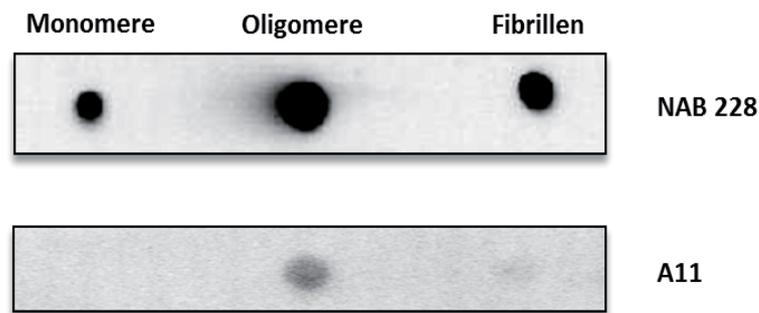


**Abbildung 12: ThT-Aggregationstest zur relativen Quantifizierung des Fibrillengehalts in A $\beta$ -Monomeren, Oligomeren und -Fibrillen.** Dargestellt sind die relativen Fluoreszenzintensitäten (RFU = *relative fluorescence unit*) von vierfach bestimmten Monomer-, Oligomer- und Fibrillenproben nach Abzug der ThT-Hintergrundfluoreszenz bei  $\lambda_{\text{ex}} = 440 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{em}} = 490 \text{ nm}$ . Eingesetzt wurden die Monomere und Oligomere aus der Gelfiltrationschromatographie sowie die separat präparierten Fibrillen in einer Konzentration von 4  $\mu\text{M}$  bezogen auf die Monomeräquivalente.

Die Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten zeigt, dass in der Monomerprobe keine nennenswerte ThT-Fluoreszenz vorlag. Somit enthielt die Monomerprobe keinen signifikanten Fibrillengehalt. Die Oligomerprobe hatte eine relativ geringe Fluoreszenzintensität aufzuweisen. Im Gegensatz dazu hatte die Fibrillenprobe eine deutlich höhere ThT-Fluoreszenzintensität, die mehr als doppelt so hoch war als die in der Oligomerprobe. Somit hatte diese Fibrillenprobe relativ gesehen einen deutlich höheren Anteil an  $\beta$ -Faltblatt-reichen Fibrillen als die Monomer- und Oligomerprobe.

### 4.2.3 ANALYSE VON A $\beta$ -MONOMEREN, -OLIGOMEREN UND -FIBRILLEN MIT DOT-BLOT UND WESTERN-BLOT

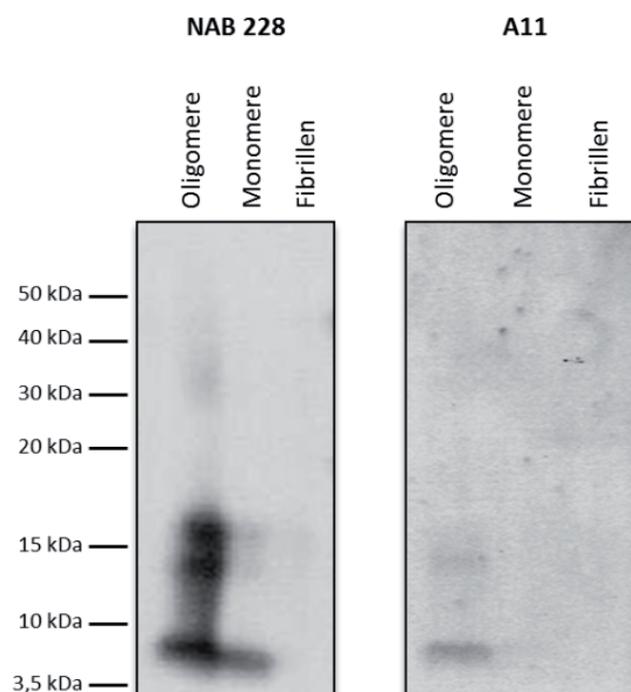
Zur weiteren Charakterisierung der drei Proben wurden zusätzlich Dot-Blot- und Western-Blot-Detektionen durchgeführt. Die Ergebnisse der Dot-Blot-Experimente sind in Abbildung 13 zusammengefasst. Die Monomere, Oligomere und Fibrillen wurden immobilisiert und mit dem nicht-konformerspezifischen anti-A $\beta$ -Antikörper NAB 228 sowie dem oligomerspezifischen Antikörper A11 detektiert.



**Abbildung 13: Dot-Blot-Analysen von A $\beta$ -Monomeren, -Oligomeren und -Fibrillen.** Immobilisiert wurden jeweils 13 ng der drei Proben. In der oberen Reihe ist die Immundetektion mit dem nicht-konformerspezifischen anti-A $\beta$ -Antikörper NAB 228 (1:1000), in der unteren die mit dem oligomerspezifischen Antikörper A11 (1:500) dargestellt. Die Expositionszeit betrug 2 Minuten bei NAB 228 sowie 1 Minute bei A11. Die Expositionszeiten wurden so gewählt, dass ein optimales Verhältnis zwischen spezifischer Antikörperbindung und unspezifischem Hintergrundsignal vorlag.

Die deutlichen Signale in der NAB 228-Immundetektion haben bestätigt, dass in allen drei Proben das A $\beta$ -Peptid vorhanden war, während die Analyse mit A11 zeigte, dass nur die Oligomerefraktion aus der Gelfiltration oligomere Strukturen enthielt, die von A11 detektiert wurden. Für die Monomere und Fibrillen wurden keine bzw. nur sehr geringe Signale mit A11 detektiert.

Zusätzlich zu der Dot-Blot-Detektion wurden eine semi-native Gradientengelelektrophorese und eine anschließende Western-Blot-Analyse durchgeführt, um die drei Proben detaillierter zu analysieren. Hierfür wurden ebenfalls Immundetektionen mit den beiden Antikörpern NAB 228 und A11 durchgeführt. Abbildung 14 fasst die Ergebnisse hierzu zusammen.



**Abbildung 14: Western-Blot-Analysen von A $\beta$ -Monomeren, -Oligomeren und -Fibrillen.** Aufgetrennt wurden jeweils 7,5  $\mu$ l der drei Proben auf einem 4-12%-igen Bis-Tris-Gradientengel unter semi-nativen Bedingungen. Auf der rechten Seite ist die Immundetektion mit dem nicht-konformerspezifischen anti-A $\beta$ -Antikörper NAB 228 (1:1000), auf der linken Seite die mit dem oligomerspezifischen Antikörper A11 (1:500) dargestellt. Die Expositionszeit betrug 5 Sekunden bei NAB 228 sowie 5 Minuten bei A11. Die Expositionszeiten wurden so gewählt, dass ein optimales Verhältnis zwischen spezifischer Antikörperbindung und unspezifischem Hintergrundsignal vorlag.

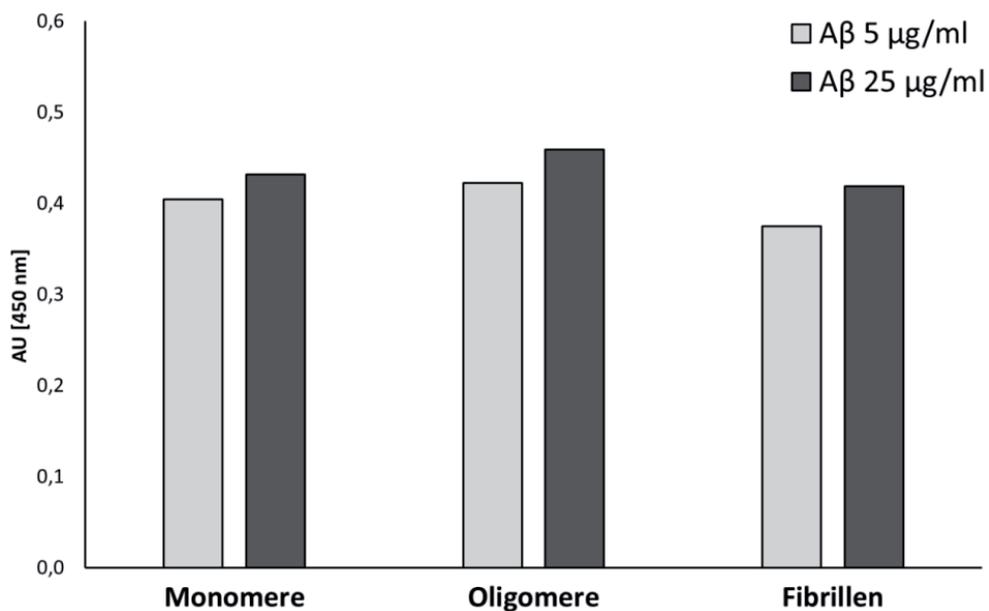
Die Immundetektion mit dem A $\beta$ -spezifischen Antikörper NAB 228 hat deutliche Bandensignale in den Oligomer- und Monomerproben erkennen lassen. In der Bahn mit der Oligomerprobe waren drei Banden bei ca. 8, 14 und 17 kDa zusehen, die der Masse von A $\beta$ -Dimeren, -Trimeren und -Tetrameren entsprachen. Zusätzlich lagen schlierenartige Banden zwischen der ersten und zweiten Bande sowie bei etwa 35 bis 40 kDa vor. In der Bahn mit der Monomerprobe war eine einzige deutliche Bande bei ca. 5 kDa zu detektieren, die der Masse des Monomers entspricht. Die Bande bei ca. 8 kDa in der Bahn mit der Oligomerprobe läuft nur geringfügig über der Bande bei etwa 5 kDa in der Bahn mit der Monomerprobe, was vermutlich auf die nicht-globuläre Struktur vom Oligomer und dadurch bedingte veränderte Laufgeschwindigkeit im Gel zurückzuführen ist. In der Bahn mit der Fibrillenprobe wurden keine Signale detektiert.

Die Immundetektion mit A11 ließ nur in der Bahn mit der Oligomerprobe Signale erkennen. Hier waren erneut zwei Banden bei etwa 8 und 14 kDa zu sehen. Die beiden anderen Bahnen mit den Monomer- und Fibrillenproben wiesen keine deutlichen Signale auf.

Diese Ergebnisse bestätigen die Dot-Blot-Experimente und zeigen zusätzlich, dass einzig in der Oligomerprobe auch oligomere Strukturen mit dem konformerspezifischen Antikörper A11 detektiert werden konnten, während die Monomerprobe nur eine deutliche NAB 228-positive Bande bei etwa 5 kDa vorzuweisen hatte. Sowohl die NAB 228- als auch die A11-Immundetektion haben keine Signale in der Bahn mit der Fibrillenprobe erkennen lassen.

#### **4.2.4 ELISA-DETEKTION VON A $\beta$ -MONOMEREN, -OLIGOMEREN UND -FIBRILLEN**

Mittels ELISA wurde die relative Menge an biotinylierten Monomeren, Oligomeren und Fibrillen, die auf einer Streptavidin-beschichteten Platte immobilisiert wurden, quantitativ bestimmt. Hierfür erfolgte die Immundetektion mit A $\beta$ -spezifischen Antikörpern. Die Etablierung dieses ELISA-Nachweises von verschiedenen A $\beta$ -Konformeren diente dazu, die A $\beta$ -Proben in späteren ELISA-Versuchen mit Antikörpern aus Seren zu detektieren. Es wurden zwei verschiedene Konzentrationen der Amino-terminal biotinylierten Konformere immobilisiert und mit dem nicht-konformerspezifischen anti-A $\beta$ -Antikörper 6E10 detektiert. Die Ergebnisse zu diesen ELISA-Versuchen sind in Abbildung 15 dargestellt.

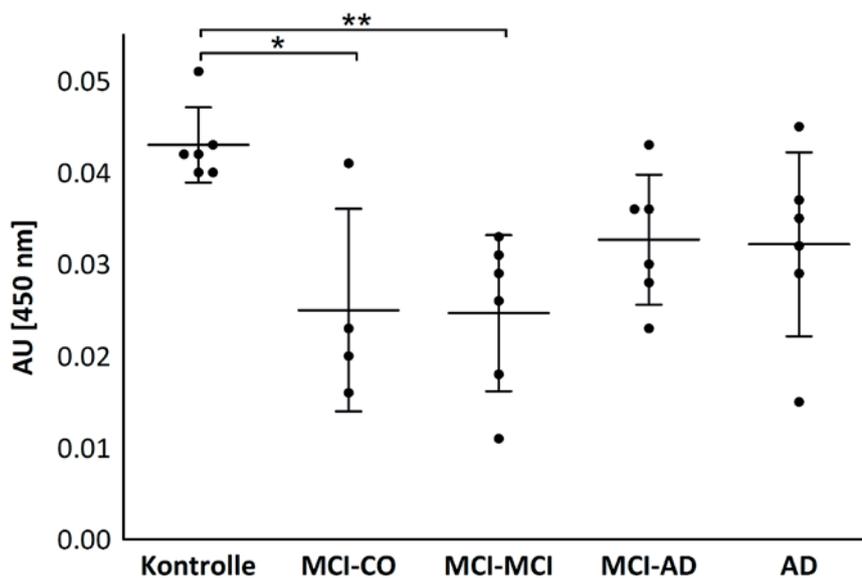


**Abbildung 15: ELISA zur relativen Quantifizierung von immobilisierten A $\beta$ -Monomeren, -Oligomeren und -Fibrillen.** Jeweils 5 und 25  $\mu\text{g/ml}$  der Amino-terminal biotinylierten Proben wurden auf einer Streptavidin-beschichteten Platte immobilisiert und anschließend mit dem nicht-konformerspezifischen anti-A $\beta$ -Antikörper 6E10 (1:1000) und einem Maus-anti-Human-HRP-Konjugat (1:10000) detektiert. Gezeigt ist die Absorption (AU = *absorption unit*) der jeweiligen Proben bei 450 nm als Mittelwert einer zweifachen Bestimmung nach Abzug der Hintergrundabsorption.

Die Absorption in allen Proben betrug etwa 0,4 bis 0,5 Einheiten. Den Werten zufolge lag vermutlich eine Sättigung im ELISA vor, da die Quantifizierung des Signals nahezu gleiche Absorptionswerte in sämtlichen Proben ergab. Zwischen den beiden Konzentrationen 5 und 25  $\mu\text{g/ml}$  lagen in allen drei Konformeren nur leicht erhöhte Werte in der höher konzentrierten immobilisierten A $\beta$ -Probe vor. Es reichen 5  $\mu\text{g/ml}$  immobilisiertes A $\beta$ , um ein deutliches Detektionssignal für die Monomere, Oligomere und Fibrillen im ELISA zu erhalten.

### 4.3 QUANTIFIZIERUNG VON ANTI-A $\beta$ -ANTIKÖRPERTITERN IN SEREN VON DEMENZPATIENTEN

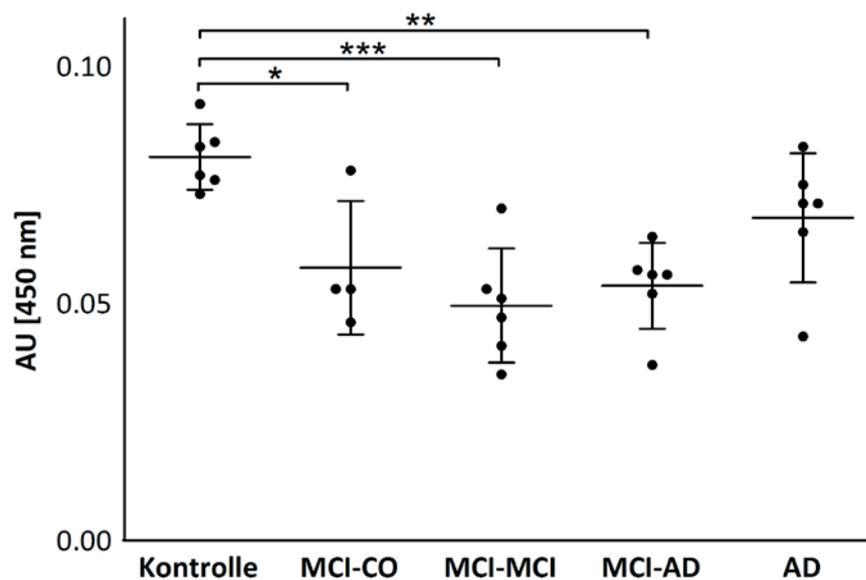
Die Antikörpertiter gegen unterschiedliche A $\beta$ 1-42-Konformere wurden in Seren von verschiedenen Demenzpatienten und Kontrollgruppen quantifiziert. Dies diente dazu, eventuelle Unterschiede in anti-A $\beta$ -Antikörpertitern bzgl. der Bindung an unterschiedliche A $\beta$ -Konformere nachzuweisen. Hierfür wurden biotinylierte A $\beta$ -Monomere, -Oligomere und -Fibrillen auf einer Streptavidin-beschichteten Platte immobilisiert. Anschließend wurden die humanen Seren eingesetzt und die relative Menge der freien Antikörper, die an die jeweiligen Konformere binden, quantifiziert. Zusätzlich wurde stets eine Detektion mit dem nicht-konformerspezifischen anti-A $\beta$ -Antikörper 6E10 durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse zur Quantifizierung der Monomer-bindenden Antikörper sind in Abbildung 16.



**Abbildung 16: ELISA zur relativen Quantifizierung der A $\beta$ 1-42-Monomer bindenden Antikörper in humanen Seren verschiedener Patientengruppen.** Die Monomere wurden zu 5  $\mu$ g/ml immobilisiert. Die Seren wurden 1:50 verdünnt eingesetzt. Dargestellt ist die Bindung der Antikörper in Seren von gesunden Kontrollpatienten und regressiven MCI- (MCI-CO), stabilen MCI- (MCI-MCI), progressiven MCI- (MCI-AD) sowie AD-Gruppen in einer zweifachen Bestimmung als Absorption (AU = *absorption unit*) bei 450 nm nach Abzug der Hintergrundabsorption. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen. Zur statistischen Auswertung wurde der ANOVA-Test verwendet. \* und \*\* entsprechen einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  bzw.  $p < 0,01$ .

Die statistische Auswertung ergab, dass zwischen der Kontrollgruppe und der regressiven MCI-Gruppe ein signifikanter ( $p < 0,05$ ) und zwischen der Kontrollgruppe und der stabilen MCI-Gruppe ein hochsignifikanter Unterschied bzgl. der Antikörpertiter vorlag ( $p < 0,01$ ). Zwischen den Kontrollen und den übrigen progressiven MCI- sowie AD-Patienten war gruppenweise kein statistisch signifikanter Unterschied vorhanden. Die MCI- und AD-Patienten unterschieden sich untereinander ebenfalls nicht.

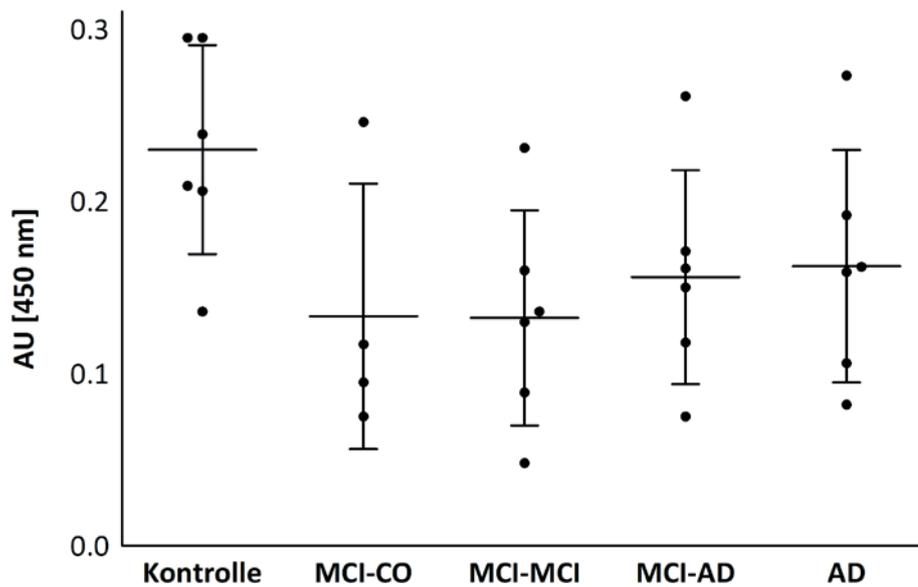
Zusätzlich wurden in denselben Seren auch die Oligomer-bindenden Antikörper quantifiziert. Die entsprechende Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Abbildung 17.



**Abbildung 17: ELISA zur relativen Quantifizierung der Aβ1-42-Oligomer bindenden Antikörper in humanen Seren verschiedener Patientengruppen.** Die Oligomere wurden zu 5 µg/ml immobilisiert. Die Seren wurden 1:50 verdünnt eingesetzt. Dargestellt ist die Bindung der Antikörper in Seren von gesunden Kontrollpatienten und regressiven MCI- (MCI-CO), stabilen MCI- (MCI-MCI), progressiven MCI- (MCI-AD) sowie AD-Gruppen in einer zweifachen Bestimmung als Absorption (AU = *absorption unit*) bei 450 nm nach Abzug der Hintergrundabsorption. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen. Zur statistischen Auswertung wurde der ANOVA-Test verwendet. \*, \*\* und \*\*\* entsprechen einem Signifikanzniveau von jeweils  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  bzw.  $p < 0,001$ .

Auch hier sind statistisch signifikante Differenzen zwischen unterschiedlichen Gruppen vorhanden. Die Menge an Aβ-Oligomer bindenden Antikörpern in der Kontrollgruppe unterschied sich teils hochsignifikant von der in den regressiven, stabilen sowie progressiven MCI-Patienten. Während der Unterschied zu den regressiven MCI-Patienten ein Signifikanzniveau von  $p < 0,5$  hatte, lag er in den stabilen MCI- und den progressiven MCI-Patienten bei  $p < 0,001$  bzw.  $p < 0,01$ . Es lag kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der AD-Gruppe vor. Zwischen den jeweiligen MCI-Gruppen und der AD-Gruppe untereinander wurden ebenfalls keine signifikanten Unterschiede ermittelt.

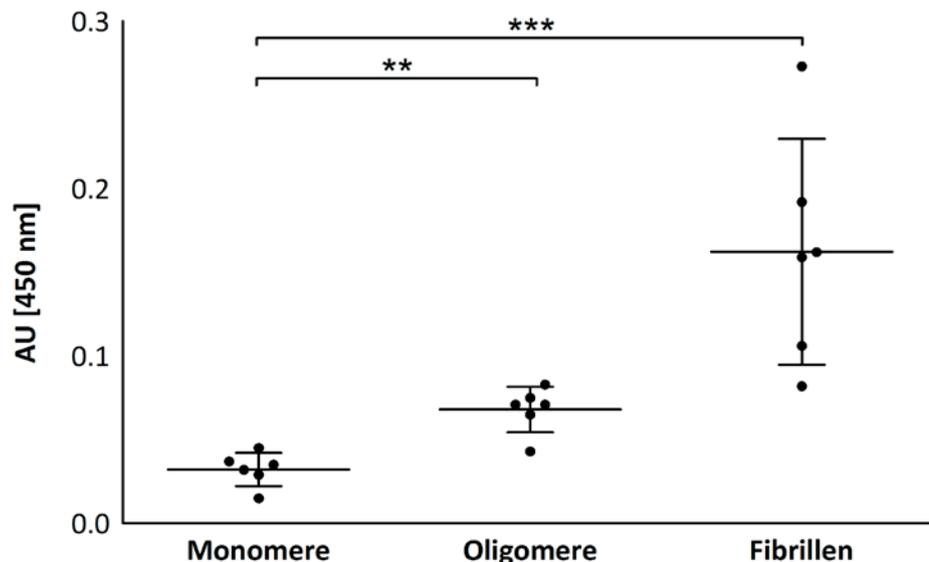
Die Ergebnisse zur Quantifizierung der Fibrillen-bindenden Antikörper sind in folgender Abbildung gezeigt.



**Abbildung 18: ELISA zur relativen Quantifizierung der A $\beta$ 1-42-Fibrillen bindenden Antikörper in humanen Seren verschiedener Patientengruppen.** Die Fibrillen wurden zu 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  immobilisiert. Die Seren wurden 1:50 verdünnt eingesetzt. Dargestellt ist die Bindung der Antikörper in Seren von gesunden Kontrollpatienten und regressiven MCI- (MCI-CO), stabilen MCI- (MCI-MCI), progressiven MCI- (MCI-AD) sowie AD-Gruppen in einer zweifachen Bestimmung als Absorption (AU = *absorption unit*) bei 450 nm nach Abzug der Hintergrundabsorption. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen. Zur statistischen Auswertung wurde der ANOVA-Test verwendet.

Hier ergab die statistische Auswertung keine signifikanten Unterschiede zwischen allen Gruppen untereinander bzgl. der Quantifizierung der Antikörper, die an Fibrillen binden.

Die Ergebnisse zur Quantifizierung der Antikörper in den Seren von AD-Patienten sind zusätzlich in der folgenden Abbildung zusammengefasst.



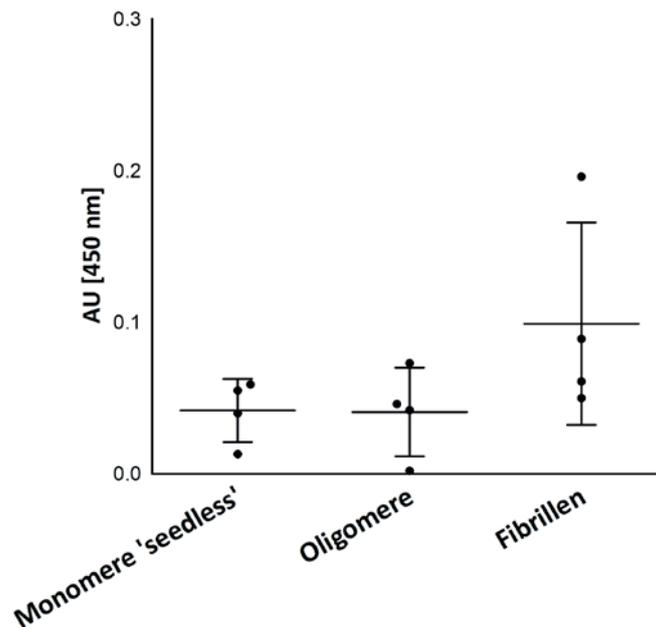
**Abbildung 19: ELISA zur relativen Quantifizierung der Antikörperbindung an A $\beta$ 1-42-Konformere in humanen Seren der AD-Gruppe.** Dargestellt ist die Bindung der Antikörper in den Seren (1:50) gegen Monomere, Oligomere und Fibrillen aus Amino-terminal biotinyliertem A $\beta$  (alle je 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in einer zweifachen Bestimmung als Absorption (AU = *absorption unit*) bei 450 nm nach Abzug der Hintergrundabsorption. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen. Zur statistischen Auswertung wurde der ANOVA-Test verwendet. \*\* und \*\*\* entsprechen einem Signifikanzniveau von jeweils  $p < 0,01$  bzw.  $p < 0,001$ .

Die Quantifizierung der Antikörper zeigt, dass der Titer der A $\beta$ -bindenden Antikörper relativ gering ist, wobei statistisch signifikante Unterschiede in den Titern bzgl. der Monomer-, Oligomer- und Fibrillenbindung vorliegen. Es sind mehr Antikörper vorhanden, die die Oligomere und Fibrillen im Vergleich zu den Monomeren binden. Dieser Unterschied ist in beiden Fällen statistisch hochsignifikant.

## 4.4 QUANTIFIZIERUNG VON ANTI-A $\beta$ -ANTIKÖRPERTITERN IN MURINEN SEREN NACH EINER AKTIVEN IMMUNOTHERAPIE MIT AFFITOPEN

Die Folgen der aktiven Immunisierung mit den Affitopen AD03 und AD02 auf die Antikörperaktivität in Seren von transgenen Tg2576-Mäusen wurde in Kooperation mit der AFFIRIS AG (Wien, Österreich) untersucht. Hierfür wurden die Titer der Monomer-, Oligomer- und Fibrillen-bindenden freien Antikörper in murinen Seren mittels ELISA quantifiziert. Zuvor wurden zwei Tiergruppen jeweils mit AD03 und AD02 behandelt. Die Mäuse wurden im Alter von sechs Monaten sechsmal im Abstand von einem Monat mit dem jeweiligen Affitop immunisiert und anschließend wurden Blutproben entnommen. Im ELISA wurden Monomere mit einem Carboxy-terminalen Biotin als *seedless*-Monomere und Oligomere sowie Fibrillen mit Amino-terminalen Biotinylierungen immobilisiert. Es wurden keine Monomere mit Amino-terminalem Biotin aus der Gelfiltrationschromatographie eingesetzt, da die Affitope ihr A $\beta$ -Bindeepitop teilweise am äußersten Amino-Terminus haben und das Biotin die A $\beta$ -Bindung der immuninduzierten Antikörper hemmen könnte. Die Bindung der Antikörper in den Seren an diese A $\beta$ -Proben wurde anschließend im ELISA quantitativ bestimmt. Auch hier wurde wie in Kapitel 4.3 stets eine Immundetektion mit dem nicht-konformerspezifischen anti-A $\beta$ -Antikörper 6E10 durchgeführt, um die relative Menge der verschiedenen Konformere in den Wells zu vergleichen (Daten nicht gezeigt).

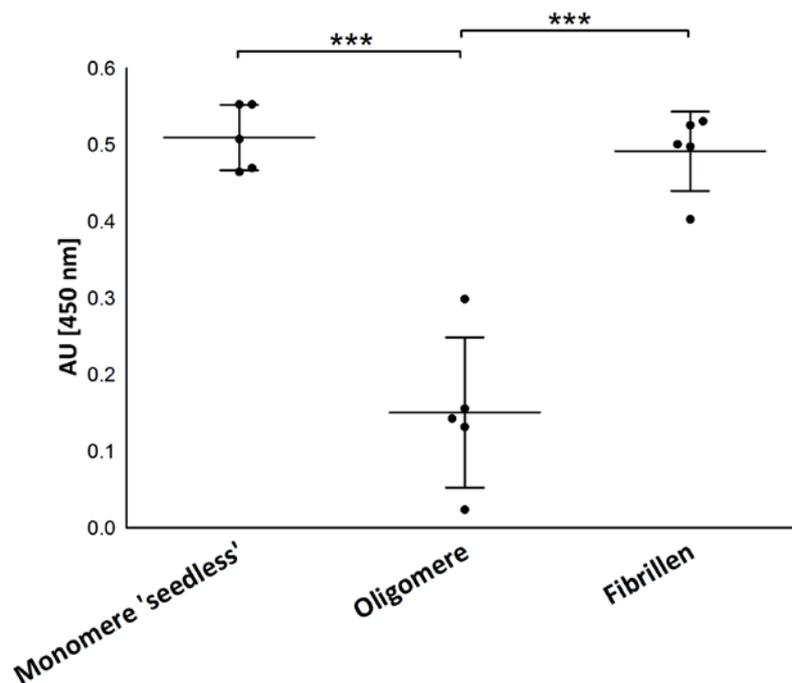
In Seren von transgenen Mäusen, die nicht immunisiert wurden, war der Titer der A $\beta$ -bindenden Antikörper relativ gering, wobei die Menge der Fibrillen-bindenden Antikörper leicht erhöht war. Die zugehörige Quantifizierung der Antikörper ist in Abbildung 20.



**Abbildung 20: ELISA zur relativen Quantifizierung der Antikörperbindung an A $\beta$ 1-42-Konformere in murinen Seren vor einer Immunisierung.** Dargestellt ist die Bindung der Antikörper in je 4 Seren (1:750) an *seedless*-Monomere aus Carboxy-terminal biotinyliertem A $\beta$  sowie Oligomere und Fibrillen aus Amino-terminal biotinyliertem A $\beta$  (alle je 5  $\mu$ g/ml) in einer zweifachen Bestimmung als Absorption (AU = *absorption unit*) bei 450 nm nach Abzug der Hintergrundabsorption. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen. Zur statistischen Auswertung wurde der ANOVA-Test verwendet.

Die Quantifizierung der Antikörperbindung zeigt, dass die relativen Verhältnisse zwischen den Monomer-, Oligomer- und Fibrillen-bindenden Antikörpertitern denen in AD-Patienten ähneln (vgl. Abbildung 19). Auch hier wurden verhältnismäßig mehr Antikörper detektiert, die Fibrillen binden. Dieser Unterschied war allerdings nicht statistisch signifikant.

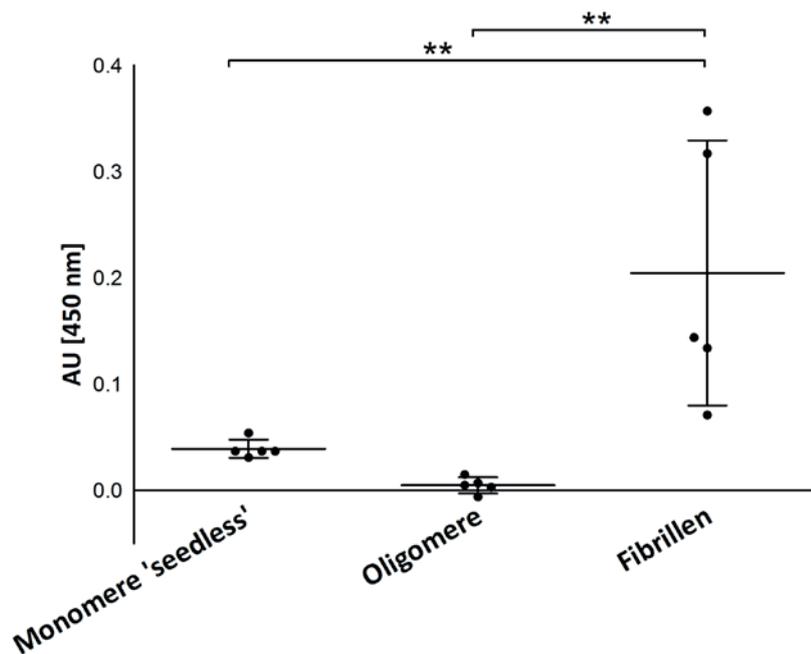
In Abbildung 21 ist die Quantifizierung der Bindung der Antikörper in den Seren an verschiedene A $\beta$ -Konformere nach der Immunisierung mit AD03 dargestellt.



**Abbildung 21: ELISA zur relativen Quantifizierung der Antikörperbindung an A $\beta$ 1-42-Konformere in murinen Seren nach der Immunisierung mit AD03.** Dargestellt ist die Bindung der Antikörper in je 5 Seren (1:500) an *seedless*-Monomere aus Carboxy-terminal biotinyliertem A $\beta$  sowie Oligomere und Fibrillen aus Amino-terminal biotinyliertem A $\beta$  (alle je 5  $\mu$ g/ml) in einer zweifachen Bestimmung als Absorption (AU = *absorption unit*) bei 450 nm nach Abzug der Hintergrundabsorption. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen. Zur statistischen Auswertung wurde der ANOVA-Test verwendet. \*\*\* entspricht einem Signifikanzniveau von  $p < 0,001$ .

In den Seren der mit AD03 immunisierten Mäusen war der Titer der Antikörper, die an Oligomere binden, im Vergleich zu dem in nicht-immunisierten Mäusen erhöht. Vergleichsweise mehr Antikörper haben an die Monomere und Fibrillen gebunden. Der Unterschied zwischen der Antikörper-Oligomer-Bindung und der Antikörper-Monomer- sowie Antikörper-Fibrillen-Bindung war jeweils hochsignifikant mit einem Signifikanzniveau von jeweils  $p < 0,001$ .

Die Bindung der Antikörper an Monomere, Oligomere und Fibrillen in den Seren von Mäusen, die mit AD02 immunisiert wurden, wurde ebenfalls im ELISA quantifiziert. Abbildung 22 zeigt die zugehörige Auswertung.



**Abbildung 22: ELISA zur relativen Quantifizierung der Antikörperbindung an A $\beta$ 1-42-Konformere in murinen Seren nach der Immunisierung mit AD02.** Dargestellt ist die Bindung der Antikörper in je 5 Seren (1:500) an *seedless*-Monomere aus Carboxy-terminal biotinyliertem A $\beta$  sowie Oligomere und Fibrillen aus Amino-terminal biotinyliertem A $\beta$  (alle je 5  $\mu$ g/ml) in einer zweifachen Bestimmung als Absorption (AU = *absorption unit*) bei 450 nm nach Abzug der Hintergrundabsorption. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen. Zur statistischen Auswertung wurde der ANOVA-Test verwendet. \*\* entspricht einem Signifikanzniveau von  $p < 0,01$ .

In Mäusen, die mit AD02 immunisiert wurden, lag eine schwächere Immunaktivität vor als in den mit AD03 immunisierten Mäusen. In den Seren der mit AD02 behandelten Mäuse waren insgesamt weniger Antikörper vorhanden, die alle drei A $\beta$ -Konformere gebunden haben. Vor allem Monomer- und Oligomer-bindende Antikörper hatten einen relativ geringen Titer. Es lag aber eine signifikant erhöhte Menge an Antikörpern vor, die Fibrillen gebunden haben ( $p < 0,01$ ).

## 4.5 D-PEPTIDE ALS POTENTIELLE DIAGNOSE- ODER THERAPIESUBSTANZ

Die Selektion von D-Peptiden im Spiegelbild-Phagendisplay erfolgte zur Identifizierung potentieller pharmakologischer Peptide zur bildgebenden Diagnose oder kausalen Therapie der AD. In den nachfolgenden Kapiteln sind die Phagendisplayselektionen und *in vitro*- sowie *ex vivo*-Charakterisierungen verschiedener Peptide zusammengefasst, die vielversprechende Eigenschaften als molekulare Plaquesonden bzw. aggregationshemmende Substanzen vorweisen.

### 4.5.1 PYROGLUTAMAT-A $\beta$ -BINDEnde D-PEPTIDE ALS POTENTIELLE DIAGNOSTISCHE PLAQUESONDEN

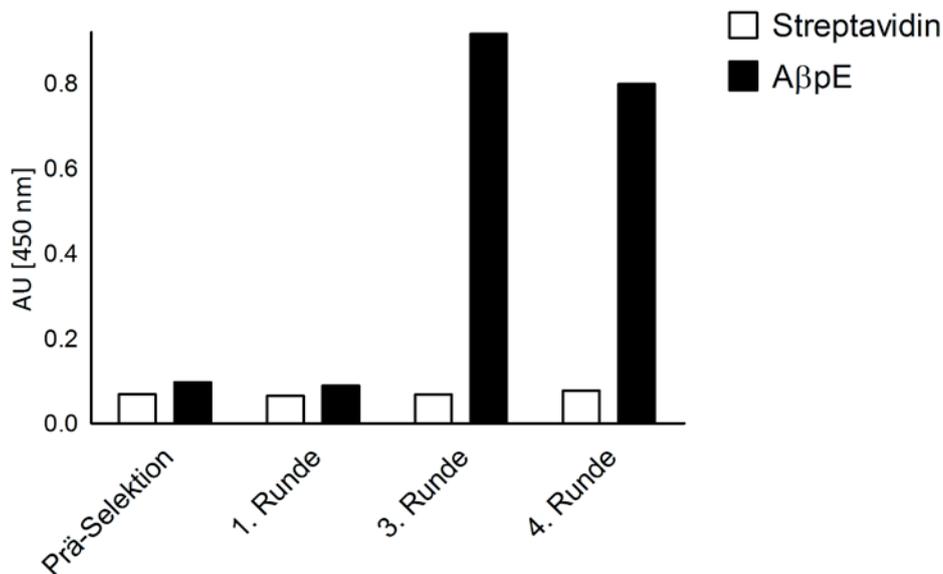
#### 4.5.1.1 PHAGENDISPLAYSELEKTION DER D-PEPTIDE D4, D5, D6 UND D7

Die Selektionen im Spiegelbild-Phagendisplay wurden gegen A $\beta$ pE ohne Aggregationskeime und in niedermolekularer sowie hochmolekularer Aggregatform durchgeführt (vgl. 3.2.4.1, Abbildung 9). Dies diente dazu, möglichst viele verschiedene Aggregationsstufen detektieren zu können. Es wurden keine Monomere und Oligomere mittels Gelfiltration präpariert, da die chromatographische Auftrennung der Pyroglutamat-Isoform noch nicht etabliert ist. Vier verschiedene dodekamere D-Peptide D4 (KMEHPNHPPPQR), D5 (NGAPNKIPRDRE), D6 (AGERLKFIDEHV) und D7 (HTRFEYYVYHMS) wurden aus den selektierten spiegelbildlichen L-Peptiden abgeleitet. D4 und D5 hatten Aggregationskeim-frei präpariertes A $\beta$ pE als Selektionsziel, D6 und D7 jeweils niedermolekulare und hochmolekulare A $\beta$ pE-Aggregate. Die Ergebnisse zu den Selektionen sind in den folgenden Kapiteln zusammengefasst.

##### 4.5.1.1.1 ANREICHERUNGS-ELISA

Zur Beurteilung der spezifischen Affinität der angereicherten Phagen wurden Anreicherungs-ELISA mit den amplifizierten Phagen aus den jeweiligen Runden sowie der nicht-selektierten Phagenbibliothek durchgeführt. Im ELISA wurde die spezifische Bindung der Phagen an die unterschiedlichen A $\beta$ pE-Konformere aus den jeweiligen Selektionen und die unspezifische Bindung an das Streptavidin und die Polystyroloberfläche in leeren Streptavidin-beschichteten Wells quantifiziert.

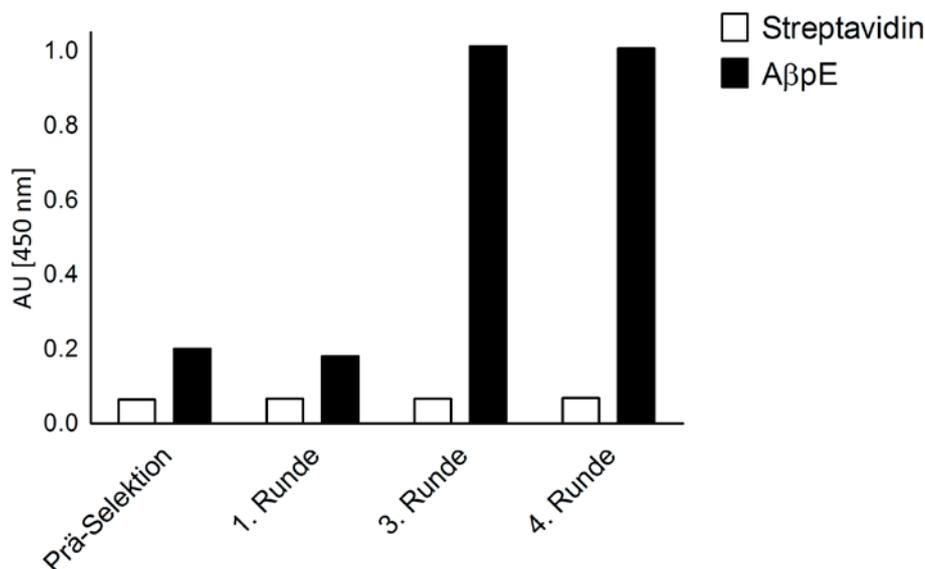
Abbildung 23 zeigt die Quantifizierung der Bindung der Phagen aus der Selektion gegen A $\beta$ pE ohne Aggregationskeime im Anreicherungs-ELISA.



**Abbildung 23: Anreicherungs-ELISA mit Phagen, die gegen AβpE ohne Aggregationskeime selektiert wurden.** Dargestellt ist die relative Quantifizierung der Phagenbindung vor der Selektion und nach den Selektionsrunden 1, 3 und 4. Gezeigt ist die Affinität für das Aggregationskeim-freie AβpE (schwarze Balken) und die unspezifische Bindung in leeren Streptavidin-beschichteten Wells (weiße Balken) in einer zweifachen Bestimmung als Absorption (AU = *absorption unit*) bei 450 nm. Nach der Selektionsrunde 2 wurde keine Phagenlösung für den ELISA aufbewahrt.

Die Phagen wiesen in allen vier Selektionsrunden eine niedrige Affinität für das Streptavidin und die Polystyroloberfläche auf. Die Affinität der selektierten Phagen für das AβpE war nach der ersten Runde ähnlich wie die der nicht-selektierten Phagen. Es zeigte sich eine deutliche Affinität für das AβpE in der dritten Runde. Die Absorptionswerte in der dritten und vierten Runde waren vergleichbar. Dies deutet darauf hin, dass die Signaldetektion im ELISA offenbar gesättigt war.

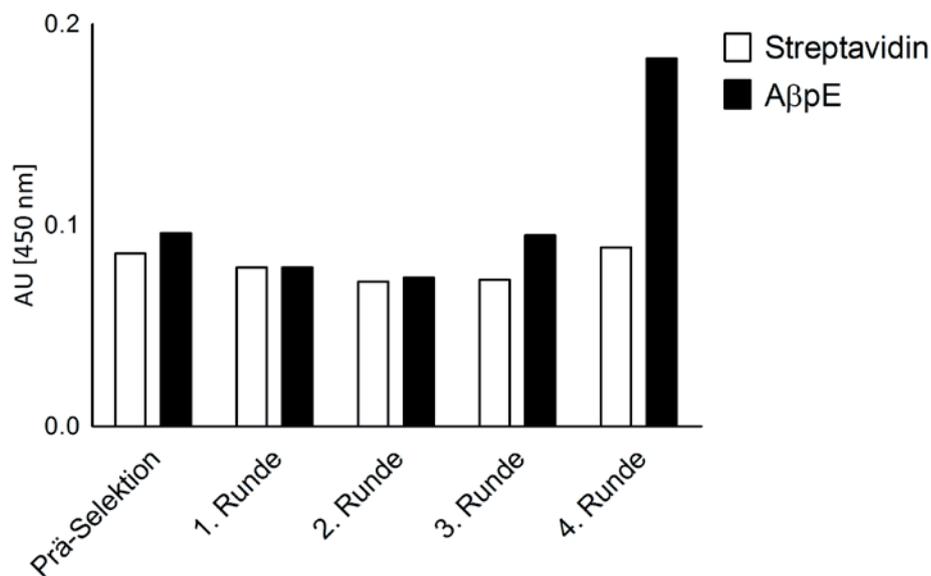
Eine ähnliche Entwicklung bzgl. der Bindungsaffinität war in der Selektion der Phagen gegen niedermolekulare AβpE-Aggregate zu erkennen. In Abbildung 24 sind die Ergebnisse zusammengefasst.



**Abbildung 24: Anreicherungs-ELISA mit Phagen, die gegen niedermolekulare AβpE-Aggregate selektiert wurden.** Dargestellt ist die relative Quantifizierung der Phagenbindung vor einer Selektion und nach den Selektionsrunden 1, 3 und 4. Gezeigt ist die Affinität für niedermolekulare AβpE-Aggregate (schwarze Balken) und die unspezifische Bindung in leeren Streptavidin-beschichteten Wells (weiße Balken) in einer zweifachen Bestimmung als Absorption (AU = *absorption unit*) bei 450 nm. Nach der Selektionsrunde 2 wurde keine Phagenlösung für den ELISA aufbewahrt.

Die Affinität für das Streptavidin und die Polystyroloberfläche war stets schwach. Bereits vor Beginn der Selektion lag eine leicht erhöhte Affinität für niedermolekulare A $\beta$ pE-Aggregate vor. Dies kann möglicherweise dadurch erklärt werden, dass eine relativ hohe Konzentration an immobilisiertem A $\beta$ pE in den Wells vorlag und dadurch eine unspezifische Bindung der Phagenbibliothek an die A $\beta$ pE-Aggregate erfolgte. Die spezifische Affinität für das A $\beta$ pE ist ab der dritten Runde deutlich gestiegen. Die Absorption in der dritten und vierten Runde ist in etwa gleich, was wiederum auf eine Sättigung des Signals im ELISA hindeuten könnte.

Als letztes wurde die Affinität derjenigen Phagen analysiert, die gegen hochmolekulare A $\beta$ pE-Aggregate selektiert wurden. Die ELISA-Auswertung hierzu ist in Abbildung 25 zu finden.



**Abbildung 25: Anreicherungs-ELISA mit Phagen, die gegen hochmolekulare A $\beta$ pE-Aggregate selektiert wurden.** Dargestellt ist die relative Quantifizierung der Phagenbindung vor der Selektion und nach den Selektionsrunden 1 bis 4. Gezeigt ist die Affinität für hochmolekulare A $\beta$ pE-Aggregate (schwarze Balken) und die unspezifische Bindung in leeren Streptavidin-beschichteten Wells (weiße Balken) in einer zweifachen Bestimmung als Absorption (AU = *absorption unit*) bei 450 nm.

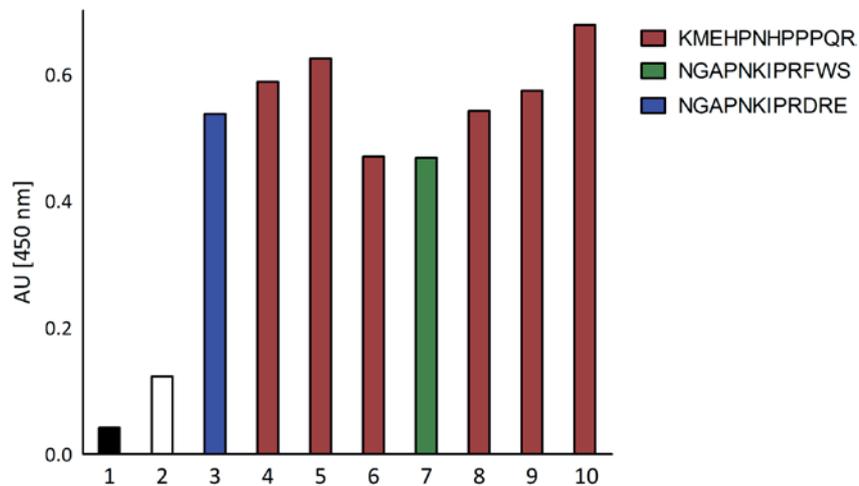
In dieser Selektion hatten die angereicherten Phagen eine schwache Affinität für das Streptavidin und die Polystyroloberfläche in allen vier Runden. Die Quantifizierung der Bindung an das A $\beta$ pE ergab eine steigende Affinität für die hochmolekularen Aggregate in der dritten und vierten Runde.

#### 4.5.1.1.2 EINZELPHAGEN-ELISA

Der Einzelphagen-ELISA diente zur Charakterisierung von einzelnen, isolierten Phagen aus den letzten Selektionsrunden und zur Auswahl von Kandidaten für spätere DNA-Sequenzanalysen. Hierfür wurden einige Einzelphagen aus Runde 4 amplifiziert. Diese Phagenlösungen wurden im ELISA bzgl. ihrer Affinität für die jeweiligen A $\beta$ pE-Konformere untersucht. Die relative Affinität der Einzelphagen wurde, nach Abzug der unspezifischen Bindung an das Streptavidin und die Polystyroloberfläche in leeren Wells, quantifiziert und verglichen. Von vielversprechenden Klonen mit einer hohen Affinität für das Zielpeptid wurde die DNA sequenziert. Nachfolgend sind

die Auswertungen der ELISA mit Angaben der Peptide der sequenzierten Klone zusammengefasst.

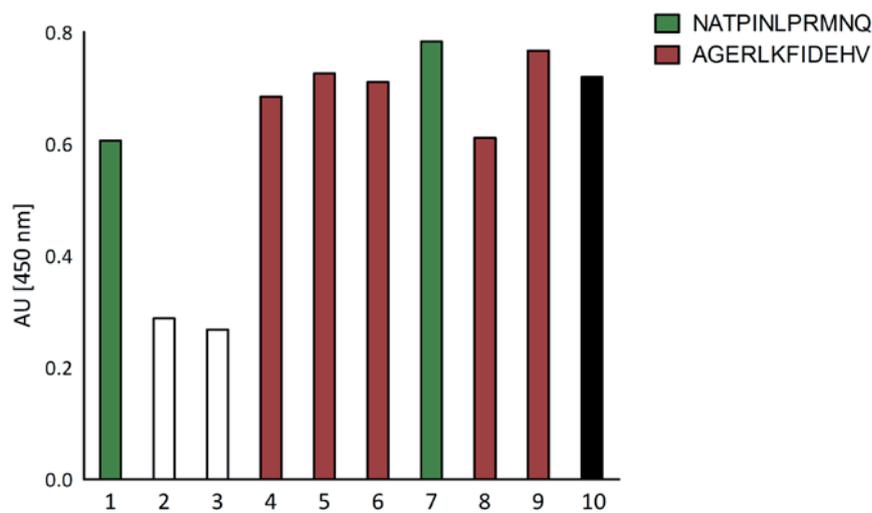
In Abbildung 26 ist der Einzelphagen-ELISA einiger Phagen zu sehen, die gegen A $\beta$ pE ohne Aggregationskeime selektiert wurden.



**Abbildung 26: Einzelphagen-ELISA mit Phagen, die gegen A $\beta$ pE ohne Aggregationskeime selektiert wurden.** Dargestellt ist die relative Quantifizierung der Bindung der Phagen 1 bis 10 aus Runde 4. Gezeigt ist die Affinität für A $\beta$ pE nach Abzug der unspezifischen Bindung in leeren Streptavidin-beschichteten Wells in einer zweifachen Bestimmung als Absorption (AU = *absorption unit*) bei 450 nm. Klone mit roten Balken wiesen das Peptid KMEHPNHPPPQR, grüne das Peptid NGAPNKIPRFWS und blaue das Peptid NGAPNKIPRDRE auf. Es gilt die Ein-Buchstaben-Kodierung der Aminosäuren. Für Klone mit schwarzen Balken lagen keine Sequenzdaten vor, Klone mit weißen Balken wiesen andere unspezifische Peptide auf.

Gemäß der Absorption ergab sich die höchste Affinität für das Peptid KMEHPNHPPPQR in sechs Klonen, gefolgt von NGAPNKIPRFWS bzw. NGAPNKIPRDRE in zwei anderen Klonen. Das letztere Peptid wurde ein weiteres Mal in einem anderen Klon nachgewiesen. Die aus diesen Peptiden abgeleiteten spiegelbildlichen D-Peptide KMEHPNHPPPQR und NGAPNKIPRDRE wurden entsprechend mit D4 und D5 bezeichnet.

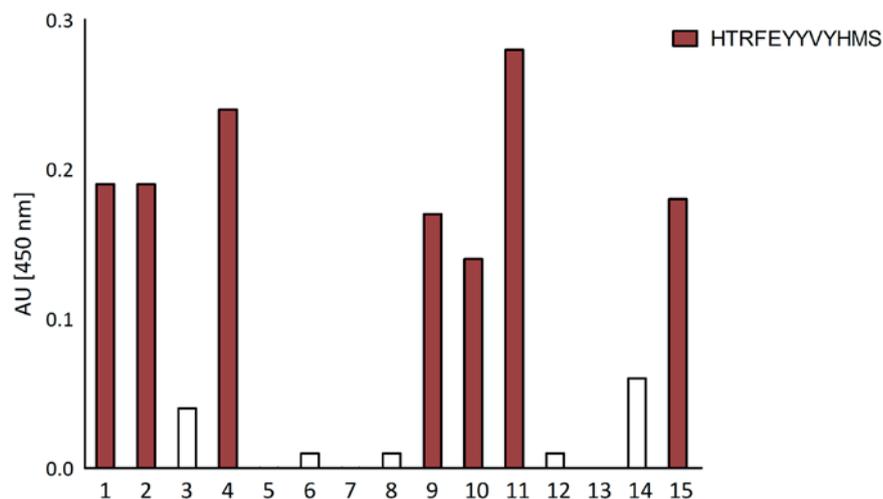
Die gleiche Analyse wurde mit Einzelphagen durchgeführt, die gegen niedermolekulare A $\beta$ pE-Aggregate selektiert wurden. Die entsprechenden ELISA-Ergebnisse sind in Abbildung 27 zusammengestellt.



**Abbildung 27: Einzelphagen-ELISA mit Phagen, die gegen niedermolekulare A $\beta$ pE-Aggregate selektiert wurden.** Dargestellt ist die relative Quantifizierung der Bindung der Phagen 1 bis 10 aus Runde 4. Gezeigt ist die Affinität für A $\beta$ pE nach Abzug der unspezifischen Bindung in leeren Streptavidin-beschichteten Wells in einer zweifachen Bestimmung als Absorption (AU = *absorption unit*) bei 450 nm. Klone mit roten Balken wiesen das Peptid AGERLKFIDEHV und grüne das Peptid NATPINLPRMNQ auf. Es gilt die Ein-Buchstaben-Kodierung der Aminosäuren. Für Klone mit schwarzen Balken lagen keine Sequenzdaten vor, Klone mit weißen Balken wiesen andere unspezifische Peptide auf.

Auch hier wurden zwei Peptide, AGERLKFIDEHV sowie NATPINLPRMNQ, identifiziert, die eine relativ hohe Affinität für niedermolekulare A $\beta$ pE-Aggregate hatten. Da das Peptid AGERLKFIDEHV mit fünf Klonen häufiger vorkam als NATPINLPRMNQ, wurde das entsprechende Spiegelbild-D-Peptid für weitere Analysen ausgewählt und als D6 bezeichnet.

Die Auswertung der Phagen, die gegen hochmolekulare A $\beta$ pE-Aggregate selektierten wurden, ist in Abbildung 28 dargestellt.

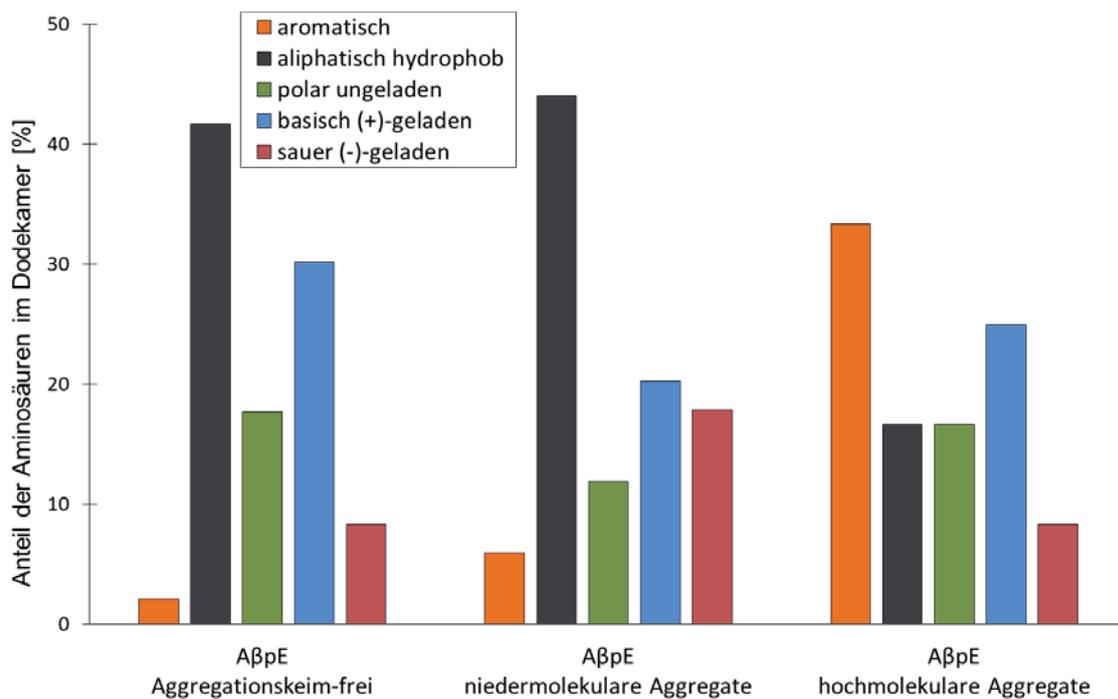


**Abbildung 28: Einzelphagen-ELISA mit Phagen, die gegen hochmolekulare A $\beta$ pE-Aggregate selektiert wurden.** Dargestellt ist die relative Quantifizierung der Bindung der Phagen 1 bis 10 aus Runde 4. Gezeigt ist die Affinität für A $\beta$ pE nach Abzug der unspezifischen Bindung in leeren Streptavidin-beschichteten Wells in einer zweifachen Bestimmung als Absorption (AU = *absorption unit*) bei 450 nm. Klone mit roten Balken wiesen das Peptid HTRFEYVYHMS vor. Es gilt die Ein-Buchstaben-Kodierung der Aminosäuren. Klone mit weißen Balken wiesen andere unspezifische Peptide auf.

Hier haben sich ausschließlich Phagen mit dem Peptid HTRFEYVYHMS angereichert. Das entsprechende spiegelbildliche D-Peptid wurde als D7 bezeichnet.

#### 4.5.1.1.3 AMINOSÄURE-ZUSAMMENSETZUNG DER D-PEPTIDE

Die in den Einzelphagen-ELISA identifizierten spezifischen Peptide wurden bzgl. ihres Anteils an verschiedenen Aminosäuregruppen verglichen. Hierfür ergaben sich unterschiedliche Charakteristika der Peptide, abhängig vom A $\beta$ pE-Zielkonformer während der Selektion. Eine Zusammenfassung der unterschiedlichen Aminosäure-Zusammensetzung in den Phagen-präsentierten Peptiden, die gegen A $\beta$ pE im Aggregationskeim-freien Zustand, niedermolekularen und hochmolekularen Aggregatzustand selektiert wurden, ist in Abbildung 29 dargestellt.



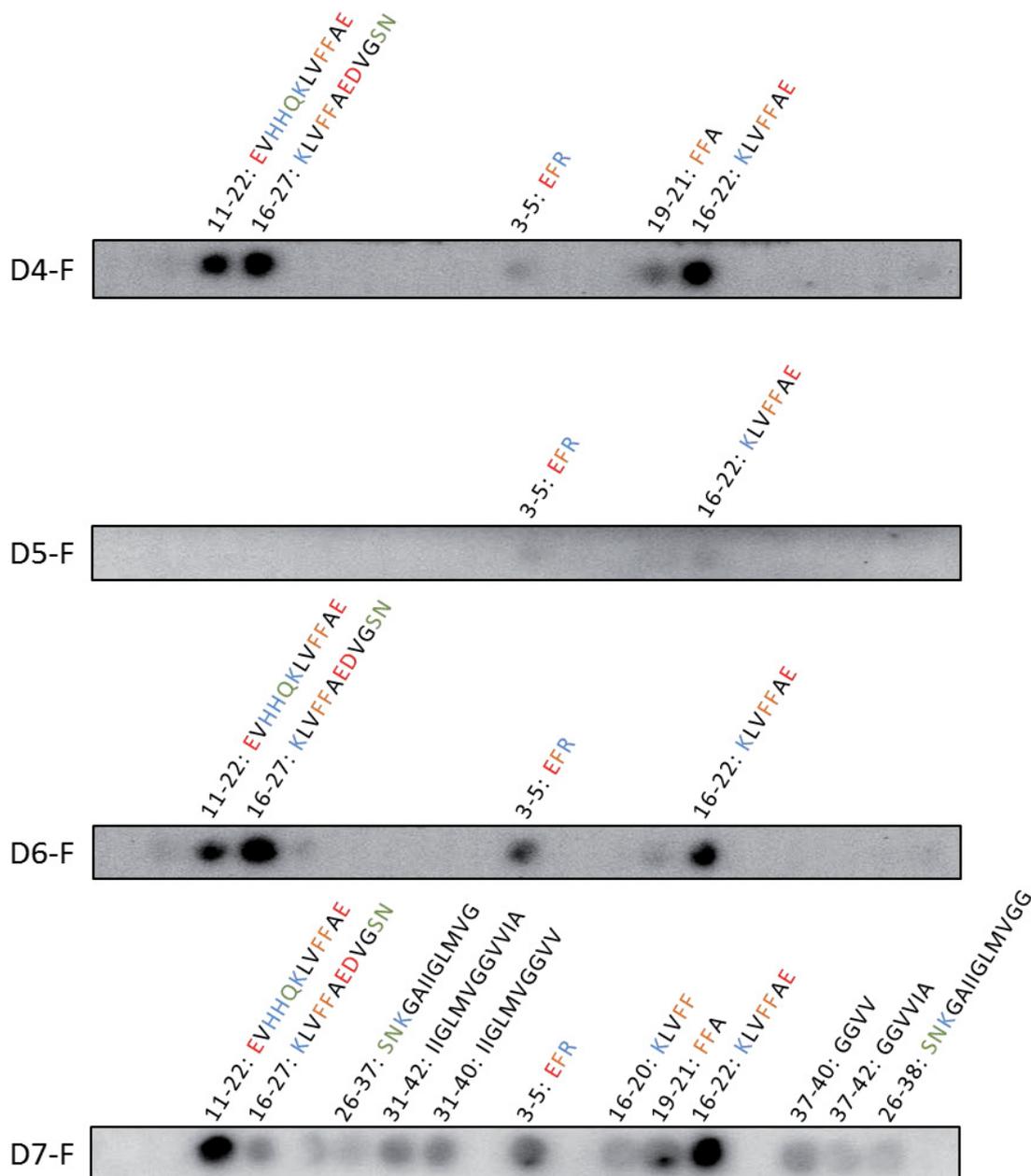
**Abbildung 29: Aminosäure-Zusammensetzung der Peptide, die gegen verschiedene A $\beta$ pE-Konformere selektiert wurden.** Dargestellt ist die Anzahl der aromatischen, aliphatisch hydrophoben, polar ungeladenen, basisch positiv-geladenen sowie sauren negativ-geladenen Aminosäuren in Peptiden, die gegen A $\beta$ pE ohne Aggregationskeime, niedermolekulare und hochmolekulare A $\beta$ pE-Aggregate selektiert wurden. Berechnet wurde der gewichtete Mittelwert der Anzahl der Aminosäuren pro Sequenz in allen spezifisch bindenden Peptiden, die im Einzelphagen-ELISA untersucht wurden.

Peptide, die gegen A $\beta$ pE im Aggregationskeim-freien Zustand und niedermolekularen Aggregatzustand selektiert wurden, hatten einen vergleichsweise hohen Anteil an aliphatisch hydrophoben Aminosäuren (> 40 %). In beiden Peptidgruppen war der Anteil der aromatischen und polaren Reste relativ gering mit weniger als 10 %. Der durchschnittliche Anteil der basischen Aminosäuren pro Peptid lag bei etwa 20 bis 30 %, der der sauren Aminosäuren bei 8 % (A $\beta$ pE Aggregationskeim-frei) bzw. 18 % (niedermolekulare A $\beta$ pE-Aggregate).

Peptide, die gegen A $\beta$ pE mit hochmolekularen Aggregaten selektiert wurden, wiesen andere Eigenschaften auf als diejenigen, die gegen A $\beta$ pE im Aggregatskeim-freien Zustand sowie niedermolekularen Aggregatzustand selektiert wurden. In dieser Peptidgruppe war ein hoher Anteil an aromatischen Resten pro Peptid vorhanden (33 %). Der Anteil an aliphatisch hydrophoben Resten war mit 17 % deutlich geringer als in den anderen beiden Peptidgruppen. Der Anteil der polaren, basischen sowie sauren Reste in den Peptiden war vergleichbar mit demjenigen in den Peptiden, die gegen die beiden anderen A $\beta$ pE-Konformere selektiert wurden.

#### 4.5.1.2 BESTIMMUNG DES BINDEEPITOPS MITTELS PEPSPOT-MEMBRAN

Zur Bestimmung des Bindeepitops der selektierten D-Peptide D4, D5, D6 und D7 am A $\beta$ -Peptid wurden PepSpot-Analysen mit unterschiedlichen A $\beta$ 1-42- und A $\beta$ pE-Fragmenten durchgeführt. Hierfür wurden die Fluoreszein-markierte D-Peptide auf die Membran appliziert und mit einem anti-FITC HRP-Konjugat detektiert. Die Zusammenfassung der PepSpot-Analysen ist in Abbildung 30 gezeigt. Eine schematische Übersicht aller immobilisierten A $\beta$ -Fragmente auf der Membran ist im Anhang aufgeführt (vgl. Abbildung 47).



**Abbildung 30: PepSpot-Analysen zur Bestimmung des Bindeepitops der Fluoreszenz-markierten D-Peptide an A $\beta$ 1-42 und A $\beta$ pE.** Dargestellt sind die Zellulose-Membranen mit unterschiedlichen, am Carboxy-Terminus immobilisierten A $\beta$ - und A $\beta$ pE-Fragmenten nach der Applikation von D4-F (5 Minuten Expositionszeit), D5-F (0,5 Minuten Expositionszeit), D6-F (5 Minuten Expositionszeit) und D7-F (0,5 Minuten Expositionszeit) sowie einem anti-FITC HRP-Konjugat mit anschließender Substratdetektion. Die Expositionszeiten wurden so gewählt, dass ein optimales Verhältnis zwischen spezifischer Antikörperdetektion und unspezifischem Hintergrundsignal vorlag. Es gilt die Einbuchstaben-Kodierung der Aminosäuren. Die unterschiedlichen Aminosäuregruppen sind wie folgt markiert: schwarz = aliphatisch hydrophob; orange = aromatisch; grün = polar ungeladen; blau = basisch positiv-geladen; rot = sauer negativ-geladen.

Die Expositionszeiten wurden variiert und lagen bei einer halben Minute und bis zu fünf Minuten. Analysiert wurde diejenigen Bilder, die ein optimales Verhältnis zwischen spezifischer Antikörperdetektion und unspezifischen Hintergrundsignal vorweisen konnten. Anhand der Signale wurden unterschiedliche Bindepräferenzen der vier Peptide festgestellt. D4 zeigte eine deutliche Bindung an den zentralen hydrophoben Bereich, der unter anderem durch die Gruppierung der hydrophoben Aminosäuren LVFFA gebildet wird. Die Bindung an FFA alleine war hingegen wesentlich schwächer. Der Amino-Terminus wurde ebenfalls schwach gebunden, aber erst ab der dritten und bis zur fünften Aminosäure (EFR).

D5-F hat nur relativ schwach an einige Fragmente gebunden. Diese Bindung beschränkte sich ausschließlich auf die Amino-terminalen Peptide EFR sowie die zentrale KLVFFA-Region.

D6-F zeigte ähnliche Bindungseigenschaften wie D4 mit dem Unterschied, dass das Peptid EFR stärker gebunden wurde.

D7-F zeigte eine vergleichsweise starke Bindung, die insbesondere auf den zentralen Bereich mit LVFFA konzentriert war. Zusätzlich zu den anderen drei D-Peptiden wurde aber auch der Carboxy-Terminus gebunden. Das Peptid EFR am Amino-Terminus war auch hier wieder als Binderegion zu erkennen.

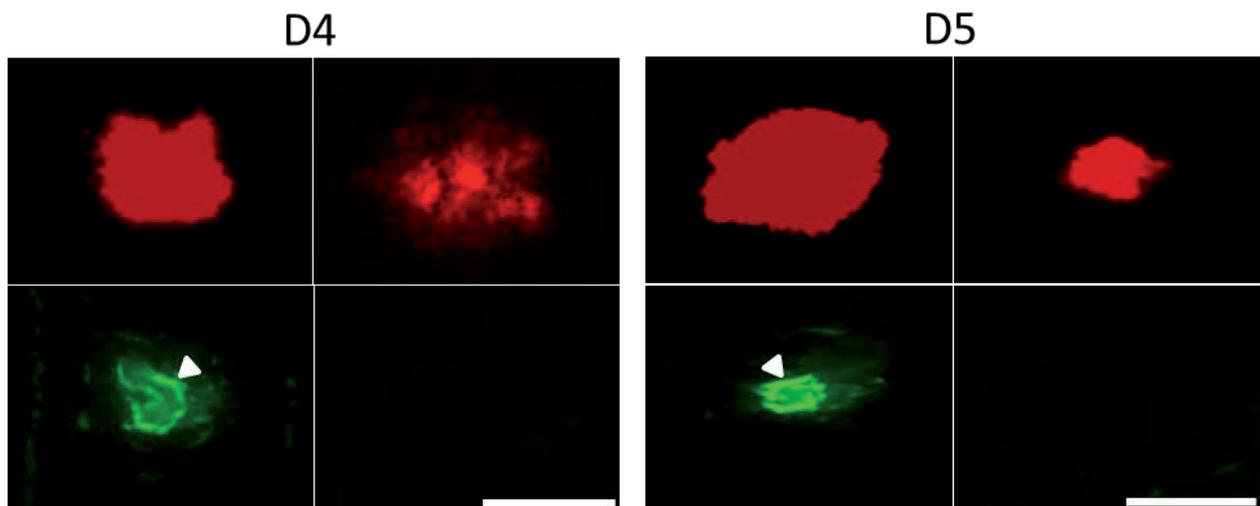
#### **4.5.1.3 Ex vivo-PLAQUEBINDEEIGENSCHAFTEN IN TRANSGENEN MÄUSEN**

Des Weiteren wurden ergänzend zu den *in vitro*-Bindungsstudien zusätzliche *ex vivo*-Bindungseigenschaften untersucht. Hierzu wurden Hirnschnitte transgener Tg2576-Mäuse (Alter 10 bis 11 Monate) verwendet. Die Präparate wurden von Dirk Bier (Institut für Nuklearchemie, Forschungszentrum Jülich, Jülich) bereitgestellt. Die Kryo-Schnitte wurden mit den Fluoreszeinkmarkierten D-Peptiden behandelt und mikroskopiert.

Als Kontrolle wurden im Anschluss Kongorot-Färbungen derselben Proben durchgeführt, die zur Verifizierung der Plaquestrukturen dienen. Schnitte von Wildtyp-Tieren ohne Plaquetbildung wurden ebenfalls behandelt. In diesen Proben konnte keine Kongorot- sowie Fluoreszein-Fluoreszenz detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Es werden im Folgenden jeweils beispielhafte Plaquetbilder gezeigt. Die beobachteten Strukturen waren aber in sämtliche Plaques in den jeweiligen Schnittpräparaten zu beobachten.

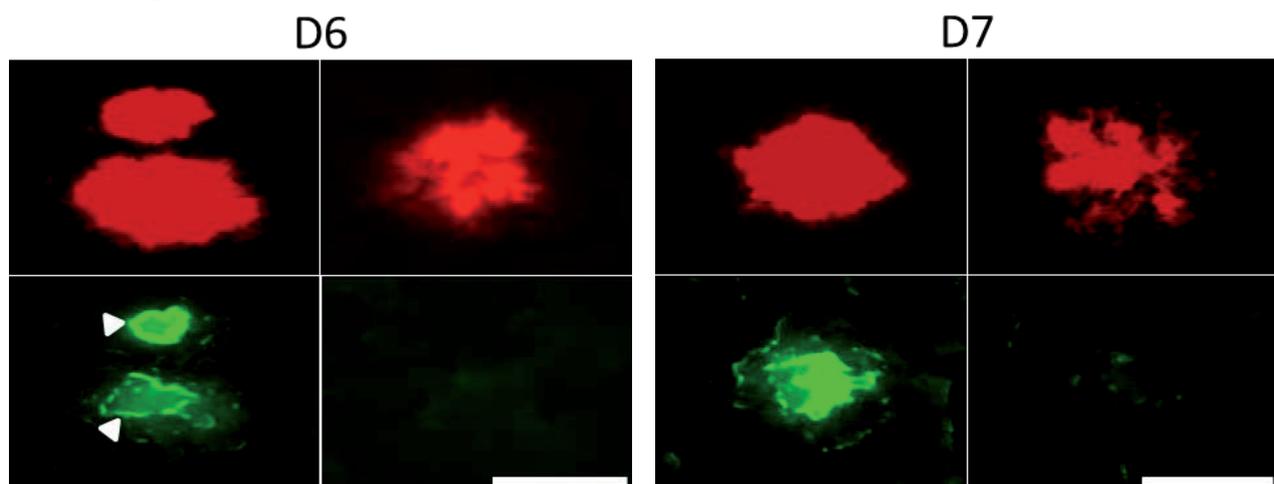
Das Ergebnis der histologischen Färbungen mit den Peptiden D4-F und D5-F ist in Abbildung 31 gezeigt. Dargestellt sind kortikale Strukturen in frontaler Ansicht.



**Abbildung 31: Histologische Färbung von Plaques im Kortex von Tg2576-Mäusen mit D4-F, D5-F und Kongorot.** In der oberen Reihe ist die Kongorotfluoreszenz ( $\lambda_{\text{ex}} = 553 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 610 \text{ nm}$ ) bei einer Expositionszeit von 200 ms abgebildet. In der unteren Reihe ist die Bindung der Fluoreszein-markierten D-Peptide in denselben Plaques ( $\lambda_{\text{ex}} = 480 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 535 \text{ nm}$ ) bei einer Expositionszeit von 500 ms gezeigt. Für jedes D-Peptid sind links ausgewählte dichte Plaques und rechts diffuse bzw. kleine Plaques abgebildet. Die Pfeile kennzeichnen stärker konzentrierte Binderegionen der Peptide in den Plaques. Die Aufnahmen erfolgten bei einer 100-fachen Vergrößerung. Der weiße Maßstabsbalken entspricht einer Länge von  $50 \mu\text{m}$  und gilt für alle Bilder.

In den Gehirnschnitten, die sowohl mit D4-F als auch mit D5-F behandelt wurden, wurden nur diejenigen Plaques von den D-Peptiden gebunden, die gemäß der Kongorot-Kontrollfärbung eine dichte Struktur vorweisen. Diffuse und kleinere Plaques hingegen wurden nicht gefärbt. Zudem zeigten D4-F und D5-F eine lokalisierte Bindung, bei der ringförmige Strukturen um den inneren Plaquekern herum stärker gefärbt wurden.

Die Auswertung der Färbungen mit den Peptiden D6-F und D7-F sind in Abbildung 32 zusammengefasst.



**Abbildung 32: Histologische Färbung von Plaques im Kortex von Tg2576 Mäusen mit D6-F, D7-F und Kongorot.** Dargestellt ist in der oberen Reihe die Kongorotfluoreszenz ( $\lambda_{\text{ex}} = 553 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 610 \text{ nm}$ ) bei einer Expositionszeit von 200 ms. In der unteren Reihe ist die Bindung der Fluoreszein-markierten D-Peptide in denselben Plaques ( $\lambda_{\text{ex}} = 480 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 535 \text{ nm}$ ) bei einer Expositionszeit von 500 ms abgebildet. Für jedes D-Peptid sind links ausgewählte dichte Plaques und rechts diffuse bzw. kleine Plaques abgebildet. Die Pfeile kennzeichnen stärker konzentrierte Bindebereiche der Peptide in den Plaques. Die Aufnahmen erfolgten bei einer 100-fachen Vergrößerung. Der weiße Maßstabsbalken entspricht einer Länge von  $50 \mu\text{m}$  und gilt für alle Bilder.

D6-F und D7-F haben ebenfalls keine diffusen, sondern ausschließlich dichte Plaques gebunden. Während D6-F ebenfalls wie D4-F und D5-F ringförmige Strukturen außerhalb des Plaquekerns anfärbte, zeigte D7-F ein davon abweichendes Muster, bei der hauptsächlich der zentrale Kern der Plaques gebunden wurde.

## 4.5.2 A $\beta$ 1-42-OLIGOMER BINDENDE D-PEPTIDE ALS POTENTIELLE AGGREGATIONSINHIBITOREN

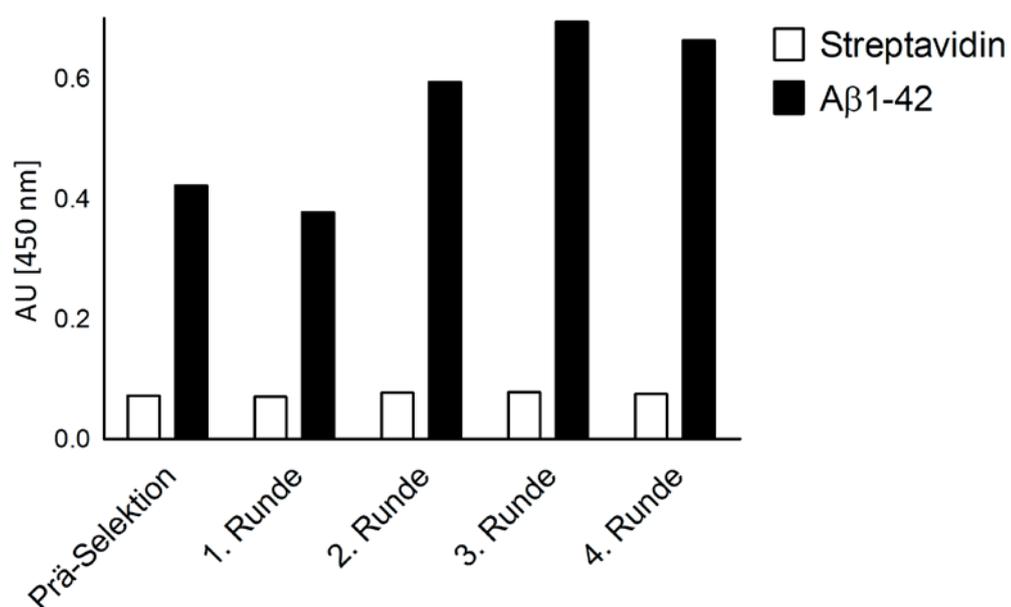
### 4.5.2.1 PHAGENDISPLAYSELEKTION DER D-PEPTIDE DO1, DO2 UND DO3

Die Selektion im Spiegelbild-Phagendisplay mit Dodekamer- und Septamer-präsentierenden Phagen wurde gegen die oligomere Form von A $\beta$ 1-42, die mittels Gelfiltration präpariert wurde, durchgeführt. Dieses Konformer gilt als die am stärksten toxische Form des A $\beta$ -Peptids. Die Umformung von Oligomeren und die Modifikation ihrer Toxizität stellen daher vielversprechende therapeutische Ziele für die Behandlung der AD dar. Zwei septamere D-Peptide SQPLWPP und QPHSRLP sowie ein dodekames Peptid SGWHYNWQYWWK wurden aus den spiegelbildlichen L-Peptiden aus der Phagendisplayselektion abgeleitet und entsprechend mit DO1, DO2 und DO3 bezeichnet. Die Ergebnisse zu den Selektionen sind in den folgenden Kapiteln zusammengefasst.

#### 4.5.2.1.1 ANREICHERUNGS-ELISA

Zur Beurteilung der Affinität der Phagen aus den Selektionen wurden Anreicherungs-ELISA mit den amplifizierten Phagen aus den vier Selektionsrunden sowie der nicht-selektierten Phagenbibliothek durchgeführt. Im ELISA wurde die spezifische Bindung der Phagen an das A $\beta$ 1-42-Oligomer und die unspezifische Bindung an das Streptavidin und die Polystyroloberfläche in leeren Streptavidin-beschichteten Wells quantifiziert.

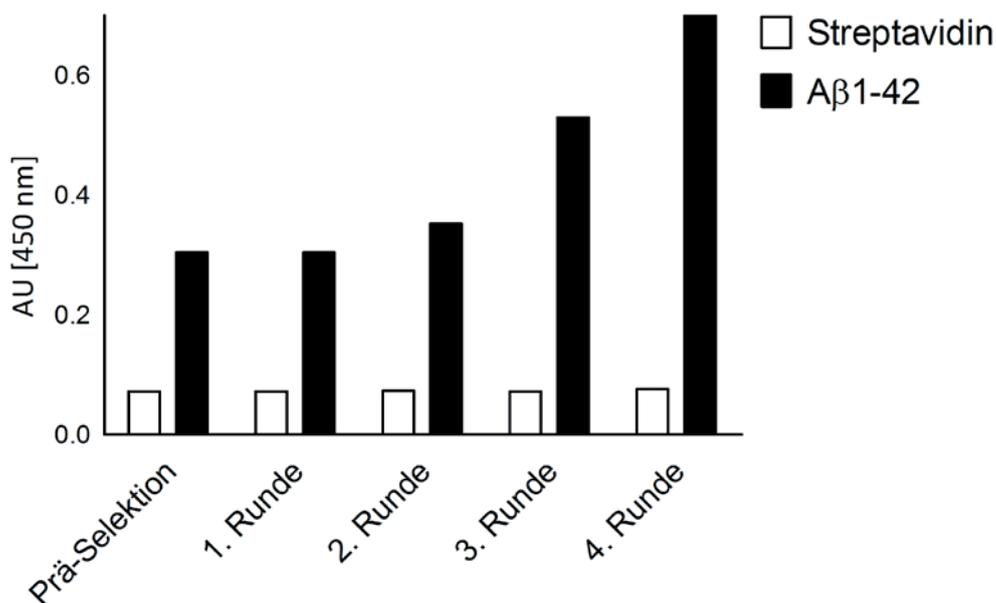
Abbildung 33 zeigt die Auswertung vom Anreicherungs-ELISA für die Selektion von Dodekameren gegen A $\beta$ 1-42-Oligomere.



**Abbildung 33: Anreicherungs-ELISA mit Dodekamer-präsentierenden Phagen, die gegen A $\beta$ 1-42 Oligomere selektiert wurden.** Dargestellt ist die relative Quantifizierung der Phagenbindung vor der Selektion und nach den Selektionsrunden 1 bis 4. Gezeigt ist die Affinität für das oligomere A $\beta$ 1-42 (schwarze Balken) sowie die unspezifische Bindung in leeren Streptavidin-beschichteten Wells (weiße Balken) in einer zweifachen Bestimmung als Absorption (AU = *absorption unit*) bei 450 nm.

Die Phagenbibliothek wies bereits vor der eigentlichen Selektion eine höhere Affinität für das A $\beta$ 1-42-Oligomer im Vergleich zum leeren Well auf, was eventuell auf eine hohe Konzentration der immobilisierten Oligomere und einer unspezifischen Bindung der Phagen an diese zurückzuführen ist. Die unspezifische Bindung der Phagen an Streptavidin und die Polystyroloberfläche blieb im Laufe der vier Selektionsrunden schwach, während die Affinität für das Oligomer ab der zweiten Runde zunahm. Die Affinitäten in der dritten und vierten Runde waren ähnlich, was auf eine Sättigung der Signaldetektion im ELISA hinweisen könnte.

Die Ergebnisse zum Anreicherungs-ELISA zur Selektion der Septamere sind in folgender Abbildung zusammengefasst.



**Abbildung 34: Anreicherungs-ELISA von Septamer-präsentierenden Phagen, die gegen A $\beta$ 1-42 Oligomere selektiert wurden.** Dargestellt ist die relative Quantifizierung der Phagenbindung vor der Selektion und nach den Selektionsrunden 1 bis 4. Gezeigt ist die Affinität für das oligomere A $\beta$ 1-42 (schwarze Balken) sowie die unspezifische Bindung in leeren Streptavidin-beschichteten Wells (weiße Balken) in einer zweifachen Bestimmung als Absorption (AU = *absorption unit*) bei 450 nm.

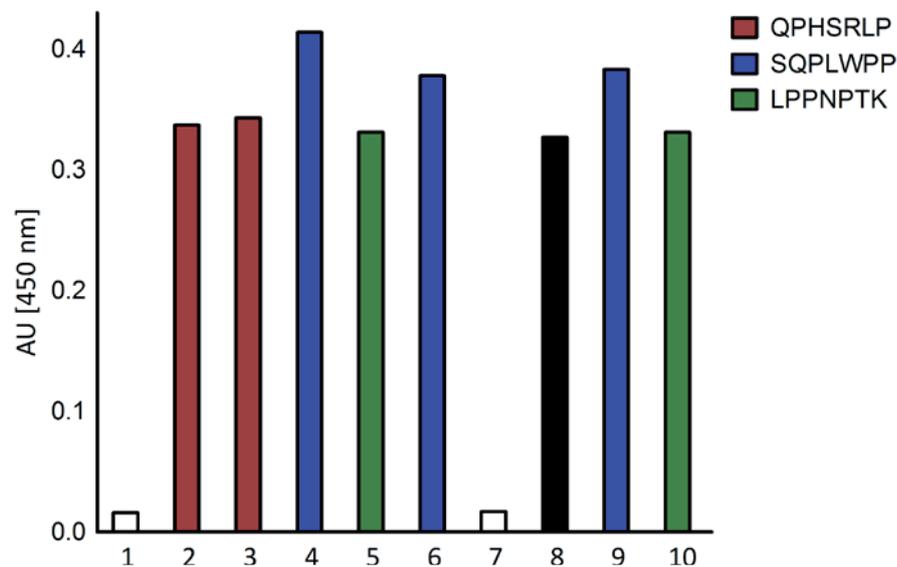
Die Phagenbibliothek wies auch hier bereits vor der Selektion eine höhere Affinität für die Oligomere auf im Vergleich zu der unspezifischen Bindung in leeren Wells. Dies wird vermutlich ebenfalls durch eine konzentrationsbedingte unspezifische Bindung der Phagen an die immobilisierten Oligomere verursacht. Die Affinität für die Oligomere stieg ab der zweiten Runde. Das Signal ist bis zur vierten Runde nicht gesättigt. Die unspezifische Bindung der Phagen an das Streptavidin und die Polystyroloberfläche in den leeren Wells war in allen Selektionsrunden unverändert schwach.

#### 4.5.2.1.2 EINZELPHAGEN-ELISA

Der Einzelphagen-ELISA diente zur Charakterisierung von einzelnen, isolierten Klonen aus den letzten Selektionsrunden und zur Auswahl von Kandidaten für spätere DNA-Sequenzanalysen. Hierfür wurden einige Einzelphagen aus Runde 4 amplifiziert. Diese Phagenlösungen wurden im ELISA bzgl. ihrer Bindung an die A $\beta$ 1-42-Oligomere untersucht. Die relative Affinität der

Einzelphagen wurde, nach Abzug der unspezifischen Bindung an das Streptavidin und die Polystyroloberfläche in leeren Wells, quantifiziert und verglichen. Von vielversprechenden Klonen wurde die DNA sequenziert. In den folgenden Abbildungen sind die Ergebnisse der Einzelphagen-ELISA mit Angaben der Peptide der sequenzierten Klone zusammengefasst.

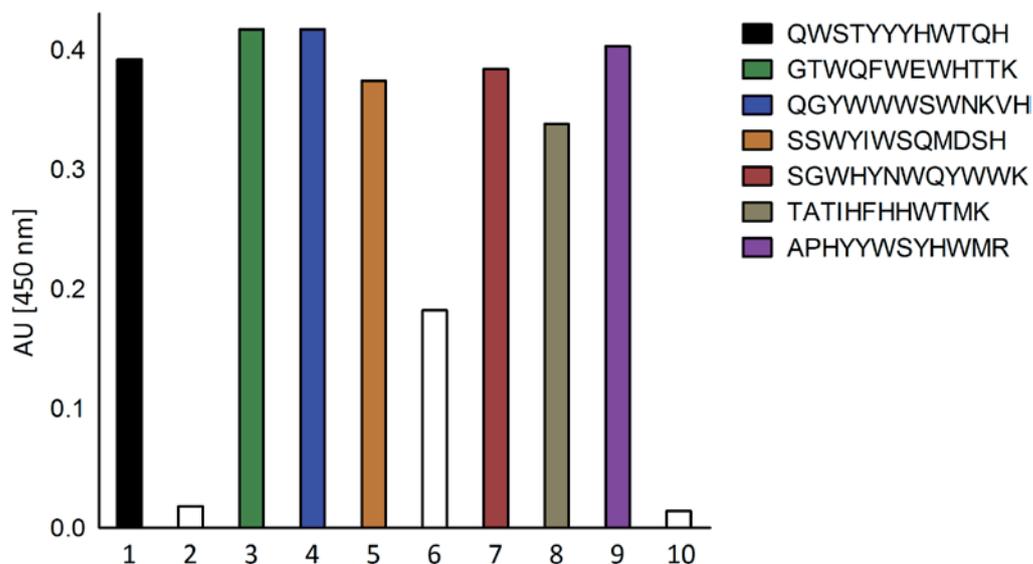
Die Quantifizierung der Bindung an Oligomere in den Septamer-präsentierenden Phagen ist in Abbildung 35 zu finden.



**Abbildung 35: Einzelphagen-ELISA mit Septamer-präsentierenden Phagen, die gegen A $\beta$ 1-42 Oligomere selektiert wurden.** Dargestellt ist die relative Quantifizierung der Bindung der Phagen 1 bis 10 aus Runde 4. Gezeigt ist die Affinität für das A $\beta$ 1-42-Oligomer nach Abzug der unspezifischen Bindung in leeren Streptavidin-beschichteten Wells in einer zweifachen Bestimmung als Absorption (AU = *absorption unit*) bei 450 nm. Klone mit roten Balken wiesen das Peptid QPHSRLP, blaue das Peptid SQPLWPP und grüne das Peptid LPPNPTK auf. Es gilt die Ein-Buchstaben-Kodierung der Aminosäuren. Für Klone mit schwarzen Balken lagen keine Sequenzdaten vor, Klone mit weißen Balken wiesen unspezifische Peptide auf.

Es traten drei Phagen mit einer relativ hohen Affinität für das A $\beta$ 1-42-Oligomer auf. Die Sequenzierung der DNA dieser Phagen ergab die Peptide QPHSRLP, SQPLWPP und LPPNPTK. Diese Peptide haben einen hohen Anteil an der unpolaren Aminosäure Prolin. Für weitere Studien wurden die entsprechenden Spiegelbild-D-Peptide SQPLWPP sowie QPHSRLP mit DO1 und DO2 bezeichnet.

In Abbildung 36 ist die Quantifizierung der Bindung von einigen amplifizierten Dodekamer-präsentierenden Phagen an das A $\beta$ 1-42-Oligomer im Einzelphagen-ELISA zu sehen.

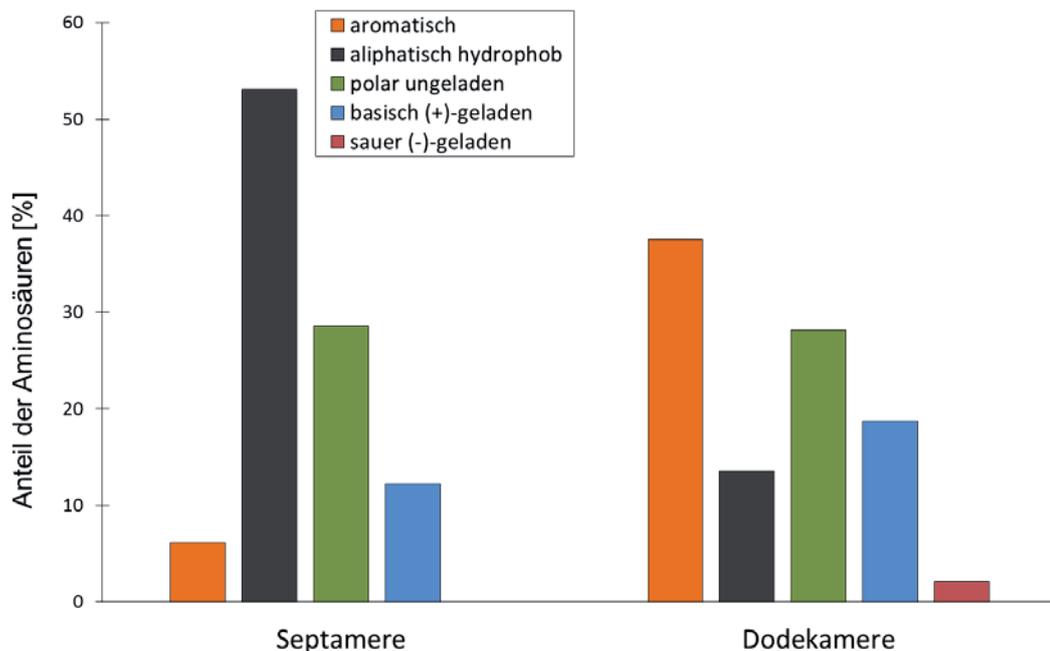


**Abbildung 36: Einzelphagen-ELISA mit Dodekamer-präsentierenden Phagen, die gegen A $\beta$ 1-42 Oligomere selektiert wurden.** Dargestellt ist die relative Quantifizierung der Bindung der Phagen 1 bis 10 aus Runde 4. Gezeigt ist die Affinität für das A $\beta$ 1-42-Oligomer nach Abzug der unspezifischen Bindung in leeren Streptavidin-beschichteten Wells in einer zweifachen Bestimmung als Absorption (AU = *absorption unit*) bei 450 nm. Alle spezifisch bindenden Klone wiesen unterschiedliche Peptide auf. Es gilt die Ein-Buchstaben-Kodierung der Aminosäuren. Für Klone mit schwarzen Balken lagen keine Sequenzdaten vor, Klone mit weißen Balken wiesen unspezifische Peptide auf.

Im Gegensatz zu dem Einzelphagen-ELISA mit den Dodekamer-präsentierenden Phagen hatten die im ELISA untersuchten Septamer-präsentierenden Phagen keine mehrfach auftretenden Peptide vorzuweisen. Allerdings besaßen sämtliche identifizierte Peptide einen sehr hohen aromatischen Aminosäureanteil mit zumeist Tryptophanen und Tyrosinen. Einzig das Peptid SGWHYNWQYWWK konnte in einem weiteren Phagenklon, der später zusätzlich sequenziert wurde, nachgewiesen werden, weshalb dieses Peptid für weitere Versuche ausgewählt wurde. Das abgeleitete Spiegelbild-D-Peptid wurde folglich mit DO3 bezeichnet.

#### 4.5.2.1.3 AMINOSÄURE-ZUSAMMENSETZUNG DER D-PEPTIDE

Die in den Einzelphagen-Analysen identifizierten Peptide wurden bzgl. ihres Anteils an verschiedenen Aminosäuregruppen verglichen. Hierfür ergaben sich unterschiedliche Charakteristika der Peptide in Abhängigkeit von der Peptidlänge. Eine Zusammenfassung der verschiedenen Eigenschaften der Septamere und Dodekamere, die im Einzelphagen-ELISA spezifisch für A $\beta$ 1-42-Oligomere sind, ist in Abbildung 37 dargestellt.



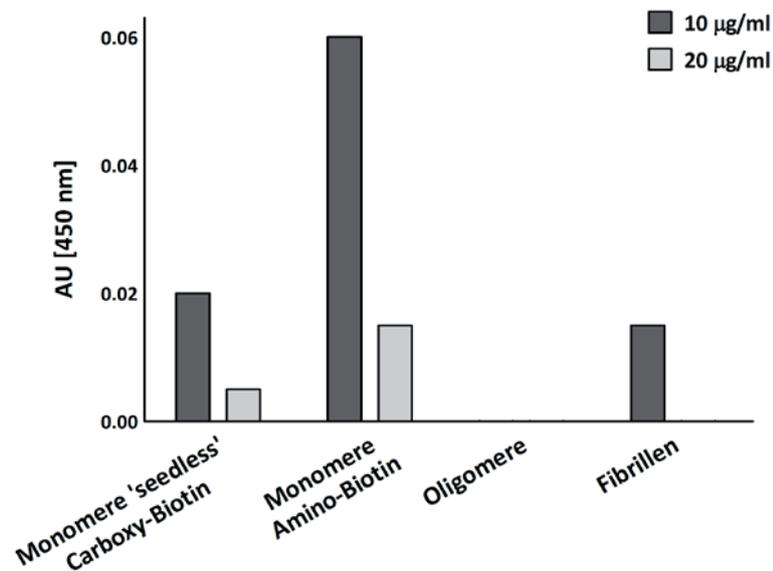
**Abbildung 37: Aminosäure-Zusammensetzung der septameren und dodekameren Peptide, die gegen A $\beta$ 1-42 Oligomere selektiert wurden.** Dargestellt ist die Anzahl der aromatischen, aliphatisch hydrophoben, polar ungeladenen, basisch positiv-geladenen sowie sauren negativ-geladenen Aminosäuren in den Peptiden, die spezifisch für A $\beta$ 1-42-Oligomere waren. Berechnet wurde der gewichtete Mittelwert der Anzahl der Aminosäuren pro Sequenz in allen spezifisch bindenden Peptiden, die im Einzelphagen-ELISA untersucht wurden.

Septamere und dodekamere Peptide, die gegen A $\beta$ 1-42-Oligomere selektiert wurden und die gemäß Einzelphagen-ELISA eine Affinität für das Zielpeptid vorweisen, unterschieden sich hinsichtlich der Zusammensetzung der Aminosäuren. Dodekamere Peptide hatten mit durchschnittlich 38 % einen höheren Anteil an aromatische Aminosäuren als Septamere, bei denen der Anteil dieser Aminosäuren bei nur 6 % lag. Zusätzlich hatten Dodekamere auch vergleichsweise mehr basische Reste mit 19 %. Der Anteil an polaren Aminosäuren war mit 29 % in beiden Peptidgruppen identisch. Hingegen hatten Septamere mit durchschnittlich 53 % mehr aliphatisch hydrophobe Reste pro Peptid als Dodekamere, bei denen der Anteil 14 % betrug. Der relative Anteil an sauren Aminosäuren war in beiden Gruppen äußerst gering bzw. nicht vorhanden.

#### 4.5.2.2 *IN VITRO*-BINDEEIGENSCHAFTEN DER D-PEPTIDE

Die relativen *in vitro*-Bindungsaffinitäten und -spezifitäten von DO1, DO2 und DO3 wurden mittels ELISA-Experiment quantifiziert. Hierfür wurden verschiedene biotinylierte A $\beta$ 1-42-Konformere immobilisiert und das jeweilige Fluoreszein-markierte D-Peptid appliziert. Mit einem anti-FITC HRP-Konjugat wurden gebundene D-Peptide nachgewiesen. Es wurden sowohl *seedless*-Monomere aus Carboxy-terminal biotinylierten A $\beta$  als auch Monomere aus der Gelfiltrationschromatographie aus Amino-terminal biotinyliertem A $\beta$  eingesetzt. Dies diente dazu, potentielle A $\beta$ 1-42-Bindeepitope im monomeren Zustand, die möglicherweise an den beiden Termini lokalisiert sein könnten, nicht durch das jeweilige Biotin für die D-Peptide zu blockieren.

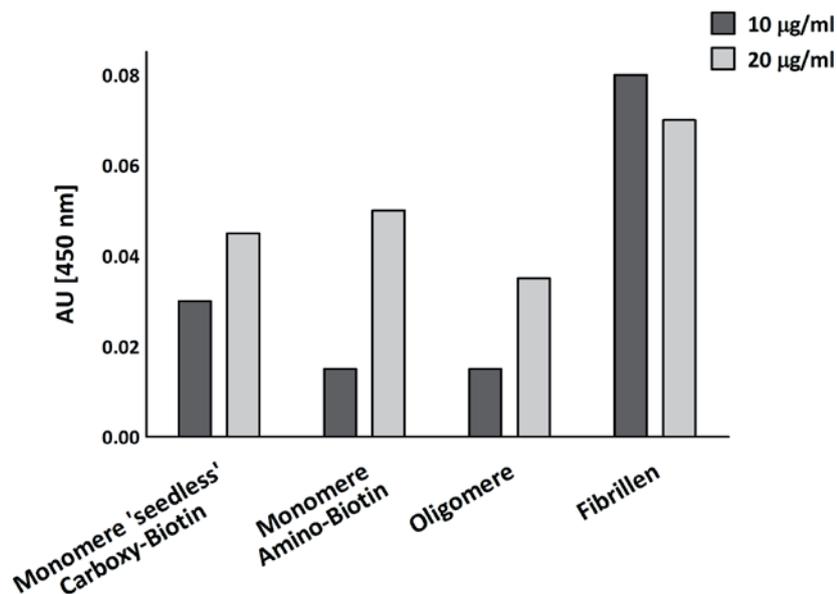
Abbildung 38 zeigt die ELISA-Auswertung zur Quantifizierung der Bindung von DO1-F an A $\beta$ 1-42-Monomere, -Oligomere und -Fibrillen.



**Abbildung 38: ELISA zur relativen Quantifizierung der Bindung von DO1-F an verschiedene A $\beta$ 1-42 Konformere.** *Seedless*-Monomere aus Carboxy-terminal biotinyliertem A $\beta$  und Monomere, Oligomere und Fibrillen aus Amino-terminal biotinyliertem A $\beta$  wurden zu je 5 µg/ml immobilisiert und das D-Peptid in einer Konzentration von 10 und 20 µg/ml appliziert. Dargestellt ist die relative Quantifizierung der Bindung der Peptide in einer zweifachen Bestimmung als Absorption (AU = *absorption unit*) bei 450 nm nach Abzug der Hintergrundabsorption.

Die niedrigen Absorptionswerte deuten auf eine relativ schwache Bindung von DO1-F im ELISA hin. Von allen Konformationen wurden einzig die Amino-terminal biotinylierten Monomere schwach gebunden. Diese Bindung war nicht konzentrationsabhängig, da die Absorption bei der geringeren DO1-F-Konzentration höher war. Die spezifische Affinität für die Monomere war daher nicht eindeutig nachweisbar. *Seedless*-Monomere aus Carboxy-terminal biotinyliertem A $\beta$ , Oligomere und Fibrillen wurden der ELISA-Analyse zufolge nicht gebunden.

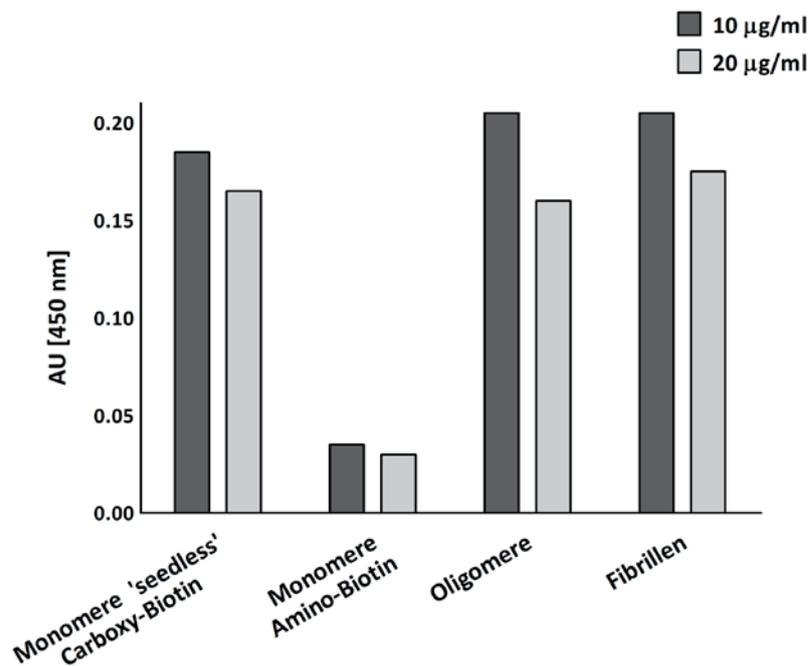
Die Ergebnisse zur Quantifizierung der Bindung vom Septamer DO2-F an A $\beta$ 1-42-Monomere, -Oligomere und -Fibrillen im ELISA sind in Abbildung 39 zusammengefasst.



**Abbildung 39: ELISA zur relativen Quantifizierung der Bindung von DO2-F an verschiedene A $\beta$ 1-42 Konformere.** *Seedless*-Monomere aus Carboxy-terminal biotinyliertem A $\beta$  und Monomere, Oligomere und Fibrillen aus Amino-terminal biotinyliertem A $\beta$  wurden zu je 5 µg/ml immobilisiert und das D-Peptid in einer Konzentration von 10 und 20 µg/ml appliziert. Dargestellt ist die relative Quantifizierung der Bindung der Peptide in einer zweifachen Bestimmung als Absorption (AU = *absorption unit*) bei 450 nm nach Abzug der Hintergrundabsorption.

DO2-F hat an alle Konformere von A $\beta$ 1-42 relativ schwach gebunden. Dabei war eine etwas höhere Affinität für die Fibrillen vorhanden, während die Bindung an die anderen Konformere schwächer war. Die Bindung an die einzelnen Konformere war konzentrationsabhängig, wobei das Bindungssignal der Peptide an die Fibrillen im ELISA gesättigt war. DO2-F wies sowohl für die *seedless*-Monomere aus Carboxy-terminal biotinyliertem A $\beta$  als auch für die Monomere aus der Gelfiltration aus Amino-terminal biotinyliertem A $\beta$  eine ähnliche Affinität auf.

In Abbildung 40 sind die Ergebnisse zu den ELISA-Bindungsstudien vom Dodekamer DO3-F an A $\beta$ 1-42-Monomere, -Oligomere und -Fibrillen zusammengefasst.



**Abbildung 40: ELISA zur relativen Quantifizierung der Bindung von DO3-F an verschiedene A $\beta$ 1-42 Konformere.** *Seedless*-Monomere aus Carboxy-terminal biotinyliertem A $\beta$  und Monomere, Oligomere und Fibrillen aus Amino-terminal biotinyliertem A $\beta$  wurden zu je 5  $\mu\text{g/ml}$  immobilisiert und das D-Peptid in einer Konzentration von 10 und 20  $\mu\text{g/ml}$  appliziert. Dargestellt ist die relative Quantifizierung der Bindung der Peptide in einer zweifachen Bestimmung als Absorption (AU = *absorption unit*) bei 450 nm nach Abzug der Hintergrundabsorption.

DO3-F hat die *seedless*-Monomere, Oligomere sowie Fibrillen mit einer relativ starken Affinität gebunden. Das Bindungssignal war im ELISA bei 10  $\mu\text{g/ml}$  bereits gesättigt. Im Gegensatz zu dem *seedless*-Monomer aus Carboxy-terminal biotinyliertem A $\beta$  wurden die Amino-terminal biotinylierten Monomere aus der Gelfiltration nicht von DO3-F gebunden, was auf eine mögliche Lokalisation des Epitops am Amino-Terminus von A $\beta$  deuten könnte.

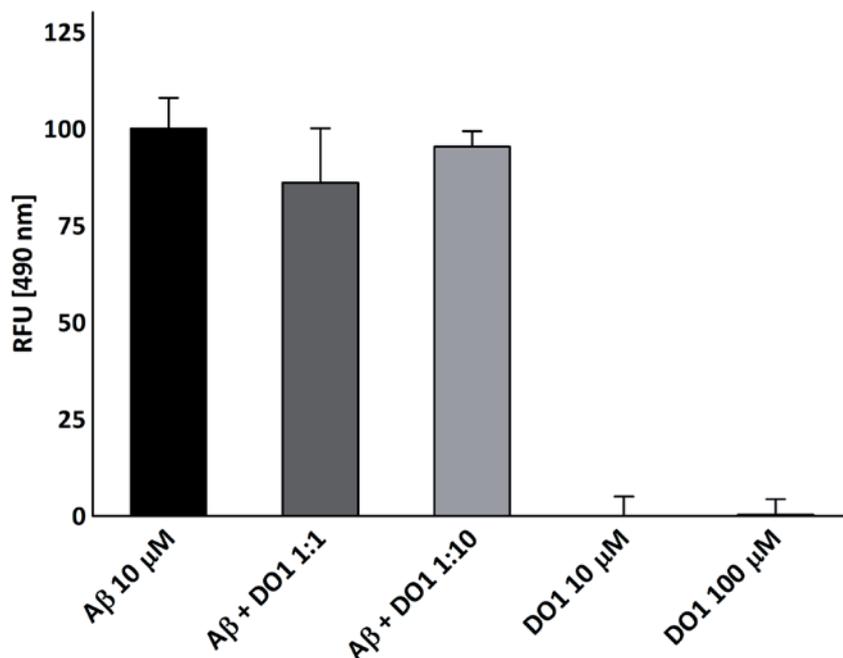
Es wurden die gleichen ELISA-Versuche mit dem Peptid D3 (RPRTLHTRNR) gemacht. Dieses Peptid zeigte eine relativ hohe Affinität für Oligomere und Fibrillen. Die entsprechende Abbildung befindet sich im Anhang (vgl. Abbildung 48).

#### 4.5.2.3 EINFLUSS DER D-PEPTIDE AUF DIE *IN VITRO*-FIBRILLATION VON A $\beta$ 1-42

Neben den *in vitro*-Bindungseigenschaften wurde auch der Einfluss der drei D-Peptide auf die Fibrillation von A $\beta$ 1-42 untersucht. A $\beta$  in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  wurde in unterschiedlichen Verhältnissen mit den beiden Septameren DO1 und DO2 sowie dem

Dodekamer DO3 für 15 Stunden bis zum Erreichen der Plateauphase der Fibrillation koinkubiert und die Proben mittels ThT-Fluoreszenz ausgewertet. Die Fluoreszenz des Farbstoffs korreliert mit dem relativen Fibrillengehalt in der gemessenen Probe. Die Fluoreszenzintensität der Kontrollinkubation von A $\beta$ 1-42 ohne D-Peptid wurde als 100 % gesetzt. Die übrigen Fluoreszenzwerte der koinkubierten Proben wurden als prozentualer Anteil von dieser A $\beta$ -Kontrollinkubation ermittelt.

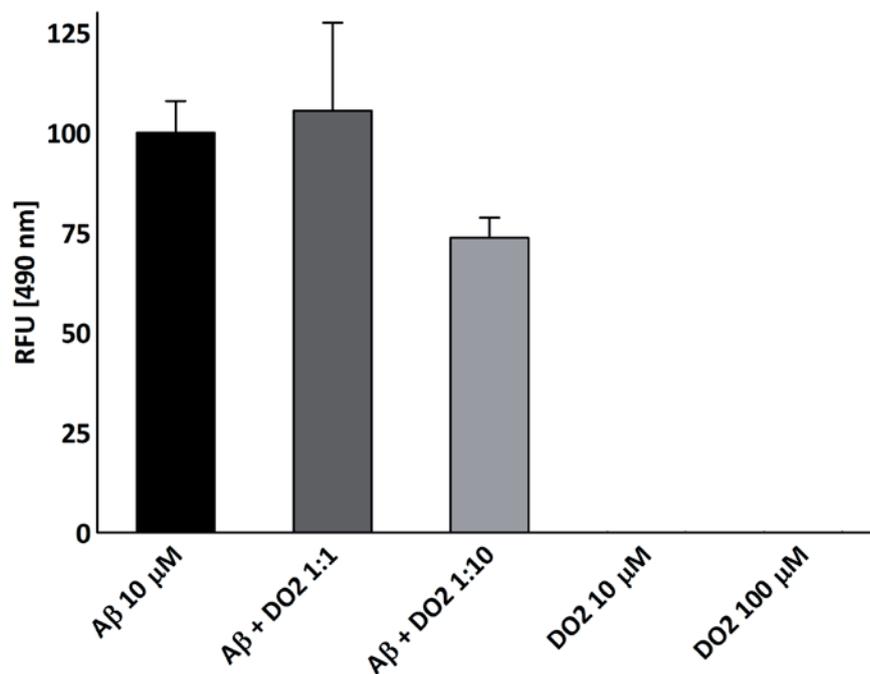
Die entsprechende Auswertung zu DO1 ist in Abbildung 41 zusammengefasst.



**Abbildung 41: ThT-Aggregationstest von A $\beta$ 1-42 zur Quantifizierung des relativen Fibrillengehalts in Gegenwart von DO1.** Die Konzentration von A $\beta$  betrug 10  $\mu$ M, DO1 wurde im Verhältnis von 1:1 und 1:10 (A $\beta$ :DO1) zugegeben sowie einzeln in einer 10 und 100  $\mu$ M Konzentration gemessen. Für jede Probe wurden vierfach Bestimmungen durchgeführt und nach 15 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Mittelwert der relativen ThT-Fluoreszenz (RFU = *relative fluorescence unit*) bei  $\lambda_{\text{ex}} = 440$  nm und  $\lambda_{\text{em}} = 490$  nm ermittelt. Die Fluoreszenz von 10  $\mu$ M A $\beta$  wurde als 100 % gesetzt und die Werte und Standardabweichungen der übrigen Inkubationen sind als prozentuale Anteile dieses Maximalwerts angegeben.

In der Inkubation von DO1 alleine waren in beiden Konzentrationen keine Fluoreszenz und damit Fibrillenbildung zu detektieren. Die Fluoreszenzintensität in den koinkubierten Proben von DO1 und A $\beta$  entsprach in beiden Verhältnissen der der A $\beta$ -Kontrolle. Demnach wurde die A $\beta$ -Fibrillation nicht durch DO1 modifiziert.

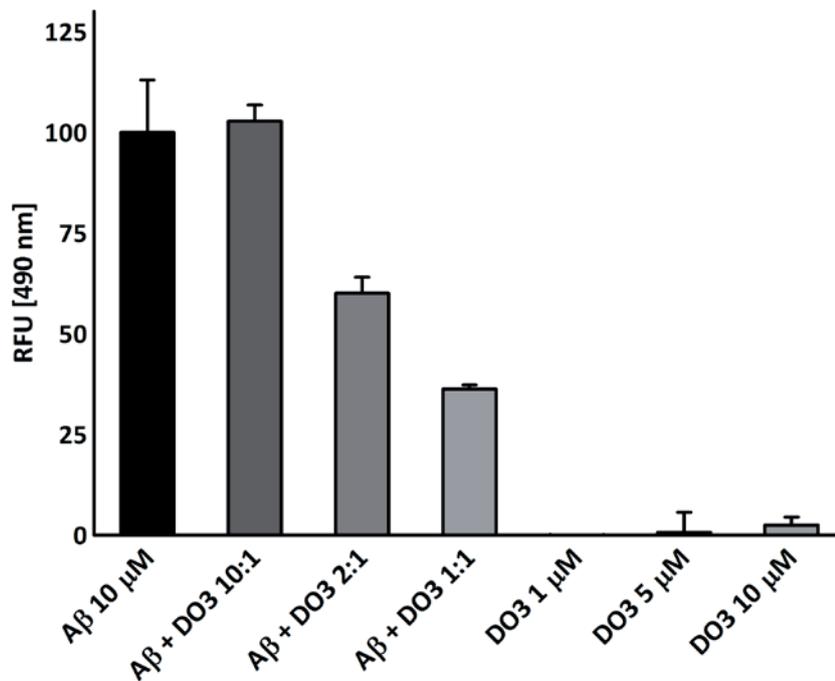
Die Auswertung der ThT-Fluoreszenzintensität nach Zugabe von DO2 ist in Abbildung 42 zusammengefasst. Auch hier wurden die prozentualen Fluoreszenzintensitäten der koinkubierten Proben von A $\beta$  und DO2 abhängig von der A $\beta$ -Kontrollinkubation ermittelt.



**Abbildung 42: ThT-Aggregationstest von A $\beta$ 1-42 zur Quantifizierung des relativen Fibrillengehalts in Gegenwart von DO2.** Die Konzentration von A $\beta$  betrug 10  $\mu$ M, DO2 wurde im Verhältnis von 1:1 und 1:10 (A $\beta$ :DO2) zugegeben sowie einzeln in einer 10 und 100  $\mu$ M Konzentration gemessen. Für jede Probe wurden vierfach Bestimmungen durchgeführt und nach 15 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Mittelwert der relativen ThT-Fluoreszenz (RFU = *relative fluorescence unit*) bei  $\lambda_{\text{ex}} = 440$  nm und  $\lambda_{\text{em}} = 490$  nm ermittelt. Die Fluoreszenz von 10  $\mu$ M A $\beta$  wurde als 100 % gesetzt und die Werte und Standardabweichungen der übrigen Inkubationen sind als prozentuale Anteile dieses Maximalwerts angegeben.

Es wurden die Verhältnisse 1:1 sowie 1:10 (A $\beta$ :DO2) untersucht. Ein 1:1 Verhältnis zwischen A $\beta$  und DO2 hatte keinen Effekt auf die Fibrillation. Bei einer Koinkubation von A $\beta$  mit einem zehnfachen Überschuss von DO2 erfolgte eine Reduktion des Fibrillengehalts gemäß der ThT-Fluoreszenzintensität um etwa 25 %. Die beiden Kontrollen mit den unterschiedlich konzentrierten DO2-Proben zeigten keine Fluoreszenz in den Proben, somit fibrillierte das Peptid allein nicht bei diesen Konzentrationen.

Für das Dodekamer DO3 wurden dieselben Messungen durchgeführt. Es wurden die molaren Verhältnisse 10:1, 2:1 und 1:1 (A $\beta$ :DO3) analysiert. Die zugehörige Auswertung ist in Abbildung 43 gezeigt.

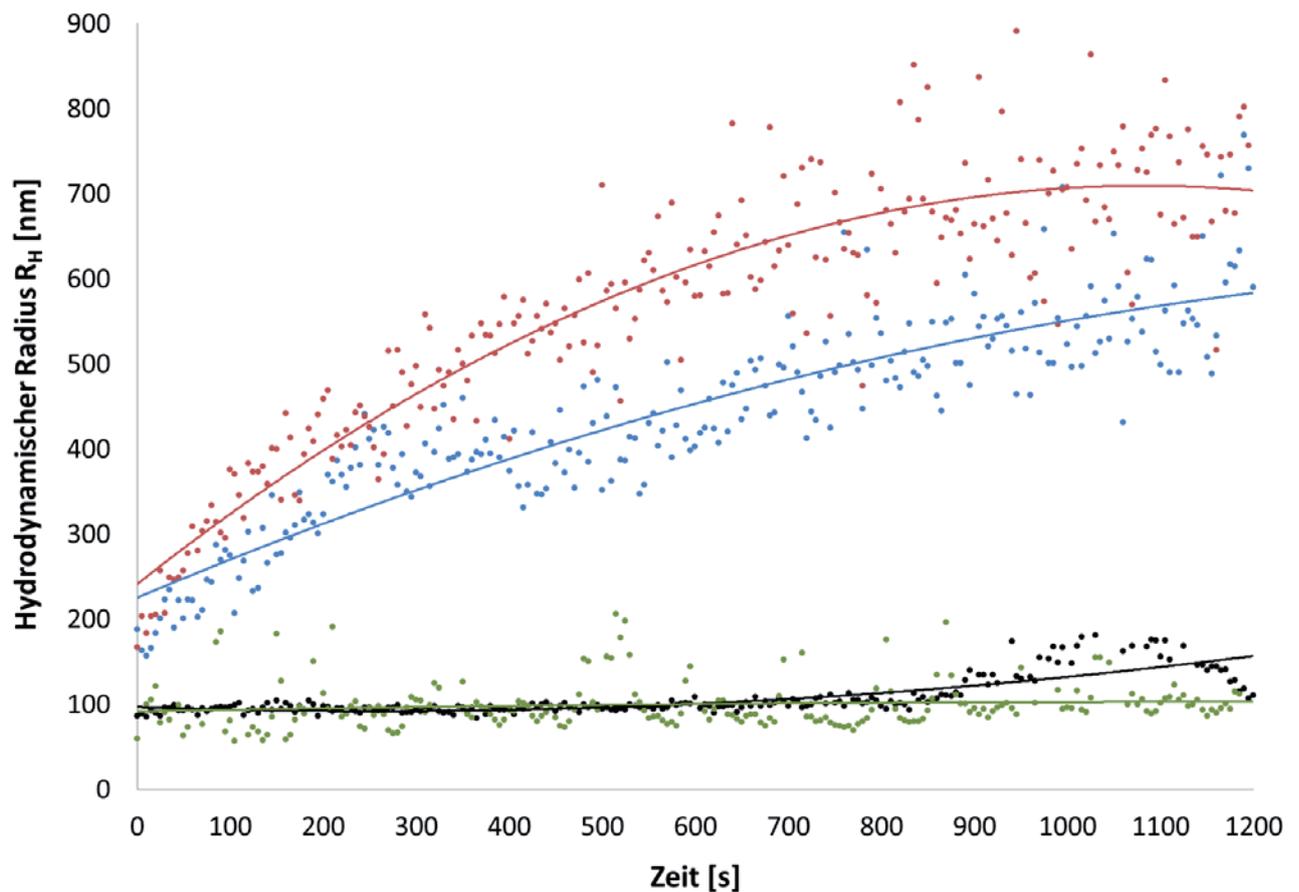


**Abbildung 43: ThT-Aggregationstest von Aβ1-42 zur Quantifizierung des relativen Fibrillengehalts in Gegenwart von DO3.** Die Konzentration von Aβ betrug 10 μM, DO3 wurde im Verhältnis von 10:1, 2:1 und 1:1 (Aβ:DO3) sowie einzeln in einer 1, 5 und 10 μM Konzentration gemessen. Für jede Probe wurden vierfach Bestimmungen durchgeführt und nach 15 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Mittelwert der relativen ThT-Fluoreszenz (RFU = *relative fluorescence unit*) bei  $\lambda_{\text{ex}} = 440 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{em}} = 490 \text{ nm}$  ermittelt. Die Fluoreszenz von 10 μM Aβ wurde als 100 % gesetzt und die Werte und Standardabweichungen der übrigen Inkubationen sind als prozentuale Anteile dieses Maximalwerts angegeben.

Die ThT-Fluoreszenzintensität in der Probe von DO3 mit einem zehnfachen Überschuss des Aβ-Peptids zeigte keinen Unterschied zur Aβ-Kontrolle auf. Die Erhöhung der DO3-Konzentration führte aber zu einer deutlichen konzentrationsabhängigen Verringerung der Fluoreszenzintensität und somit des relativen Fibrillengehalts. Ein 2:1 Verhältnis zwischen Aβ1-42 und DO3 bewirkte bereits eine Reduktion des relativen Fibrillengehalts um fast 50 %. Ein äquimolares Verhältnis zeigte eine um 70 % reduzierte Fluoreszenzintensität. Die entsprechenden DO3-Kontrollen ohne Aβ zeigten bei den gleichen Konzentrationen keine signifikante Fluoreszenzintensität bzw. Fibrillation.

#### 4.5.2.4 EINFLUSS VON DO3 AUF DIE PARTIKELGRÖÖE VON Aβ1-42

ThT-Studien dienen zum Nachweis von ThT-positiven β-Faltblatt-reichen Fibrillen. Zur Detektion von Partikeln unabhängig von deren Sekundärstruktur wurden Messungen mit dynamischer Lichtstreuung durchgeführt, um den Effekt von DO3 auf die Aggregatbildung im Allgemeinen zu testen. Hierfür wurde jeweils 5 μM Aβ1-42 alleine und in Gegenwart von DO3 wieder im Verhältnis von 10:1, 2:1 und 1:1 (Aβ:DO3) untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 44 zusammengefasst.



**Abbildung 44: Messung der dynamischen Lichtstreuung von A $\beta$ 1-42 in Gegenwart von DO3.** Dargestellt ist der hydrodynamische Radius der Partikel in Abhängigkeit von der Zeit. Gemessen wurden 5  $\mu$ M A $\beta$ 1-42 in Natriumphosphatpuffer bei pH 7,4 zusammen mit 0 (schwarz), 0,5 (grün), 2,5 (blau) und 5  $\mu$ M DO3 über einen Zeitraum von 20 Minuten bei Raumtemperatur. Die Datenakquisition erfolgte alle 5 Sekunden.

In Gegenwart von DO3 fand eine konzentrationsabhängige Steigerung der A $\beta$ -Partikelbildung statt. Die Koinkubation mit 0,5  $\mu$ M DO3 beeinflusste die A $\beta$ -Aggregation nicht, wie der Vergleich mit der A $\beta$ -Kontrolle zeigt. In beiden Fällen lagen zum Ende der Messung etwa 100 nm große Partikel vor. Hingegen führte die Zugabe von höheren DO3-Konzentrationen zu einer deutlichen Steigerung der Durchmesser auf etwa 500 bis 600 nm bei 2,5  $\mu$ M DO3 sowie 700 bis 800 nm bei 5  $\mu$ M DO3. Das Erstere entspricht einem 2:1 und das Letztere einem 1:1 Verhältnis zwischen A $\beta$ 1-42 und DO3. Die Auswertung der Intensitäten der Partikel in Abhängigkeit des hydrodynamischen Radius lassen Intensität von 30 bis 50 % in den unterschiedlichen Partikelpopulationen erkennen (vgl. Anhang, Abbildung 49).

Die entsprechenden DO3-Kontrollen haben bei keiner Konzentration eine signifikante Aggregatbildung des D-Peptids alleine erkennen lassen (Daten nicht gezeigt).

## 5 DISKUSSION

Die Alzheimersche Demenz ist die weltweit häufigste neurodegenerative Erkrankung und hat unter anderem die Akkumulation von toxischen A $\beta$ -Oligomeren zur Ursache. Das Absterben von neuronaler Zellen ist die direkte Folge dieser Krankheit. Die genauen molekularen Ursachen der AD sind nicht bekannt, eine gesicherte Diagnose ist erst nach dem Ableben der Demenzpatienten möglich. Die ungeklärten neurobiologischen Vorgänge erschweren die zuverlässige Diagnose und kausale Therapie der Patienten.

Das körpereigene Immunsystem tritt in der Grundlagenforschung immer mehr in den Vordergrund. Mittlerweile sind immunologische Defizite in Demenzpatienten bekannt, die sich unter anderem anhand eines reduzierten anti-A $\beta$ -Antikörpertiters im CSF und Plasma nachweisen lassen.

Neuartige, gegen A $\beta$  gerichtete Peptidliganden und Immuntherapien stellen innovative Methoden zur ursachenbezogenen Behandlung dar. Eine elegante Methode zur Identifikation von diagnostischen oder therapeutischen Peptiden ist das Spiegelbild-Phagendisplay, welches die schnelle und effiziente Identifikation spezifischer Peptidliganden aus D-enantiomeren Aminosäuren ermöglicht. Diese D-Peptide sind pharmakologisch besonders vorteilhaft für die *in vivo*-Anwendung, da sie aufgrund ihrer nicht-physiologischen D-enantiomeren Aminosäurekonformation meist weniger immunogen sind und eine höhere Proteolyse-Resistenz vorweisen als natürlich vorkommende Peptide mit L-enantiomeren Aminosäuren.

Die aktive Immuntherapie mit A $\beta$  und A $\beta$ -artigen Peptiden erzielte äußerst erfolgreiche Ergebnisse in transgenen Tiermodellen der AD. Wirkstoffe, die im Menschen eingesetzt werden sollen, müssen bereits bei niedrigen Konzentrationen eine immunisierende Reaktion hervorrufen, ohne dass starke, abwehrbedingte Entzündungsreaktionen auftreten. Die von der Firma AFFIRIS AG etablierte Affitom-Technologie ermöglicht die Entwicklung von Peptiden, die genau diese Eigenschaften vereinen.

## 5.1 VERGLEICH DER AGGREGATION VERSCHIEDENER A $\beta$ -ISOFORMEN

Die Messung der dynamischen Lichtstreuung ermöglicht eine schnelle und direkte Messung der Partikelgröße verschiedener Moleküle, ohne dass eine Markierung dieser nötig ist. Somit sind Aggregationsstudien von amyloiden Proteinen möglich, ohne diese etwa mit Fluoreszenzmarkern zu versehen oder interagieren zu lassen und dadurch möglicherweise die Aggregation zu beeinflussen.

Die Messung der Lichtstreuung wurde an den vier Isoformen A $\beta$ 1-40, A $\beta$ 1-42, A $\beta$ 3-40 und A $\beta$ pE3-40 bei einer Konzentration von 5  $\mu$ M über einen Zeitraum von 24 Stunden bei Raumtemperatur vorgenommen. Hierfür wurde die Aggregation in Aggregationskeim-freien A $\beta$ -Präparationen mittels pH-Verschiebung initiiert. Nach 0, 6 und 24 Stunden Inkubationszeit wurden Messungen durchgeführt, um die Größe und Heterogenität der Partikelpopulationen zu bestimmen (vgl. 4.1, Abbildung 10). Bei der dynamischen Lichtstreuung wird der Durchmesser anhand des hydrodynamischen Radius ermittelt, das heißt sowohl der eigentliche Partikelradius als auch die Hydrathülle fließen mit in die Auswertung ein. Die Polydispersität wird durch den Umfang der Integralfläche repräsentiert und ist ein Maß für die Heterogenität der Partikelgröße in einer Population.

Sämtliche Isoformen hatten nach der Initiierung der Aggregation eine relativ homogene Partikelform mit einem hydrodynamischen Radius von 20 nm aufzuweisen. Die Pyroglutamat-form A $\beta$ pE3-40 war zu diesem Zeitpunkt bereits bimodal und bildete zusätzlich größere Aggregate mit einem Radius von etwa 90 nm.

Nach 24 Stunden war eine hohe Heterogenität in sämtliche Proben vorhanden. A $\beta$ pE3-40 hat die größten Fragmente mit einem Radius von bis zu 3000 nm vorzuweisen.

Die beobachtete Partikelbildung von A $\beta$ 1-40 in der Lichtstreuung deckte sich größtenteils mit der aus anderen Publikationen. Carrotta *et al.* zeigten für 185  $\mu$ M A $\beta$ 1-40, ebenfalls nach einer Aggregationskeim-freien Präparation, eine Partikeldistribution, die nach 4 Stunden der hier präsentierten Messung mit einem hydrodynamischen Radius von 20 nm entsprach (Carrotta *et al.*, 2007). Auch in anderen Veröffentlichungen wurden ähnliche Radii angegeben (Kim und Murphy, 2004; Liu und Murphy, 2006). Murphy und Pallitto konnten nach acht Stunden, wie in der hier gezeigten Messung nach sechs Stunden, Aggregate mit etwa 40 nm in einer 140  $\mu$ M A $\beta$ 1-40-Probe detektieren (Murphy und Pallitto, 2000). Interessanterweise scheint die anfängliche Aggregation von A $\beta$ 1-40 unabhängig von der A $\beta$ -Konzentration zu erfolgen, da unterschiedliche Molaritäten des Peptids zu Beginn keine nennenswerten Unterschiede im Durchmesser bewirken.

Nach 24 Stunden lagen in der hier durchgeführten Messung Partikel mit einem Radius von 60 nm vor. Chen *et al.* zeigten nach demselben Zeitraum etwas größere Aggregate mit etwa 80 nm (Chen und Glabe, 2006), allerdings bei einer höheren Konzentration von 220  $\mu$ M.

Pai *et al.* führten eine Messung in einer 12,5  $\mu$ M A $\beta$ 1-42-Probe in HEPES-Puffer durch, die nach 2 Stunden Schüttelinkubation bereits eine bimodale Partikeldistribution mit einem Radius

von 30 bis 40 nm sowie etwa 130 nm entwickelte (Pai *et al.*, 2006). Nach 6 Stunden wurde in dem hier vorgestellten Versuch ebenfalls eine bimodale Verteilung detektiert, allerdings mit kleineren Radii (10 und 50 nm); in diesem Fall scheint die A $\beta$ -Konzentration, die Schüttelinkubation bzw. der Inkubationspuffer einen Einfluss auf den Aggregationsverlauf zu haben. Im Vergleich dazu zeigen Funke *et al.* für eine 5  $\mu$ M A $\beta$ -Probe – ebenfalls Aggregationskeim-frei in Natriumphosphatpuffer präpariert – den gleichen Partikelradius von etwa 20 nm wie in der hier gezeigten Messung (Funke *et al.*, 2010).

Für die Amino-terminal verkürzte Form A $\beta$ 3-40 sowie die Pyroglutamatform A $\beta$ pE3-40 sind außer der hier publizierten Resultate (Schlenzig *et al.*, 2009) keine weiteren Daten zur Messung der dynamischen Lichtstreuung bekannt. In den hier gezeigten Versuchen wies das A $\beta$ 3-40-Peptid nach 24 Stunden mit einem Radius von etwa 70 bis 80 nm die größten nicht-pyroglutamatisierten Aggregate im Vergleich zu den beiden Vollängen-Peptiden A $\beta$ 1-40/42 auf. Die Pyroglutamatform bildete nach 24 Stunden ebenfalls Partikel mit einem Radius von 70 bis 80 nm, deren Durchmesser jedoch anhand der Integralfläche sehr viel polydisperser und damit heterogener waren als die der Aggregate in den übrigen Isoformen. Zusätzlich waren Aggregate mit einem Radius von etwa 3000 nm zu detektieren, die ebenfalls heterogen waren.

Insgesamt bestätigen diese Ergebnisse die These, dass A $\beta$ 1-42 deutlich schneller aggregiert als A $\beta$ 1-40 (Thuncke *et al.*, 1998). Amino-terminal verkürzte Isoformen im Allgemeinen (McColl *et al.*, 2009) sowie die Pyroglutamatform im Speziellen (Harigaya *et al.*, 2000; Schilling *et al.*, 2006) aggregieren im ThT-Aggregationstest schneller als A $\beta$ 1-42, was durch die hier gezeigte Messung der Lichtstreuung belegt werden konnte. Diese erhöhte Aggregationsanfälligkeit ist möglicherweise unter anderem auf eine Erhöhung der Hydrophobizität durch das zyklische Pyroglutamat und die dadurch verringerte Zahl von Ladungen (Kuo *et al.*, 1997) sowie auf eine veränderte pH-abhängige Löslichkeit zurückzuführen (Schlenzig *et al.*, 2009).

Allerdings ist bei der dynamischen Lichtstreuung zu beachten, dass im Fall von A $\beta$ -Peptiden die Datenanalyse nur dann optimal ist, wenn der Radius der Aggregate nicht 100 bis 150 nm überschreitet. Über diesen Wert hinaus ist die strukturelle Information eher qualitativen Werts und dient zur ungefähren Größenverhältnisbestimmung zwischen verschiedenen Proben und gibt keine maßgetreuen Angaben über die tatsächliche Größe der Aggregate wieder (Lomakin *et al.*, 1999). Dementsprechend sollten insbesondere die Durchmesser der detektierten A $\beta$ pE3-40-Aggregate nach 24 Stunden eher als Richtwert und nicht als absolute Größe interpretiert werden.

## 5.2 ETABLIERUNG EINER PRÄPARATION VON A $\beta$ -MONOMEREN, -OLIGOMEREN UND -FIBRILLEN FÜR *IN VITRO*-STUDIEN

Die verlässliche und reproduzierbare Präparation von Monomeren, Oligomeren und Fibrillen ist äußerst wichtig für die Planung von Versuchen und die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen. *In vitro*-Protokolle für die Präparation von Monomeren und Oligomeren mittels verschiedener Puffer, pH-Werte, Inkubationszeiten und -temperaturen sowie A $\beta$ -Konzentrationen sind zwar bekannt (Dahlgren *et al.*, 2002; Stine *et al.*, 2011), allerdings umstritten, da sie nicht immer zuverlässig und reproduzierbar sind. Das Ziel der hier aufgeführten Versuche war deshalb die Etablierung einer schnellen und verlässlichen Präparationsmethode von unterschiedlichen A $\beta$ -Konformeren. Dies ist wichtig für biophysikalische und biochemische *in vitro*-Experimente mit A $\beta$ , da das Peptid aufgrund seiner hohen Aggregationsanfälligkeit sehr unbeständig ist. Eine zuverlässige Präparationsmethode für Oligomere und Monomere bietet die Gelfiltration, bei der einzelne Formen anhand des Molekulargewichts voneinander getrennt werden (Jan *et al.*, 2010). Die Peptide wurden in dem hier vorgestellten Gelfiltrationsprotokoll jedes Mal identisch vorbehandelt und nach der molekularen Masse aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Konzentrationsbestimmung der Monomere, Oligomere und der separat präparierten Fibrillen. Eine vorherige Harnstoffbehandlung diente dazu, die Aggregate in Monomere zu überführen, um so die Konzentration der unterschiedlichen Konformere, basierend auf der Monomereinheit, unter reproduzierbaren Bedingungen durchzuführen. Harnstoff diente dabei als denaturierendes Agens. Diese Präparationsmethode ergibt ausreichende Mengen an verschiedenen Konformeren, die in biotinylierter Form vor allem in Festphasen-Assays basierend auf der Streptavidin-Biotin-Immobilisierung eingesetzt werden können.

Die Gelfiltrationschromatographie von A $\beta$  resultierte in zwei deutlichen Absorptionsmaxima im Chromatogramm (vgl. 4.2.1, Abbildung 11). Die Masse von A $\beta$  in diesen Fraktionen entsprach, falls man die Elutionszeiten mit denen der Kalibrationsproteine vergleicht, einem Molekulargewicht von  $\geq 100$  kDa sowie etwa 10 kDa. Die Monomere befanden sich in der zweiten eluierten Fraktion und haben ein apparentes Molekulargewicht von 10 kDa aufgewiesen. Die Diskrepanz zu dem tatsächlichen Molekulargewicht von 4,5 kDa ist damit zu erklären, dass das nicht-globuläre Peptid einen größeren hydrodynamischen Radius besitzt und demnach schneller durch das Säulenmaterial läuft als die zur Kalibrierung eingesetzten globulären Proteine. In anderen Literaturreferenzen wurde gezeigt, dass es sich bei den Monomeren in dieser Fraktion tatsächlich um 4,5 kDa schwere Moleküle handelte, und dass die Oligomere als heterogene Gruppe unterschiedlicher Größen vorlagen (Hepler *et al.*, 2006).

Die ThT-Analyse ermöglicht durch die Detektion der Fluoreszenz des Fibrillen-bindenden ThTs die relative Quantifizierung des Fibrillengehalts in den Proben. Der ThT-Test zeigte, dass die Monomerprobe keine ThT-positiven fibrillären Formen enthielt. Im Verhältnis dazu zeigte die

Fibrillenprobe eine starke Fluoreszenzintensität, was einem hohen Fibrillengehalt gleichzusetzen ist.

In der Oligomerprobe war ebenfalls ThT-Fluoreszenzintensität detektierbar (vgl.4.2.2, Abbildung 12), die allerdings deutlich unter den Werten für die der Fibrillen lag. Das auf die Säule applizierte Material wurde ohne Aggregationskeime präpariert und mögliche unlösliche, fibrilläre Aggregate waren aufgrund der vorherigen Zentrifugation nicht in der Probe vorhanden. Das Fluoreszenzsignal ist deshalb vermutlich auf lösliche Protofibrillen zurückzuführen, die bei der Präparation von synthetischen Oligomeren auftreten. Von diesen protofibrillären Strukturen ist bekannt, dass sie ebenfalls von ThT gebunden werden (Pires *et al.*, 2011). Für das protofibrilläre A $\beta$ -Peptid wird das damit erklärt, dass Protofibrillen ebenfalls  $\beta$ -Faltblatt als Sekundärstruktur vorweisen können (Walsh *et al.*, 1999).

Die Dot-Blot-Studien mit dem nicht-konformerspezifischen anti-A $\beta$ -Antikörper NAB 228 bestätigten, dass in sämtlichen Proben A $\beta$  vorhanden war. Der Antikörper A11 ist spezifisch für Oligomere und erkennt ein konformerspezifisches Epitop, das im Peptidstrang lokalisiert ist (Kayed *et al.*, 2003). Die Detektion mit A11 zeigte, dass ausschließlich die Oligomerfraktion aus der Gelfiltration diese oligomere Strukturen vorzuweisen hatte (vgl.4.2.3, Abbildung 13).

Die Western-Blot-Detektion zeigte zudem, dass die Oligomere hauptsächlich in Dimere, Trimere, und Tetramere (ca. 8 kDa, 14 kDa bzw. 17 kDa ) aufgetrennt wurden, die mit dem oligomerspezifischen A11-Antikörper nachgewiesen wurden. Außerdem sind noch schlierenartige immunpositive Banden zu sehen gewesen, die mit etwa 35 kDa eventuell als Oktamere gedeutet werden können (vgl. 4.2.3, Abbildung 14). Diese Bandensignale für oligomere Präparationen sind typisch für A $\beta$  und wurden bereits häufig beschrieben (Dahlgren *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2006). Während die Oligomerpräparation nach einem bestimmten Protokoll anhand A $\beta$ -Konzentration, Inkubationszeit, -puffer, und -dauer stets zur Rückbildung in Monomere in der Proteingelektrophorese führte (Stine *et al.*, 2003), ist dies in der hier etablierten Gelfiltrationspräparation nicht der Fall gewesen. Die Gegenwart von kleineren Oligomeren statt der niedermolekularen Aggregate aus der Gelfiltration ist vermutlich unter anderem auf die Anwesenheit von SDS im Lauf- und Auftragspuffer während der Gelelektrophorese zurückzuführen.

Die Monomerprobe wies eine deutliche Bande bei etwa 5 kDa auf, welches der physiologischen Masse von A $\beta$  entspricht. Die Immundetektion mit A11 zeigte, dass keine Oligomere präsent waren (Abbildung 14).

Die Western-Blot-Analyse der Fibrillenprobe bestätigte, dass keine Oligomere und Monomere mit dem A $\beta$ -spezifischen Antikörper detektiert werden konnten (Abbildung 14). Da die vorherige Dot-Blot-Detektion bestätigt hat, dass A $\beta$  in der Fibrillenprobe vorhanden war, bedeutet das, dass hochmolekulare fibrilläre Aggregate vermutlich nicht in das Trenngel eingewandert sind.

Die Detektion der Monomer-, Oligomer- sowie Fibrillenproben im ELISA zeigte, dass die Immobilisierung von 5  $\mu$ g/ml A $\beta$  die Detektion der Monomere, Oligomere und Fibrillen ermöglicht (vgl. 4.2.4, Abbildung 15).

### 5.3 A $\beta$ -ANTIKÖRPERAKTIVITÄT IN SEREN VON DEMENZPATIENTEN

Die Antikörperaktivität in Seren beeinflusst möglicherweise die Pathologie der AD. Körper eigene, A $\beta$ -bindende Antikörper haben wichtige Funktionen, wie z. B. die Hemmung der A $\beta$ -Aggregation, die Disassemblierung vorgeformter Fibrillen, sowie die Inhibition der A $\beta$ -induzierten Zytotoxizität (Paul *et al.*, 2010). Eine Veränderung dieser körpereigenen Antikörperfunktion könnte somit möglicherweise zur Pathogenese beitragen. In den hier vorgestellten ELISA-Experimenten wurden die freien Antikörper in Seren von Patientengruppen verschiedener Demenzformen auf ihre Bindung an verschiedene A $\beta$ -Konformere hin quantifiziert. Dabei wurde gezeigt, dass zwischen gesunden Kontrollpersonen und MCI-Patienten unterschiedlicher Ausprägung zum Teil signifikante Unterschiede im Titer der ungebundenen, A $\beta$ -bindenden Antikörper vorlagen (vgl. 4.3). Die folgenden Messungen wurden an je 5 Patienten pro Gruppe durchgeführt. Die Ergebnisse und daraus folgende mögliche Schlussfolgerungen werden daher im Kontext dieser Probandengruppe diskutiert. Ein definitives Fazit für die allgemeinen Bedingungen in den Demenzkrankheiten ist daher nicht beabsichtigt.

In gesunden Patienten wurde ein höherer Titer Monomer-bindender Antikörper gemessen als in MCI-Patienten (Abbildung 16). In diesen Demenzpatienten liegt demnach anscheinend eine veränderte Antikörperaktivität und damit womöglich einhergehende Suszeptibilität für A $\beta$  vor.

In den MCI-Patienten lagen im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen auch signifikant reduzierte Antikörpertiter gegen Oligomere vor. Insbesondere zwischen den Kontrollen und den progressiven MCI-Patienten war der statistische Unterschied hochsignifikant (Abbildung 17).

Zwischen allen Patientengruppen konnten untereinander keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Menge der Fibrillen-bindenden Antikörper gemessen werden (Abbildung 18).

Zusammenfassend zeigte die Auswertung der Antikörperquantifizierung in MCI-Patienten im Vergleich zu den Kontrollpersonen gewisse Tendenzen in der Monomer- und Oligomerbindung, die darauf hindeuten, dass in MCI-Patienten ein reduzierter Antikörpertiter gegenüber diesen Konformeren vorliegt. Eine verlässliche statistische Auswertung sowie Validierung der gemessenen Unterschiede für die Allgemeinheit ist allerdings aufgrund der geringen Probandenzahl derzeit nicht möglich. Demzufolge muss selbstverständlich die Zahl der untersuchten Patienten erhöht werden. Dies würde die statistischen Auswertungen aussagekräftiger machen.

Die Dissoziation der gebundenen, A $\beta$ -spezifischen Antikörper von natürlichen, im humanen Plasma vorkommenden Liganden ermöglicht die Messung aller im Plasma vorkommenden A $\beta$ -bindenden Antikörper über die freien Antikörper hinaus. Das A $\beta$ -Peptid selbst z. B. ist in einer Konzentration von 10 bis 100 pM im humanen Blut vorhanden und könnte in Assoziation mit den Antikörpern die Bindung an das synthetische, immobilisierte A $\beta$ -Peptid kompetitiv hemmen (Szabo *et al.*, 2008).

Du *et al.* haben ebenfalls gezeigt, dass in Demenzpatienten der A $\beta$ -spezifische Antikörpertiter im Vergleich zu dem in Kontrollgruppen reduziert war (Du *et al.*, 2001). Während dies bzgl. der

Zerebrospinalflüssigkeit gezeigt wurde, wurde in den hier vorgestellten Versuchen das gleiche für humanes Plasma bestätigt. Dasselbe konnten auch Weksler *et al.* zeigen, wobei hier zusätzlich nachgewiesen wurde, dass die reduzierten Antikörper zu der IgG-Gruppe gehören (Weksler *et al.*, 2002).

Die hier erbrachten Ergebnisse zeigen zudem, wie differenziert und konformerspezifisch das Antikörperdefizit in Demenzpatienten sein kann, da anscheinend insbesondere Antikörper gegen die Oligomere signifikant reduziert zu sein scheinen. Moir *et al.* konnten ebenfalls zeigen, dass in Demenzpatienten der oligomerspezifische anti-A $\beta$ -Antikörpertiter im Vergleich zu gesunden Kontrollen reduziert war (Moir *et al.*, 2005). Der besondere Fokus auf Oligomere mit konformerspezifischen Antikörpern ist somit ein aussichtsreicher Therapieansatz, der z. B. in den Versuchen von Hillen *et al.* bereits erfolgreich getestet wurde. Demnach hat die Behandlung von transgenen Mäusen mit dem oligomerspezifischer Antikörper A-887755 die kognitiven und synaptischen Funktionen *in vivo* verbessern können (Hillen *et al.*, 2010).

## 5.4 AKTIVE IMMUNTHERAPIE DER ALZHEIMERSCHEN DEMENZ MIT AFFITOPEN IN TRANSGENEN MÄUSEN

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die immunisierenden Effekte zweier Peptide untersucht, die zur aktiven Immuntherapie in transgenen Mäusen eingesetzt wurden. Diese Hexamere werden als sogenannte Affitope bezeichnet. Affitope ahmen die funktionelle Struktur von A $\beta$  nach und Affitop-induzierte Antikörper erkennen ausschließlich ein bei der Abspaltung von APP entstandenes Epitop von A $\beta$ . Die Immunantwort richtet sich demnach nicht gegen das APP und andere körpereigene Proteine. Affitope lösen deshalb keine vergleichbaren Immunreaktionen aus wie bei der Immuntherapie mit dem A $\beta$ -Peptid selbst (Orgogozo *et al.*, 2003; Gilman *et al.*, 2005). Zuvor haben Schneeberger *et al.* gezeigt, dass die Anwendung dieser Affitope in transgenen Mäusen die Symptome der AD-ähnlichen Pathologie mildern. In diesen Tieren wurde eine Reduktion der Plaquebelastung, ein Abschwächen der Entzündungserscheinungen sowie eine Verbesserung der kognitiven Funktionen beobachtet (Schneeberger *et al.*, 2010). ELISA-Bindungsstudien können Aufschluss darüber geben, inwiefern die aktive Immuntherapie die anti-A $\beta$ -Antikörperaktivität modifiziert und dadurch zum Rückgang der pathologischen Symptome beigetragen haben könnte. Hierfür wurden die freien Antikörper in Seren der transgenen Tiere nach Abschluss der Immunbehandlung bzgl. ihrer Bindung an verschiedene A $\beta$ -Konformere im ELISA quantifiziert. Es wurden drei verschiedene Behandlungsgruppen untersucht, in denen zum einen keine Immunisierung erfolgte sowie jeweils das Affitop AD03 bzw. AD02 eingesetzt wurden (vgl. 4.4).

Generell hat in nicht-immunisierten transgenen Mäusen ein niedriger A $\beta$ -spezifischer Antikörpertiter vorgelegen, wobei eine etwas höhere Affinität für die Fibrillen im Vergleich zu den Monomeren und Oligomeren detektiert wurde (Abbildung 20). Die ähnlichen relativen Mengen und Verhältnisse zwischen den Monomer-, Oligomer- und Fibrillen-bindenden Antikörpertitern wurden auch in AD-Patienten nachgewiesen (Abbildung 19).

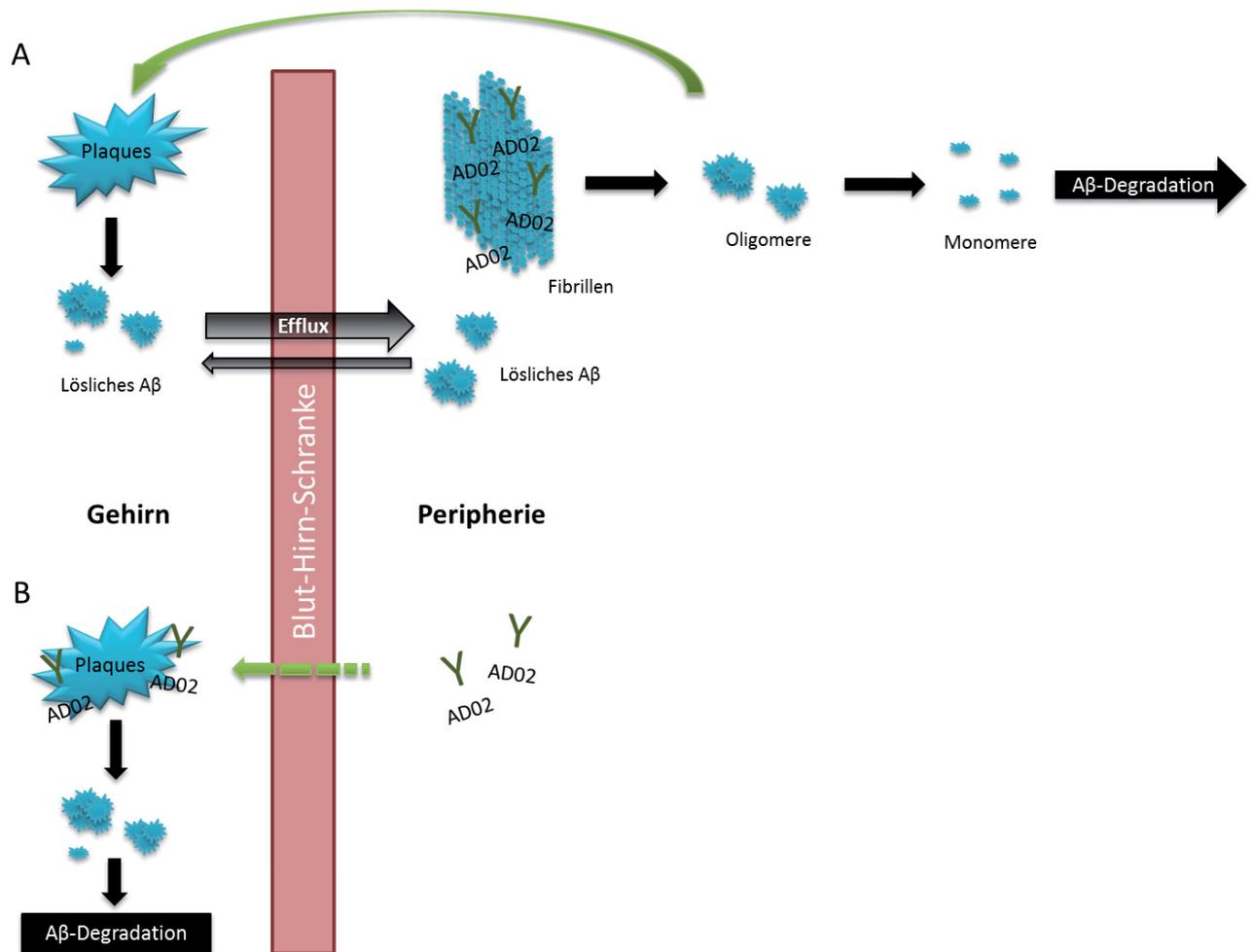
Die Behandlung mit AD03 bewirkte eine Veränderung der Immunreaktivität insofern, dass mehr Antikörper, die Monomere und Fibrillen binden, gebildet wurden. Hingegen war der Titer der Oligomer-bindenden Antikörper nur geringfügig höher (Abbildung 21). Dementsprechend führte die Immunisierung mit AD03 offenbar zu einer differenzierten Induktion von konformerspezifischen Antikörpern, die vor allem an die monomere und fibrilläre Form von A $\beta$  binden. Bzgl. AD03 ist bekannt, dass das A $\beta$ -Bindeepitop des Antikörpers, der zur Identifikation von AD03 eingesetzt wurde, zentral im A $\beta$ -Peptid lokalisiert ist und die Aminosäuren 14 bis 19 umfasst (persönliche Mitteilung Markus Mandler, AFFIRIS AG, Wien, Österreich). Dies ist interessant in Anbetracht der Tatsache, dass bekannte oligomerspezifische Antikörper ihr strukturelles Bindeepitop generell im Carboxy- sowie Amino-Terminus haben (Meli *et al.*, 2009), was darauf hinweisen könnte, dass der zentrale Bereich aufgrund von konformationsbedingten strukturellen Eigenschaften in Oligomeren nicht als Epitop zugänglich ist. Dies wäre eine

Erklärung dafür, warum hauptsächlich die Antikörperaktivität gegen Monomere und Fibrillen moduliert wurde, da Oligomere eventuell nicht von den durch das Affitop-induzierten Antikörpern gebunden werden können.

Die Auswertung der ELISA-Versuche mit Seren der mit AD02 behandelten Gruppe hat ebenfalls Unterschiede in der Quantifizierung der A $\beta$ -bindenden Antikörper ergeben. In diesem Fall war der Antikörpertiter gegen die Fibrillenform stark angestiegen. Die Menge an Monomer- und Oligomer-bindenden Antikörper war allerdings nahezu unverändert im Vergleich zu nicht-immunisierten Mäusen (Abbildung 22). In diesem Fall wurde also der spezifische Antikörpertiter gegen die Fibrillen erhöht. Für AD02 ist bekannt, dass sein Epitop direkt am Amino-Terminus von A $\beta$  in den Aminosäuren 1 bis 5 bzw. 6 lokalisiert ist (persönliche Mitteilung Markus Mandler, AFFIRIS AG, Wien, Österreich). Diese Region ist in Fibrillen leicht zugänglich (Petkova *et al.*, 2002), so dass gegen den Amino-Terminus gerichtete Antikörper eine hohe Affinität für Fibrillen haben. Die Quantifizierung der Antikörper in den ELISA zeigt, dass die durch die Immunisierung induzierten Antikörper tatsächlich präferentiell Fibrillen binden. Bard *et al.* zeigen zudem in ihren Studien, dass ausschließlich die gegen den Amino-Terminus gerichteten Antikörper zum Plaqueabbau führen (Bard *et al.*, 2003). Die möglichen Effekte dieser Antikörperbindung an Fibrillen werden in Abbildung 45 schematisch dargestellt. Ein möglicher Effekt dieser Antikörper-Fibrillen-Komplexbildung wäre, dass ein Abbau der Aggregate im Plasma ausgelöst wird. Die in der Peripherie stattfindenden Ereignisse führen zu einem Ungleichgewicht zum zerebralen A $\beta$ , weshalb ein Efflux in die Peripherie erfolgt. Dies wäre etwa durch den Abbau der Plaques und den Efflux von A $\beta$  möglich (Abbildung 45, A). Diese Hypothese würde auch eine Erklärung dafür liefern, weshalb in der Pathologie der behandelten Mäuse eine Reduktion der A $\beta$ -Belastung im Hirn vorliegt. Ein ähnlicher Mechanismus wurde bereits bei der aktiven Immunisierung mit A $\beta$ 1-42 beschrieben (Schenk *et al.*, 1999).

Eine weitere Möglichkeit ergibt sich, falls die Antikörper die Blut-Hirn-Schranke überwinden können. Auf diese Weise könnte durch die Anlagerung der Antikörper an die fibrillären Plaques der Abbau dieser Deposite direkt und dadurch die Abnahme der allgemeinen A $\beta$ -Belastung im Gehirn bewirkt werden (Abbildung 45, B).

Die aktive Immuntherapie mit dem A $\beta$ 1-42-Peptid hat bei Alzheimerpatienten erhebliche Entzündungsreaktionen hervorgerufen, die zu einem Abbruch der Therapiemaßnahmen geführt haben (Orgogozo *et al.*, 2003; Gilman *et al.*, 2005). Aufgrund der vorteilhaften Epitopstruktur von AD03 und AD02 wird in der Immunantwort die Kreuzreaktion mit APP und anderen körpereigenen Proteinen ausgeschlossen und eine geringe Konzentration während der Immunisierung eingesetzt, weshalb ähnliche Nebeneffekte nicht zu erwarten sind. Zudem wurde die Verträglichkeit der Substanz im Menschen bereits positiv evaluiert (Schneeberger *et al.*, 2009).



**Abbildung 45: Schematische Darstellung der möglichen therapeutischen Effekte der AD02-Fibrillen-Bindung.**  
**A** Antikörper, die durch die Immunisierung mit AD02 induziert werden, binden Fibrillen in der Peripherie und bewirken die Disassemblierung der Aggregate in kleinere Oligomere und Monomere. Dies führt zum Abbau von A $\beta$  in der Peripherie. Durch dieses Konzentrationsungleichgewicht erfolgt der Abbau der A $\beta$ -Plaques im Gehirn und der Efflux von zerebralem, löslichem A $\beta$  in die Peripherie. Dies führt zur Reduktion der A $\beta$ -Konzentration im Gehirn.  
**B** AD02 kann durch Mechanismen wie aktiven Transport etc. die Blut-Hirn-Schranke überqueren und die Plaques im Hirn direkt binden. Dadurch wird der Abbau der A $\beta$ -Plaques unmittelbar bewirkt, was ebenfalls in einer A $\beta$ -Degradation und Verringerung der A $\beta$ -Konzentration im Gehirn resultiert.

## 5.5 D-PEPTIDE ZUR DIAGNOSE DER ALZHEIMERSCHEN DEMENZ

Bei der Durchführung des Spiegelbild-Phagendisplays mit Aggregationskeim-freiem A $\beta$ pE sowie niedermolekularen und hochmolekularen A $\beta$ pE-Aggregaten wurden vier verschiedene D-Peptide mit der Bezeichnung D4 (KMEHPNHPPPQR), D5 (NGAPNKIPRDRE), D6 (AGERLKFIDEHV) und D7 (HTRFEYYVYHMS) aus den entsprechenden L-Peptiden abgeleitet. D4 und D5 hatten die Aggregationskeim-freie A $\beta$ pE-Präparation als Selektionsziel, D6 und D7 jeweils niedermolekulare und hochmolekulare A $\beta$ pE-Aggregate. Das Peptid D7 weist im Vergleich zu den anderen D-Peptiden einen hohen Anteil an aromatischen Aminosäuren auf (vgl. 4.5.1.1.3, Abbildung 29).

Die Bindeepitopbestimmung anhand verschiedener A $\beta$ -Fragmente ergab, dass die zentrale Region des A $\beta$ -Peptids von allen selektierten D-Peptiden gebunden wurde (vgl. 4.5.1.2, Abbildung 30). Dieser Bereich enthält das KLVFF-Peptid, das als Ansammlung hydrophober Reste eine entscheidende Rolle in der Fibrillation von A $\beta$  spielt (Tjernberg *et al.*, 1999). Zusätzlich zeigten insbesondere D6 und D7 eine hohe Affinität für das Peptid EFR an Position 3 bis 5, was auf eine gewisse Spezifität für die Amino-terminal verkürzte A $\beta$ -Form hinweisen könnte. D7 zeigt eine besonders große Bindeepitopregion, bei der zusätzlich zum zentralen und Amino-terminalen Bereich auch der Carboxy-Terminus erkannt wurde.

Neben diesen *in vitro*-Experimenten wurden auch die *ex vivo*-Bindungseigenschaften untersucht, wofür Hirnschnitte transgener Mäuse mit den Fluoreszein-markierten D-Peptiden angefärbt und die Fluoreszenzfärbung mit dem Plaque-bindenden Fluoreszenzfarbstoff Kongorot verglichen wurde (vgl. 4.5.1.3). Hierbei zeigte sich eine gewisse Selektivität bzgl. der Plaquefärbung, denn alle vier D-Peptide haben ausschließlich an Plaques gebunden, die gemäß der Kongorotfluoreszenz eine hohe Dichte vorwiesen. Kleinere und diffuse Plaques wurden von den Peptiden nicht erkannt. Dies deutet darauf hin, dass präferentiell fibrilläres A $\beta$ 1-42 gebunden wird, welches überwiegend in dichten Plaques vorkommt, während in diffusen Ablagerungen hingegen zu Beginn hauptsächlich amorphe Formen von A $\beta$ 1-42 aggregieren (Iwatsubo *et al.*, 1994; Guntert *et al.*, 2006).

Zusätzlich zu dieser Selektivität ist eine ausgeprägte Fluoreszenzverteilung für die Peptide D4, D5 und D6 erkennbar, bei der hauptsächlich ringförmige Strukturen um den inneren Plaquekern herum entstanden (Abbildung 31 und Abbildung 32). Dies deutet darauf hin, dass in den Plaques möglicherweise eine spezifische Verteilung der verschiedenen A $\beta$ -Isoformen von den D-Peptiden erkannt wurde. Die Kongorotbindung ließ keine derartigen Strukturen erkennen, da dieser Fluoreszenzfarbstoff eine generell Amyloid-bindende Substanz ist (Ladewig, 1945).

D7 zeigte ein von den drei anderen D-Peptiden abweichendes Bindungsmuster. Während D4, D5 und D6 besagte ringförmige Fluoreszenzverteilung erkennen ließen, wurde von D7 der innere Kern der Plaques flächig gebunden, ringförmig konzentrierte Binderegionen waren nicht erkennbar (Abbildung 32). Dies kann damit erklärt werden, dass die hochmolekularen fibrillären Aggregate hauptsächlich im Kern der Plaques vorkommen und das D7, welches hochmolekulares

---

A $\beta$ pE als Selektionsziel hatte, dementsprechend eine intensivere Bindung als die übrigen D-Peptide zeigte. Eine ähnliche durch die Konformerspezifität bedingte Lokalisation der Färbung zeigten auch Kayed *et al.* mit einem oligomerspezifischen Antikörper, der nicht mit dichten, fibrillären Plaques, die positiv für den Kongorot-ähnlichen Farbstoff Thioflavin S sind, kolokalisierte (Kayed *et al.*, 2003).

Die Interpretation dieser Ergebnisse deutet in ihrer Gesamtheit darauf hin, dass eine spezifische und selektive Bindung der D-Peptide an endogene Amyloidablagerungen stattzufinden scheint. Dies wurde für speziell selektierte Substanzen bereits häufiger beschrieben. So publizierten Wirths *et al.*, dass ein für das A $\beta$ pE-Oligomer spezifischer monoklonaler Antikörper ausschließlich Blutgefäße und intraneuronale Ablagerungen in familiären und sporadischen Alzheimerfällen anfärbt. Plaques wurden nicht detektiert (Wirths *et al.*, 2010). Das Peptid D1, was ebenfalls im Rahmen eines Spiegelbild-Phagendisplays selektiert wurde (Wiesehan *et al.*, 2003), zeigte ebenfalls spezifische Bindeeigenschaften und erkannte auch ausschließlich dichte Plaquestrukturen, aber keine diffusen Depoite (van Groen *et al.*, 2009).

Insgesamt sind diese selektierten D-Peptide sehr interessante Kandidaten für die Entwicklung von biomolekularen Plaquesonden in diagnostischen Anwendungen. Die selektive und möglicherweise spezifische Affinität für unterschiedliche Plaquestrukturen und A $\beta$ -Isoformen könnte die Diagnose der AD in bildgebenden Verfahren unterstützen und der Abgrenzung von anderen Amyloid-assoziierten neurodegenerativen Krankheiten dienen. Die möglicherweise geringe Immunogenität der nicht-physiologischen D-enantiomeren Aminosäuren kann hierbei von Vorteil sein. Insbesondere D7, mit einem hydrophoben Charakter und einer starken Bindung an dichte Plaques, wäre ein sehr vielversprechender Bioimaging-Kandidat, der die Blut-Hirnschranke überwinden könnte und dessen weitere Charakterisierung durchaus aussichtsreich ist.

## 5.6 D-PEPTIDE ZUR THERAPIE DER ALZHEIMERSCHEN DEMENZ

Ein weiteres Spiegelbild-Phagendisplay hatte die Identifizierung von D-Peptiden mit einer Spezifität für die oligomere Form von A $\beta$ 1-42 zum Ziel. Hierbei wurden Oligomere mittels Gelfiltrationschromatographie präpariert und zur Selektion eingesetzt. Im Verlauf der Phagendisplays wurden die zwei Septamere DO1 (SQPLWPP) sowie DO2 (QPHSRLP) und das Dodekamer DO3 (SGWHYNWQYWVK) identifiziert. Auffällig ist, dass die beiden Septamere sehr prolinreich sind, während das Dodekamer, ähnlich wie D7, aromatenreich ist (vgl. 4.5.2.1.3, Abbildung 37).

Diese drei Peptide wurden bzgl. ihrer *in vitro*-Bindung an verschiedene A $\beta$ -Konformere im ELISA getestet. Es ergaben sich unterschiedliche Affinitäten für die D-Peptide (vgl. 4.5.2.2). Das Peptid DO1 zeigte im ELISA eine äußerst schwache Bindung an sämtliche Konformere (Abbildung 38). Im Vergleich dazu waren die beiden anderen D-Peptide affin für unterschiedliche A $\beta$ -Formen. DO2 hat alle Formen in einer konzentrationsabhängigen Weise gebunden, wobei die Bindung an die Fibrillen zumindest im ELISA relativ stark war (Abbildung 39). Die *seedless*-Monomere und die Monomere aus der Gelfiltration haben je eine Carboxy- bzw. Amino-terminale Biotinylierung und wurden in gleicher Weise von DO2 gebunden. Dies deutet darauf hin, dass das DO2 sein Epitop wahrscheinlich entweder im zentralen Bereich hat oder aber dieses Epitop nicht direkt an die äußeren Amino- bzw. Carboxy-terminalen Enden grenzt. Allerdings ist keine hohe Affinität für das Oligomer als eigentliches Selektionsziel im Vergleich zu den anderen Konformeren vorhanden. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die Spezifität des Peptids hauptsächlich durch die Aminosäuresequenz des Zielpeptids und nicht durch dessen strukturelle Konformation determiniert wird.

Für DO3 wurden relativ hohe Affinitäten für sämtliche Konformere im ELISA nachgewiesen. Interessanterweise wurden die am Amino-Terminus biotinylierten Monomere kaum detektiert, während die *seedless*-Monomere mit der Carboxy-terminalen Biotinylierung stärker gebunden wurden (Abbildung 40). Dies kann als potentieller Hinweis auf eine am Amino-Terminus lokalisierte Bindeepitopstelle des Dodekamers ausgelegt werden.

Die Peptide DO1, DO2 und DO3 wurden im ThT-Aggregationstest eingesetzt. ThT ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der an  $\beta$ -Faltblatt-reiche Strukturen verschiedener amyloider Proteine bindet und nach der Anregung bei 440 nm bei einer Wellenlänge von 490 nm fluoresziert. Diese Emission kann auf diese Weise mit dem relativen Fibrillengehalt in der Probe korreliert werden (Groenning, 2009). ThT-Tests werden zur Messung der Fibrillation von A $\beta$  genutzt und vor allem bei Liganden verwendet, um eine mögliche inhibitorische Wirkung dieser auf die A $\beta$ -Aggregation nachzuweisen (Findeis und Molineaux, 1996).

Alle D-Peptide wurden in verschiedenen molaren Verhältnissen mit einer 10  $\mu$ M A $\beta$ -Lösung eingesetzt. Fünfzehn Stunden später, nach Erreichen der Sättigungsphase in der A $\beta$ -Kontrolle ohne Zusatz von Liganden, wurde die ThT-Fluoreszenz der Koinkubation von D-Peptiden und A $\beta$

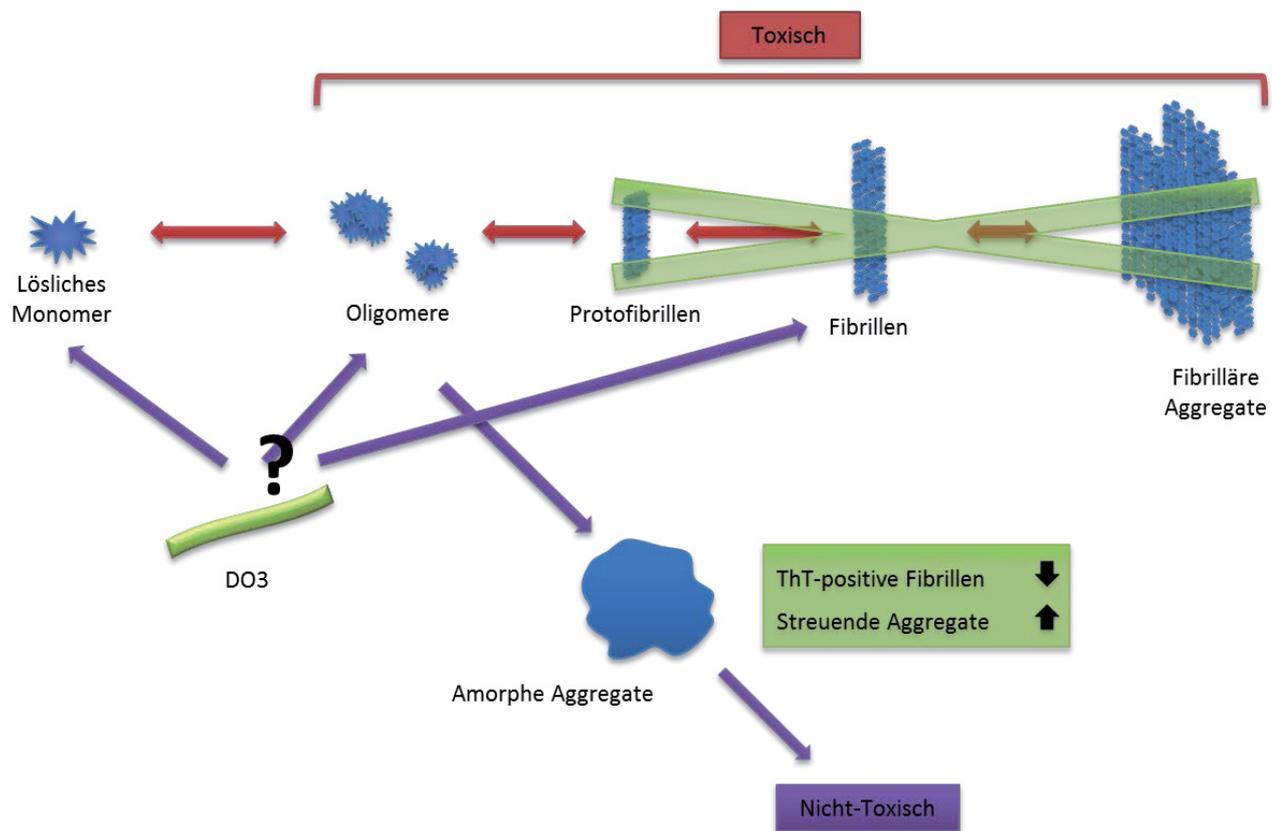
ausgewertet und prozentual in Abhängigkeit von der A $\beta$ -Kontrollinkubation dargestellt (vgl. 4.5.2.3).

Das Peptid DO1 wurde im ThT-Test in einem 1:1 sowie 10:1 molaren Verhältnis mit A $\beta$  (DO1:A $\beta$ ) inkubiert. Die Auswertung zeigt, dass die Gegenwart von DO1 keinen inhibitorischen Effekt auf die Fibrillation hatte. Die schwache Detektion im ELISA deutet darauf hin, dass das Peptid keine funktionelle Bindung mit A $\beta$  eingeht und deshalb die Fibrillationskinetik nicht beeinflusst wird (Abbildung 41).

DO2 hingegen, welches schwach an alle Konformere gebunden hat, inhibierte die Aggregation von A $\beta$  bei zehnfachem Überschuss. In einem äquimolaren Verhältnis hatte das Peptid keinen Einfluss auf die Fibrillation (Abbildung 42). Die schwache Bindung im ELISA kann als Erklärung dafür dienen, warum der Effekt im ThT-Aggregationstest so gering ausfällt. Da anhand der ELISA-Experimente gezeigt werden konnte, dass das DO2 eine leichte Präferenz für die fibrilläre Form hat, liegt die Vermutung nah, dass eine Assoziation des Liganden mit den Fibrillen stattfindet und dadurch möglicherweise die Bildung weiterer Fibrillen verhindert wird. Dieser Effekt wurde schon häufig für Liganden beschrieben. Ein von Gordon *et al.* entwickeltes Peptid z. B. verhindert ebenfalls die Bildung von Fibrillen (Gordon *et al.*, 2001).

Der stärkste inhibitorische Effekt wurde bei DO3 beobachtet. Hier reduzierte bereits die Hälfte der D-Peptid-Konzentration im Vergleich zu A $\beta$  die Fibrillenbildung um fast 50 %. Die äquimolare Konzentration führte sogar zu einer Inhibition um 70 % (Abbildung 43). Der deutliche Effekt vom Dodekamer geht einher mit der höheren Affinität des Peptids für A $\beta$  im ELISA verglichen zu den beiden Septameren.

Da für DO3 eine starke Inhibition der Fibrillation von A $\beta$ 1-42 beobachtet werden konnte, wurden zusätzlich Messungen mit dynamischer Lichtstreuung durchgeführt, um die Aggregatbildung im Allgemeinen, unabhängig von der Sekundärstruktur der Partikel, zu verfolgen (vgl. 4.5.2.4). Hierfür wurden 5  $\mu$ M A $\beta$ 1-42 und DO3 ebenfalls im Verhältnis 10:1, 2:1 sowie 1:1 untersucht. Es zeigte sich, dass, im Gegensatz zur ThT-Messung, eine Aggregatbildung in Anwesenheit von DO3 stattgefunden hat (Abbildung 44). Eine Korrelation der konzentrationsabhängigen Effekte war erkennbar: Sowohl in der ThT- als auch Lichtstreuungstrat bei einem 10:1 Verhältnis zwischen A $\beta$  und DO3 keine veränderte A $\beta$ -Fibrillation bzw. -Aggregation auf und erst das 2:1 Verhältnis ließ einen Effekt erkennen. Die Tatsache, dass bei den gleichen Verhältnissen keine ThT-positiven Fibrillen detektiert werden konnten, deutet darauf hin, dass es sich bei den Partikeln aus der Lichtstredetektion nicht um fibrilläre Aggregate handelte, sondern eher amorphe und möglicherweise nicht-toxische Aggregate entstanden. Da die ELISA-Studien zeigten, dass sämtliche Konformere von DO3 gebunden werden, stellt sich die Frage, über welches Intermediat diese Umformung erfolgen könnte. Abbildung 46 stellt eine schematische Übersicht dar, die den potentiellen Mechanismus zur Aggregationsmodulation von A $\beta$  durch DO3 erklärt.



**Abbildung 46: Schema zur potentiellen Modifikation der Aggregation von Aβ durch DO3.** Lösliche Monomere assoziieren im Verlauf der Fibrillation zu kleineren löslichen Oligomere. Insbesondere diese Oligomere können als toxische Konformere zahlreiche zellschädigende Effekte auslösen. Weitere Intermediate wie Protofibrillen stellen den Zwischenschritt zu den dichtgepackten Fibrillen und deren Zusammenlagerung zu fibrillären Aggregaten dar. Diese werden letztendlich in Plaques abgelagert (rote Pfeile). All diese Konformere sind zu unterschiedlichen Graden toxisch. Die Zugabe von DO3 reduziert den Anteil an ThT-positiven Fibrillen und bewirkt gleichzeitig die Ausbildung größerer Aggregate, die aufgrund der ThT-Negativität vermutlich eine nicht-fibrilläre, amorphe Struktur vorweisen. Amorphe Strukturen sind meist nicht-toxisch. Dementsprechend könnte DO3 durch Assoziation mit Monomeren, Oligomeren oder Fibrillen die Aggregation in fibrilläre, toxische Aggregate verhindern und stattdessen die Bildung von amorphen, nicht-toxischen Aggregate bewirken (lila Pfeile).

Ein vergleichbarer Mechanismus wurde bereits für das Peptid D3 nachgewiesen. Ähnliche Versuche zeigten für dieses D-Peptid den gleichen Effekt auf die Aβ<sub>1-42</sub>-Aggregation. Weitere Methoden, wie etwa die Transmissionselektronmikroskopie, Turbiditätsmessungen sowie Toxizitätstests konnten diesen Effekt zusätzlich verifizieren. Demnach werden toxische Oligomere von D3 in nicht-toxische amorphe Aggregate überführt (Funke *et al.*, 2010). Ein ähnlicher Mechanismus wäre auch für DO3 denkbar. Ähnliche Bindungsaffinitäten von DO3 und D3 (vgl. Anhang, Abbildung 48) zu Aβ-Oligomeren und -Fibrillen in ELISA-Versuchen belegen, dass DO3 vergleichbare konformerspezifische Bindungseigenschaften wie D3 vorweist und unterstützen den möglichen Zusammenhang zwischen den Wirkmechanismen der beiden D-Peptide.

## 5.7 AUSBLICK

Die Analyse der Antikörperaktivität in Seren von verschiedenen Demenzpatientengruppen hat interessante Resultate erzielt und eine möglicherweise konformerspezifische anti-A $\beta$ -Immunaktivität der Antikörper in den Seren der Patienten offenbart. Allerdings wurde die Probandenzahl niedrig gehalten, da es sich vorerst um Etablierungsversuche handelte. In zukünftigen Messungen soll deshalb die Zahl der Patienten in sämtlichen Gruppen erhöht und die Seren stärker konzentriert eingesetzt werden, um die Aussagekraft der statistischen Auswertung zu erhöhen und die Ergebnisse für die Allgemeinheit zu validieren.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Weiterentwicklung des ELISA zur Detektion der konformerspezifischen Antikörperaktivität in humanen Seren. Serenproben von Patienten, die im Rahmen einer aktiven Immuntherapie mit Affitopen behandelt wurden, sollen im bereits etablierten ELISA getestet werden. Der ELISA soll zeigen, ob in diesen Patienten eine konformerspezifische, immuninduzierte Erhöhung von A $\beta$ -bindenden Antikörpern in den Seren, ähnlich wie in den transgenen Mäusen, stattgefunden hat.

Das Phagendisplay mit A $\beta$ pE als Zielpeptid hat interessante D-Peptidkandidaten für diagnostische Zwecke hervorgebracht. Die Analyse der bereits identifizierten D-Peptide soll vertieft werden, daher wird geplant, die Spezifität der potentiellen Peptide als Plaquesonden detaillierter zu charakterisieren. Dies soll vorerst im Hirn von transgenen Mäusen durch den Vergleich der Peptidbindung an Plaques mit der Bindung von spezifischen A $\beta$ pE-, A $\beta$ 1-42- und A $\beta$ 1-40-Antikörpern erfolgen. Durch Kolo-kalisation der D-Peptide und Antikörper soll die Präferenz der Peptide für verschiedene Isoformen festgestellt werden. Zusätzlich soll die Bindung an amyloide Ablagerungen aus anderen Amyloidosen mittels histologischer Färbungen von humanen Hirnschnitten verschiedener Patientengruppen bewertet werden, um die Eignung als AD-spezifische Sonden zu gewährleisten.

Des Weiteren soll die Tauglichkeit der Peptide, die gegen Oligomere selektiert wurden, als Aggregationsinhibitoren weiter untersucht werden. Dies soll durch *in vitro*-Toxizitätstests in humanen Zellkulturmodellen sowie nach erfolgreicher Anwendung auch *in vivo* durch Verabreichung in transgene Mäuse geschehen, um die Effekte auf die zerebrale A $\beta$ -Belastung, inflammatorischen Reaktionen sowie kognitiven Leistungen zu prüfen.

Ein weiterer Punkt ist die Optimierung der Phagendisplayselektion, wodurch die Spezifität der Peptide für das erwünschte Zielkonformer bereits während der Selektion durch eine vorherige Gegenselektion der Phagen gegen unerwünschte A $\beta$ -Konformationen gesteigert werden soll. Dies soll zum einen mit einer monomerspezifischen Selektion mit einer Prä-Selektion gegen Oligomere und Fibrillen, sowie umgekehrt mit einer oligomerspezifischen Selektion mit einer Prä-Selektion gegen Monomere und Fibrillen, erreicht werden.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Alzheimersche Demenz ist die häufigste neurodegenerative Erkrankung weltweit und beruht unter anderem auf der Aggregation von fehlgefaltetem A $\beta$ -Peptid. Toxische Oligomere werden als die Hauptursache der Pathogenese gesehen und sind daher der Schwerpunkt von diagnostischen und therapeutischen Forschungsvorhaben. Insbesondere die Amino-terminal modifizierte Pyroglutamatisoform ist als neue, ätiologische Komponente in den Vordergrund getreten. Im Rahmen dieser Dissertation wurden Beiträge zur Grundlagenforschung der AD geleistet sowie Konzepte für innovative Diagnose- und Therapieansätze mit Oligomeren und Pyroglutamat-A $\beta$  als Fokus der Behandlung entwickelt.

Die Aggregation verschiedener A $\beta$ -Isoformen wurde mittels dynamischer Lichtstreuung untersucht. Es wurde gezeigt, dass die Amino-terminal modifizierte Pyroglutamatform A $\beta$ pE3-40 deutlich schneller und stärker aggregierte als die übrigen A $\beta$ -Isoformen. Auch die Amino-terminal verkürzte Form A $\beta$ 3-40 aggregierte bereits schneller als A $\beta$ 1-42.

Darüber hinaus konnte die schnelle und zuverlässige Präparation von Monomeren, Oligomeren und Fibrillen etabliert werden. Mithilfe dieser präparierten Konformere wurde gezeigt, dass in MCI-Patienten möglicherweise ein immunologisches Defizit vorliegt, bei dem die anti-A $\beta$ -Antikörpertiter in Seren im Vergleich zu den in gesunden Kontrollpersonen reduziert zu sein scheint. Dies ist vor allem für die Bindung der monomeren und oligomeren Form von A $\beta$  der Fall gewesen. Dieser Befund verdeutlicht, dass im Fall der MCI insbesondere für die toxischen Oligomere geringe spezifische Antikörpertiter vorzuliegen scheinen und könnte als ein potentieller Grund für die erhöhte A $\beta$ -Suszeptibilität in Demenzpatienten interpretiert werden.

Zusätzlich wurden die Auswirkungen von aktiven immuntherapeutischen Behandlungen mit den beiden Affitopen AD03 und AD02 im ELISA mit Seren aus behandelten transgenen Mäusen evaluiert. Es konnte gezeigt werden, dass beide Peptide eine hohe Immunantwort induzierten, die vor allem zu einer Fibrillen-bindenden Antikörperbildung führte.

Des Weiteren konnten im Spiegelbild-Phagendisplay die D-Peptide D4, D5, D6 und D7 identifiziert werden. Diese Peptide wurden als affine Plaquesonden in Hirnschnitten von transgenen Mäusen eingesetzt und färbten spezifisch und selektiv A $\beta$ -Amyloidablagerungen und könnten somit zu biomolekularen Sonden weiterentwickelt werden, die in der bildgebenden Diagnose der AD einsetzbar wären. Hierbei ist insbesondere das Peptid D7 hervorzuheben, da es aufgrund seines hohen Aromatenanteils sehr hydrophob ist und daher möglicherweise Blut-Hirn-Schranken-permeabel sein kann.

Abschließend wurden weitere D-Peptide gegen oligomeres A $\beta$ 1-42 selektiert. Diese sind als therapeutische Wirkstoffe von Interesse. So zeigt vor allem das Dodekamer DO3 äußerst potente aggregationsinhibierende Eigenschaften.

## 7 SUMMARY

Alzheimer's Disease (AD) is the most common form of neurodegenerative diseases worldwide and is mainly caused by the aggregation of misfolded A $\beta$  peptide. Toxic oligomers are proposed to be the main culprit of the pathogenesis and are thus a key aspect of diagnostic and therapeutic research. The amino-terminally modified pyroglutamate form recently emerged as a novel, etiologically relevant component. The main objectives of this work were to contribute to the fundamental research of AD and to develop new concepts for innovative diagnostic and therapeutic approaches with oligomers and pyroglutamate A $\beta$  as the target.

The aggregation of various A $\beta$  isoforms was studied using dynamic light scattering. The amino-terminally modified pyroglutamate form A $\beta$ pE3-40 was proven to be more aggregation prone compared to the other isoforms. The amino-terminally shortened form A $\beta$ 3-40 was also aggregating faster than A $\beta$ 1-42.

Additionally, a method for the quick and reliable preparation of monomers, oligomers and fibrils was established. Using these preparations an immunological deficit in mild cognitive impairment (MCI) patients was demonstrated, where the anti-A $\beta$  antibody activity in MCI patients was reduced compared to the controls. This was particularly the case for the monomeric and oligomeric form of A $\beta$ . These results indicate that there may be a reduced titer of oligomer-specific antibodies in patients' sera present, which could be a potential cause for the higher A $\beta$  susceptibility in patients with dementia.

Furthermore, the effects of the active immunization with the Affitopes AD03 and AD02 in transgenic mice were evaluated in murine sera using ELISA setups. Both peptides induced a high immune response, which appeared to lead to an increased production of primarily fibril-binding antibodies.

Using mirror-image phage display the D-peptides D4, D5, D6 and D7 were identified. These peptides were applied as affine probes for plaque detection in brain sections of transgenic mice and were found to bind A $\beta$  amyloid deposits in a specific and selective manner. These peptides could therefore be further developed to plaque markers in bioimaging setups for diagnostic purposes. D7 in particular exhibits promising features due to its hydrophobic nature. This hydrophobicity could possibly increase blood-brain-barrier permeability.

Finally, another mirror image phage display aimed at the selection of A $\beta$ 1-42 oligomer-specific D-peptides. These peptides are very interesting as therapeutic compounds. The peptide DO3 in particular shows very potent aggregation inhibitory characteristics.

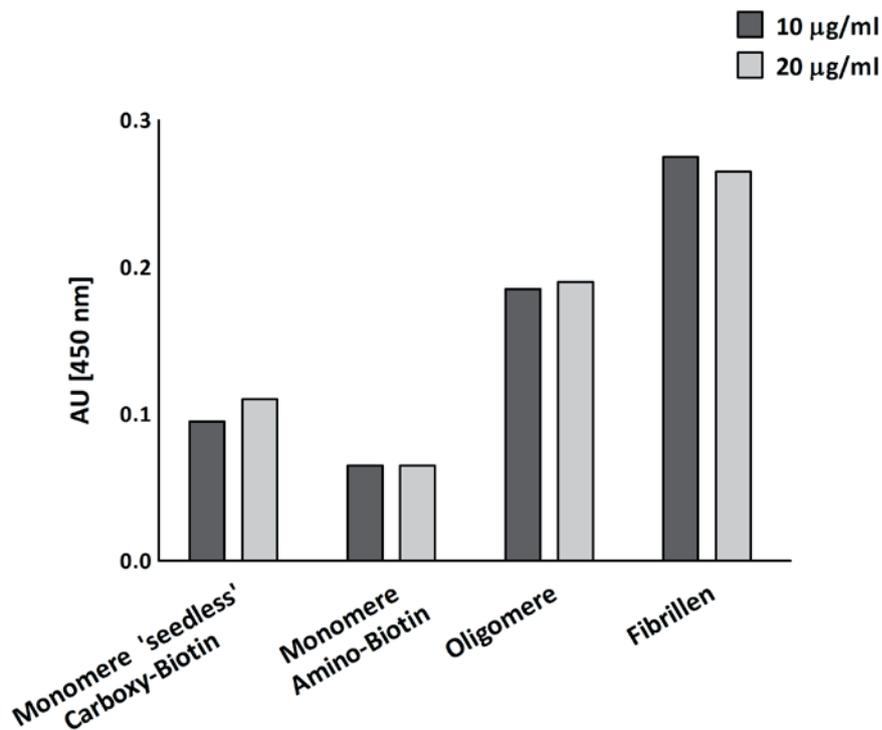
# ANHANG

## SCHEMA DER PEPSPOT-MEMBRAN

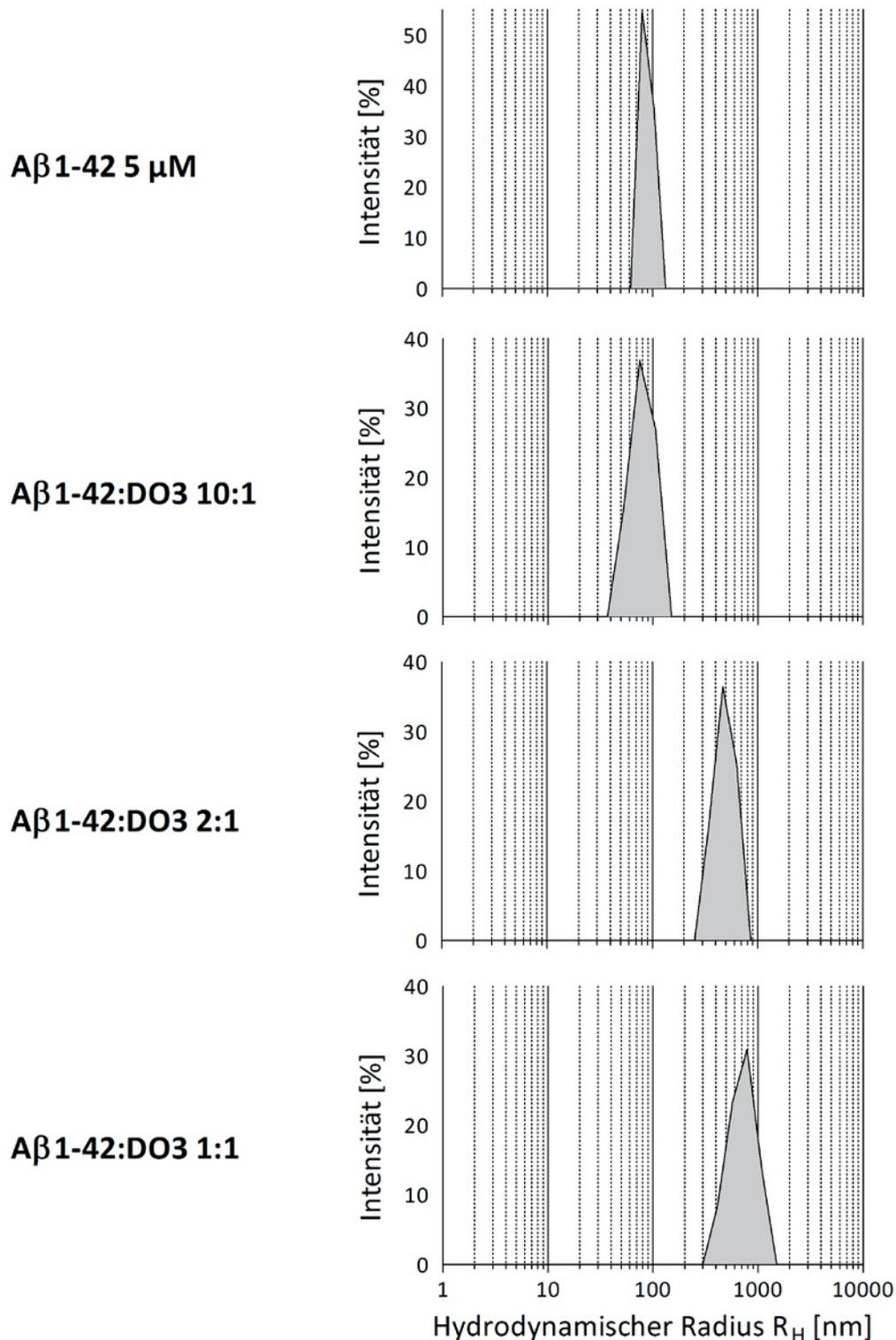
○	AS 1-12:	DAEFRHDSGYEV
○	AS 6-17:	HDSGYEVHHQKL
○	AS 11-22:	EVHHQKLVFFAE
○	AS 16-27:	KLVFFAEDVGSN
○	AS 21-32:	AEDVGSNKGAI
○	AS 26-37:	SNKGAIIGLMVG
○	AS 31-42:	IIGLMVGGVVIA
○	AS 31-40:	IIGLMVGGVV
○	AS 1-3:	DAE
○	AS 3-5:	EFR
○	AS 1-5:	DAEFR
○	AS 16-20:	KLVFF
○	AS 19-21:	FFA
○	AS 16-22:	KLVFFAE
○	AS 21-23:	AED
○	AS 37-40:	GGVV
○	AS 37-42:	GGVVIA
○	AS 26-38:	SNKGAIIGLMVGG
○	AS 3-15:	pEFRHDSGYEVHHQ

**Abbildung 47: Schema zur Immobilisierung verschiedener A $\beta$ - und A $\beta$ pE-Fragmente auf der PepSpot-Membran.** Dargestellt sind die unterschiedlichen Peptidfragmente, die auf der jeweiligen Zellulose-Membran immobilisiert vorliegen. Die Immobilisierung erfolgte am Carboxy-Terminus des jeweiligen A $\beta$ -Peptidfragments. Es gilt die Ein-Buchstaben-Kodierung der Aminosäuren. Die unterschiedlichen Aminosäuregruppen sind wie folgt markiert: schwarz = aliphatisch hydrophob; orange = aromatisch; grün = polar ungeladen; blau = basisch positiv-geladen; rot = sauer negativ-geladen. Abk.: AS = Aminosäure; p = pyro.

## ELISA-BINDUNGSSTUDIEN VON D3 AN A $\beta$ 1-42-KONFORMERE



**Abbildung 48: ELISA zur Quantifizierung der Bindung von D3-F an verschiedene A $\beta$ 1-42 Konformere.** *Seedless*-Monomere aus Carboxy-terminal biotinyliertem A $\beta$  und Monomere, Oligomere und Fibrillen aus Amino-terminal biotinyliertem A $\beta$  wurden zu je 5  $\mu\text{g/ml}$  immobilisiert und das D3-F (H-RPRTLHTRNR-K-(FAM)-NH<sub>2</sub>) in einer Konzentration von 10 und 20  $\mu\text{g/ml}$  appliziert. Dargestellt ist die Quantifizierung der Bindung der Peptide in einer zweifachen Bestimmung als Absorption (AU = *absorption unit*) bei 450 nm nach Abzug der Hintergrundabsorption.

**PARTIKELDISTRIBUTION VON A $\beta$ 1-42 IN GEGENWART VON DO3**

**Abbildung 49: Messung der dynamischen Lichtstreuung von A $\beta$ 1-42 in Gegenwart von DO3.** Dargestellt sind die Partikelgrößen von A $\beta$ 1-42 bei einer Konzentration von 5  $\mu$ M in Natriumphosphatpuffer bei pH 7,4 sowie zusammen mit DO3 in einem 10:1, 2:1 und 1:1 Verhältnis (A $\beta$ :DO3). Die Abbildung zeigt die prozentuale Streuintensität der Partikel in Abhängigkeit vom hydrodynamischen Radius der Partikel in logarithmischer Darstellung. Die Messung erfolgte für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit einer Datenakquisition alle 5 Sekunden.

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

$\alpha$	anti
Abb.	Abbildung
Abk.	Abkürzung
A $\beta$	Amyloid- $\beta$
A $\beta$ pE	Pyroglutamat-A $\beta$
AD	Alzheimersche Demenz
ADDL	<i>A<math>\beta</math>-derived diffusible ligand</i> ; A $\beta$ -abgeleiteter diffusierender Ligand
APP	Amyloid-Präkursor-Protein
AS	Aminosäure
AU	Absorptionseinheit
Bio	Biotin
BSA	<i>Bovine serum albumin fraction V</i> ; Rinderserumalbumin Fraktion V
ca.	circa
CSF	<i>Cerebrospinal fluid</i> ; Zerebrospinalflüssigkeit
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> ; Enzym-gekoppelter Immunnachweis
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> ; und andere
FAD	Familiäre Alzheimersche Demenz
FAM	5(6)-Carboxyfluoreszein
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
H	<i>Heavy chain</i> ; Schwere Kette
HCl	Salzsäure
HFIP	1,1,1,3,3,3,-Hexafluoro-2-propanol
HRP	<i>Horse radish peroxidase</i> ; Meerrettichperoxidase
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid;
KCl	Kaliumchlorid
kDa	kiloDalton
L	<i>Light chain</i> ; Leichte Kette
$\lambda_{em}$	Emissionswellenlänge
$\lambda_{ex}$	Exzitationswellenlänge
MCI	<i>Mild cognitive impairment</i> ; Leichte kognitive Beeinträchtigung

---

M	Stoffmengenkonzentration in mol pro Liter
mA	milliAmpere
mAU	milliAbsorptionseinheit
ml	milliLiter
mM	milliMolar
µg	mikroGramm
µl	mikroLiter
µm	mikroMeter
µM	mikroMolar
MRT	Magnetresonanztomographie
ms	milliSekunden
ng	nanoGramm
nm	nanoMeter
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NaP <sub>i</sub>	Natriumphosphat
o.D.	optische Dichte
p	pyro
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> ; Phosphat-gepufferte Saline
PEG	Polyethylenglykol
PET	Positronenemissionstomographie
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RFU	<i>Relative fluorescence unit</i> ; Relative Fluoreszenzeinheit
R <sub>H</sub>	Hydrodynamischer Radius
rpm	<i>rounds per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
SDS	<i>Sodium dodecylsulfate</i> ; Natriumdodecylsulfat
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> ; Tris-gepufferte Saline
Tet	Tetrazyklin
ThT	Thioflavin T
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt
vgl.	vergleiche
v/v	<i>volume per volume</i> ; Volumen pro Volumen
w/v	<i>weight per volume</i> ; Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
z. B.	zum Beispiel

---

## EIN-BUCHSTABEN-KODIERUNG DER AMINOSÄUREN

A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

## **PUBLIKATIONEN UND POSTERPRÄSENTATIONEN**

### **PUBLIKATIONEN**

D. Schlenzig, S. Manhart, Y. Cinar, M. Kleinschmidt, G. Hause, D. Willbold, S. A. Funke, S. Schilling and H. U. Demuth (2009) "Pyroglutamate formation influences solubility and amyloidogenicity of amyloid peptides" *Biochemistry* **48** (29): 7072-8

### **POSTERPRÄSENTATIONEN**

Yeliz Cinar, Martin Kleinschmidt, Hans-Ulrich Demuth, Susanne Aileen Funke, Dieter Willbold; Identification of pyroglutamate amyloid- $\beta$  binding D-peptides using mirror image phage display. *Amyloid*, Halle/Saale, **2011**

Yeliz Cinar, Susanne Aileen Funke, Thomas van Groen, Inga Kadish, Katja Wiesehan, Dieter Willbold; Identification of specific amyloid- $\beta$  binding D-peptides using mirror image phage display. *Neuro-Visionen 5*, Bochum, **2009**

---

## LITERATURVERZEICHNIS

- Akikusa, S., K. I. Watanabe, E. Horikawa, K. Nakamura, M. Kodaka, H. Okuno, and T. Konakahara. 2003. Practical assay and molecular mechanism of aggregation inhibitors of beta-amyloid. *J Pept Res* 61 (1):1-6.
- Alzheimer, A., R. A. Stelzmann, H. N. Schnitzlein, and F. R. Murtagh. 1995. An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clin Anat* 8 (6):429-431.
- Amijee, H., and D. I. Scopes. 2009. The quest for small molecules as amyloid inhibiting therapies for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 17 (1):33-47.
- Avramopoulos, D. 2009. Genetics of Alzheimer's disease: recent advances. *Genome Med* 1 (3):34.
- Azzazy, H. M., and W. E. Highsmith, Jr. 2002. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clin Biochem* 35 (6):425-445.
- Ballard, C., S. Gauthier, A. Corbett, C. Brayne, D. Aarsland, and E. Jones. 2011. Alzheimer's disease. *Lancet* 377 (9770):1019-1031.
- Barclay, L. L., A. Zemcov, J. P. Blass, and J. Sansone. 1985. Survival in Alzheimer's disease and vascular dementias. *Neurology* 35 (6):834-840.
- Bard, F., R. Barbour, C. Cannon, R. Carretto, M. Fox, D. Games, T. Guido, K. Hoenow, K. Hu, K. Johnson-Wood, K. Khan, D. Kholodenko, C. Lee, M. Lee, R. Motter, M. Nguyen, A. Reed, D. Schenk, P. Tang, N. Vasquez, P. Seubert, and T. Yednock. 2003. Epitope and isotype specificities of antibodies to beta -amyloid peptide for protection against Alzheimer's disease-like neuropathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (4):2023-2028.
- Baril, L., L. Nicolas, B. Croisile, P. Crozier, C. Hessler, A. Sassolas, J. B. McCormick, and E. Trannoy. 2004. Immune response to Abeta-peptides in peripheral blood from patients with Alzheimer's disease and control subjects. *Neurosci Lett* 355 (3):226-230.
- Bartnik, D., S. A. Funke, L. C. Andrei-Selmer, M. Bacher, R. Dodel, and D. Willbold. 2010. Differently selected D-enantiomeric peptides act on different Abeta species. *Rejuvenation Res* 13 (2-3):202-205.
- Bharadwaj, P. R., A. K. Dubey, C. L. Masters, R. N. Martins, and I. G. Macreadie. 2008. Abeta aggregation and possible implications in Alzheimer's disease pathogenesis. *J Cell Mol Med* 13 (3):412-421
- Blennow, K., M. J. de Leon, and H. Zetterberg. 2006. Alzheimer's disease. *Lancet* 368 (9533):387-403.
- Boche, D., E. Zotova, R. O. Weller, S. Love, J. W. Neal, R. M. Pickering, D. Wilkinson, C. Holmes, and J. A. Nicoll. 2008. Consequence of Abeta immunization on the vasculature of human Alzheimer's disease brain. *Brain* 131 (Pt 12):3299-3310.
- Brakmann, S., U. Ketting, and F. Oehlenschläger. 1995. Die „Evolutive Biotechnologie“ und ihre Perspektiven. *Biologie in unserer Zeit* 25 (6):355-366.
- Brettschneider, S., N. G. Morgenthaler, S. J. Teipel, C. Fischer-Schulz, K. Burger, R. Dodel, Y. Du, H. J. Moller, A. Bergmann, and H. Hampel. 2005. Decreased serum amyloid beta(1-42) autoantibody levels in Alzheimer's disease, determined by a newly developed immuno-precipitation assay with radiolabeled amyloid beta(1-42) peptide. *Biol Psychiatry* 57 (7):813-816.
- Britschgi, M., C. E. Olin, H. T. Johns, Y. Takeda-Uchimura, M. C. LeMieux, K. Rufibach, J. Rajadas, H. Zhang, B. Tomooka, W. H. Robinson, C. M. Clark, A. M. Fagan, D. R. Galasko, D. M. Holtzman, M. Jutel, J. A. Kaye, C. A. Lemere, J. Leszek, G. Li, E. R. Peskind, J. F. Quinn, J. A. Yesavage, J. A. Ghiso, and T. Wyss-Coray. 2009. Neuroprotective natural antibodies to assemblies of amyloidogenic peptides decrease with normal aging and advancing Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (29):12145-12150.
- Burns, A., and S. Iliffe. 2009. Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med* 338:467-471.
- Butterfield, D. A., J. Drake, C. Pocernich, and A. Castegna. 2001. Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid beta-peptide. *Trends Mol Med* 7 (12):548-554.
- Carrotta, R., J. Barthes, A. Longo, V. Martorana, M. Manno, G. Portale, and P. L. San Biagio. 2007. Large size fibrillar bundles of the Alzheimer amyloid beta-protein. *Eur Biophys J* 36 (7):701-709.
- Chafekar, S. M., F. Baas, and W. Scheper. 2008. Oligomer-specific Abeta toxicity in cell models is mediated by selective uptake. *Biochim Biophys Acta* 1782 (9):523-531.

- Chen, Y. R., and C. G. Glabe. 2006. Distinct early folding and aggregation properties of Alzheimer amyloid-beta peptides Abeta40 and Abeta42: stable trimer or tetramer formation by Abeta42. *J Biol Chem* 281 (34):24414-24422.
- Chiang, P. K., M. A. Lam, and Y. Luo. 2008. The many faces of amyloid beta in Alzheimer's disease. *Curr Mol Med* 8 (6):580-584.
- Chromy, B. A., R. J. Nowak, M. P. Lambert, K. L. Viola, L. Chang, P. T. Velasco, B. W. Jones, S. J. Fernandez, P. N. Lacor, P. Horowitz, C. E. Finch, G. A. Krafft, and W. L. Klein. 2003. Self-assembly of Abeta(1-42) into globular neurotoxins. *Biochemistry* 42 (44):12749-12760.
- Cizas, P., R. Budvytyte, R. Morkuniene, R. Moldovan, M. Broccio, M. Losche, G. Niaura, G. Valincius, and V. Borutaite. 2010. Size-dependent neurotoxicity of beta-amyloid oligomers. *Arch Biochem Biophys* 496 (2):84-92.
- Cleary, J. P., D. M. Walsh, J. J. Hofmeister, G. M. Shankar, M. A. Kuskowski, D. J. Selkoe, and K. H. Ashe. 2005. Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci* 8 (1):79-84.
- Coles, M., W. Bicknell, A. A. Watson, D. P. Fairlie, and D. J. Craik. 1998. Solution structure of amyloid beta-peptide(1-40) in a water-micelle environment. Is the membrane-spanning domain where we think it is? *Biochemistry* 37 (31):11064-11077.
- Crescenzi, O., S. Tomaselli, R. Guerrini, S. Salvadori, A. M. D'Ursi, P. A. Temussi, and D. Picone. 2002. Solution structure of the Alzheimer amyloid beta-peptide (1-42) in an apolar microenvironment. Similarity with a virus fusion domain. *Eur J Biochem* 269 (22):5642-5648.
- Dahlgren, K. N., A. M. Manelli, W. B. Stine, Jr., L. K. Baker, G. A. Krafft, and M. J. LaDu. 2002. Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability. *J Biol Chem* 277 (35):32046-32053.
- Deshpande, A., E. Mina, C. Glabe, and J. Busciglio. 2006. Different conformations of amyloid beta induce neurotoxicity by distinct mechanisms in human cortical neurons. *J Neurosci* 26 (22):6011-6018.
- Du, Y., R. Dodel, H. Hampel, K. Buerger, S. Lin, B. Eastwood, K. Bales, F. Gao, H. J. Moeller, W. Oertel, M. Farlow, and S. Paul. 2001. Reduced levels of amyloid beta-peptide antibody in Alzheimer disease. *Neurology* 57 (5):801-805.
- Duyckaerts, C., B. Delatour, and M. C. Potier. 2009. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol* 118 (1):5-36.
- Evin, G., and A. Weidemann. 2002. Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease Abeta amyloid peptides. *Peptides* 23 (7):1285-1297.
- Ferrer, I., M. Boada Rovira, M. L. Sanchez Guerra, M. J. Rey, and F. Costa-Jussa. 2004. Neuropathology and pathogenesis of encephalitis following amyloid-beta immunization in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 14 (1):11-20.
- Findeis, M. A., and S. M. Molineaux. 1999. Design and testing of inhibitors of fibril formation. *Methods Enzymol* 309:476-488.
- Finder, V. H., and R. Glockshuber. 2007. Amyloid-beta aggregation. *Neurodegener Dis* 4 (1):13-27.
- Frydman-Marom, A., M. Rechter, I. Shefler, Y. Bram, D. E. Shalev, and E. Gazit. 2009. Cognitive-performance recovery of Alzheimer's disease model mice by modulation of early soluble amyloidal assemblies. *Angew Chem Int Ed Engl* 48 (11):1981-1986.
- Funke, S. A., T. van Groen, I. Kadish, D. Bartnik, L. Nagel-Steger, O. Brener, T. Sehl, R. Batra-Safferling, C. Moriscot, G. Schoehn, A. H. C. Horn, A. Muller-Schiffmann, C. Korth, H. Sticht, and D. Willbold. 2010. Oral Treatment with the D-Enantiomeric Peptide D3 Improves the Pathology and Behavior of Alzheimer's Disease Transgenic Mice. *Acs Chemical Neuroscience* 1 (9):639-648.
- Funke, S. A., and D. Willbold. 2009. Mirror image phage display--a method to generate D-peptide ligands for use in diagnostic or therapeutical applications. *Mol Biosyst* 5 (8):783-786.
- Gelinas, D. S., K. DaSilva, D. Fenili, P. St George-Hyslop, and J. McLaurin. 2004. Immunotherapy for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2):14657-14662.
- Ghanta, J., C. L. Shen, L. L. Kiessling, and R. M. Murphy. 1996. A strategy for designing inhibitors of beta-amyloid toxicity. *J Biol Chem* 271 (47):29525-29528.
- Gibson, T. J., and R. M. Murphy. 2005. Design of peptidyl compounds that affect beta-amyloid aggregation: importance of surface tension and context. *Biochemistry* 44 (24):8898-8907.

- Gilman, S., M. Koller, R. S. Black, L. Jenkins, S. G. Griffith, N. C. Fox, L. Eisner, L. Kirby, M. B. Rovira, F. Forette, and J. M. Orgogozo. 2005. Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology* 64 (9):1553-1562.
- Giuffrida, M. L., F. Caraci, B. Pignataro, S. Cataldo, B. P. De, V. Bruno, G. Molinaro, G. Pappalardo, A. Messina, A. Palmigiano, D. Garozzo, F. Nicoletti, E. Rizzarelli, and A. Copani. 2009. Beta-amyloid monomers are neuroprotective. *J Neurosci* 29 (34):10582-10587.
- Gong, Y., L. Chang, K. L. Viola, P. N. Lacor, M. P. Lambert, C. E. Finch, G. A. Krafft, and W. L. Klein. 2003. Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (18):10417-10422.
- Gordon, D. J., K. L. Sciarretta, and S. C. Meredith. 2001. Inhibition of beta-amyloid(40) fibrillogenesis and disassembly of beta-amyloid(40) fibrils by short beta-amyloid congeners containing N-methyl amino acids at alternate residues. *Biochemistry* 40 (28):8237-8245.
- Groenning, M. 2009. Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils-current status. *J Chem Biol* 3(1): 1-18
- Gruden, M. A., T. B. Davudova, M. Malisauskas, V. V. Zamotin, R. D. Sewell, N. I. Voskresenskaya, I. A. Kostanyan, V. V. Sherstnev, and L. A. Morozova-Roche. 2004. Autoimmune responses to amyloid structures of Abeta(25-35) peptide and human lysozyme in the serum of patients with progressive Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 18 (2):165-171.
- Gunn, A. P., C. L. Masters, and R. A. Cherny. 2010. Pyroglutamate-Abeta: Role in the natural history of Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 42 (12):1915-1918.
- Guntert, A., H. Dobeli, and B. Bohrmann. 2006. High sensitivity analysis of amyloid-beta peptide composition in amyloid deposits from human and PS2APP mouse brain. *Neuroscience* 143 (2):461-475.
- Gustaw, K. A., M. R. Garrett, H. G. Lee, R. J. Castellani, M. G. Zagorski, A. Prakasam, S. L. Siedlak, X. Zhu, G. Perry, R. B. Petersen, R. P. Friedland, and M. A. Smith. 2008. Antigen-antibody dissociation in Alzheimer disease: a novel approach to diagnosis. *J Neurochem* 106 (3):1350-1356.
- Habicht, G., C. Haupt, R. P. Friedrich, P. Hortschansky, C. Sachse, J. Meinhardt, K. Wieligmann, G. P. Gellermann, M. Brodhun, J. Gotz, K. J. Halbhauer, C. Rocken, U. Horn, and M. Fandrich. 2007. Directed selection of a conformational antibody domain that prevents mature amyloid fibril formation by stabilizing Abeta protofibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (49):19232-19237.
- Handattu, S. P., D. W. Garber, C. E. Monroe, T. van Groen, I. Kadish, G. Nayyar, D. Cao, M. N. Palgunachari, L. Li, and G. M. Anantharamaiah. 2009. Oral apolipoprotein A-I mimetic peptide improves cognitive function and reduces amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 34 (3):525-534.
- Hardy, J. A., and G. A. Higgins. 1992. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256 (5054):184-185.
- Harigaya, Y., T. C. Saido, C. B. Eckman, C. M. Prada, M. Shoji, and S. G. Younkin. 2000. Amyloid beta protein starting pyroglutamate at position 3 is a major component of the amyloid deposits in the Alzheimer's disease brain. *Biochem Biophys Res Commun* 276 (2):422-427.
- Harper, J. D., S. S. Wong, C. M. Lieber, and P. T. Lansbury, Jr. 1999. Assembly of A beta amyloid protofibrils: an in vitro model for a possible early event in Alzheimer's disease. *Biochemistry* 38 (28):8972-8980.
- He, W., and C. J. Barrow. 1999. The A beta 3-pyroglutamyl and 11-pyroglutamyl peptides found in senile plaque have greater beta-sheet forming and aggregation propensities in vitro than full-length A beta. *Biochemistry* 38 (33):10871-10877.
- Hepler, R. W., K. M. Grimm, D. D. Nahas, R. Breese, E. C. Dodson, P. Acton, P. M. Keller, M. Yeager, H. Wang, P. Shughrue, G. Kinney, and J. G. Joyce. 2006. Solution state characterization of amyloid beta-derived diffusible ligands. *Biochemistry* 45 (51):15157-15167.
- Hillen, H., S. Barghorn, A. Striebinger, B. Labkovsky, R. Muller, V. Nimmrich, M. W. Nolte, C. Perez-Cruz, I. van der Auwera, F. van Leuven, M. van Gaalen, A. Y. Bespalov, H. Schoemaker, J. P. Sullivan, and U. Ebert. 2010. Generation and therapeutic efficacy of highly oligomer-specific beta-amyloid antibodies. *J Neurosci* 30 (31):10369-10379.
- Hofschneider, P. H. 1963. Untersuchungen Über Kleine E Coli K 12 Bakteriophagen 1 Und 2 Mitteilung. *Zeitschrift Fur Naturforschung Part B-Chemie Biochemie Biophysik Biologie Und Verwandten Gebiete B* 18 (3):203-&.

- Holsinger, R. M., J. S. Lee, A. Boyd, C. L. Masters, and S. J. Collins. 2006. CSF BACE1 activity is increased in CJD and Alzheimer disease versus [corrected] other dementias. *Neurology* 67 (4):710-712.
- Hosoda, R., T. C. Saido, L. Otvos, Jr., T. Arai, D. M. Mann, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski, and T. Iwatsubo. 1998. Quantification of modified amyloid beta peptides in Alzheimer disease and Down syndrome brains. *J Neuropathol Exp Neurol* 57 (11):1089-1095.
- Hsiao, K., P. Chapman, S. Nilsen, C. Eckman, Y. Harigaya, S. Younkin, F. Yang, and G. Cole. 1996. Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274 (5284):99-102.
- Hung, L. W., G. D. Ciccotosto, E. Giannakis, D. J. Tew, K. Perez, C. L. Masters, R. Cappai, J. D. Wade, and K. J. Barnham. 2008. Amyloid-beta peptide (Abeta) neurotoxicity is modulated by the rate of peptide aggregation: Abeta dimers and trimers correlate with neurotoxicity. *J Neurosci* 28 (46):11950-11958.
- Hyman, B. T., C. Smith, I. Buldyrev, C. Whelan, H. Brown, M. X. Tang, and R. Mayeux. 2001. Autoantibodies to amyloid-beta and Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 49 (6):808-810.
- Ingelsson, M., H. Fukumoto, K. L. Newell, J. H. Growdon, E. T. Hedley-Whyte, M. P. Frosch, M. S. Albert, B. T. Hyman, and M. C. Irizarry. 2004. Early Abeta accumulation and progressive synaptic loss, gliosis, and tangle formation in AD brain. *Neurology* 62 (6):925-931.
- Iwatsubo, T., A. Odaka, N. Suzuki, H. Mizusawa, N. Nukina, and Y. Ihara. 1994. Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron* 13 (1):45-53.
- Jagust, W. 2006. Positron emission tomography and magnetic resonance imaging in the diagnosis and prediction of dementia. *Alzheimers Dement* 2 (1):36-42.
- Jan, A., O. Gokce, R. Luthi-Carter, and H. A. Lashuel. 2008. The ratio of monomeric to aggregated forms of Abeta40 and Abeta42 is an important determinant of amyloid-beta aggregation, fibrillogenesis, and toxicity. *J Biol Chem* 283 (42):28176-28189.
- Jan, A., D. M. Hartley, and H. A. Lashuel. 2010. Preparation and characterization of toxic Abeta aggregates for structural and functional studies in Alzheimer's disease research. *Nat Protoc* 5 (6):1186-1209.
- Janus, C., J. Pearson, J. McLaurin, P. M. Mathews, Y. Jiang, S. D. Schmidt, M. A. Chishti, P. Horne, D. Heslin, J. French, H. T. Mount, R. A. Nixon, M. Mercken, C. Bergeron, P. E. Fraser, P. St George-Hyslop, and D. Westaway. 2000. A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature* 408 (6815):979-982.
- Jianping, L., Y. Zhibing, Q. Wei, C. Zhikai, X. Jie, and L. Jinbiao. 2006. Low avidity and level of serum anti-Abeta antibodies in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 20 (3):127-132.
- Johansson, A. S., F. Berglind-Dehlin, G. Karlsson, K. Edwards, P. Gellerfors, and L. Lannfelt. 2006. Physicochemical characterization of the Alzheimer's disease-related peptides A beta 1-42Arctic and A beta 1-42wt. *FEBS J* 273 (12):2618-2630.
- Kawasaki, T., K. Onodera, and S. Kamijo. 2010. Selection of peptide inhibitors of soluble Abeta(1-42) oligomer formation by phage display. *Biosci Biotechnol Biochem* 74 (11):2214-2219.
- Kay, B. K., J. Kasanov, and M. Yamabhai. 2001. Screening phage-displayed combinatorial peptide libraries. *Methods* 24 (3):240-246.
- Kayed, R., E. Head, J. L. Thompson, T. M. McIntire, S. C. Milton, C. W. Cotman, and C. G. Glabe. 2003. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 300 (5618):486-489.
- Khachaturian, A. S., C. D. Corcoran, L. S. Mayer, P. P. Zandi, and J. C. Breitner. 2004. Apolipoprotein E epsilon4 count affects age at onset of Alzheimer disease, but not lifetime susceptibility: The Cache County Study. *Arch Gen Psychiatry* 61 (5):518-524.
- Kim, J. R., and R. M. Murphy. 2004. Mechanism of accelerated assembly of beta-amyloid filaments into fibrils by KLVFFK(6). *Biophys J* 86 (5):3194-3203.
- klunk, W. E., H. Engler, A. Nordberg, Y. Wang, G. Blomqvist, D. P. Holt, M. Bergstrom, I. Savitcheva, G. F. Huang, S. Estrada, B. Ausen, M. L. Debnath, J. Barletta, J. C. Price, J. Sandell, B. J. Lopresti, A. Wall, P. Koivisto, G. Antoni, C. A. Mathis, and B. Langstrom. 2004. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol* 55 (3):306-319.

- Klunk, W. E., B. J. Lopresti, M. D. Ikonovic, I. M. Lefterov, R. P. Koldamova, E. E. Abrahamson, M. L. Debnath, D. P. Holt, G. F. Huang, L. Shao, S. T. DeKosky, J. C. Price, and C. A. Mathis. 2005. Binding of the positron emission tomography tracer Pittsburgh compound-B reflects the amount of amyloid-beta in Alzheimer's disease brain but not in transgenic mouse brain. *J Neurosci* 25 (46):10598-10606.
- Kokkoni, N., K. Stott, H. Amijee, J. M. Mason, and A. J. Doig. 2006. N-Methylated peptide inhibitors of beta-amyloid aggregation and toxicity. Optimization of the inhibitor structure. *Biochemistry* 45 (32):9906-9918.
- Kuo, Y. M., M. R. Emmerling, A. S. Woods, R. J. Cotter, and A. E. Roher. 1997. Isolation, chemical characterization, and quantitation of A beta 3-pyroglutamyl peptide from neuritic plaques and vascular amyloid deposits. *Biochem Biophys Res Commun* 237 (1):188-191.
- Kuperstein, I., K. Broersen, I. Benilova, J. Rozenski, W. Jonckheere, M. Debulpaep, A. Vandersteen, I. Segers-Nolten, K. Van Der Werf, V. Subramaniam, D. Braeken, G. Callewaert, C. Bartic, R. D'Hooge, I. C. Martins, F. Rousseau, J. Schymkowitz, and B. De Strooper. 2010. Neurotoxicity of Alzheimer's disease Abeta peptides is induced by small changes in the Abeta42 to Abeta40 ratio. *EMBO J* 29 (19):3408-3420.
- Lacor, P. N., M. C. Buniel, L. Chang, S. J. Fernandez, Y. Gong, K. L. Viola, M. P. Lambert, P. T. Velasco, E. H. Bigio, C. E. Finch, G. A. Krafft, and W. L. Klein. 2004. Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers. *J Neurosci* 24 (45):10191-10200.
- Ladewig, P. 1945. Double-Refringence of the Amyloid-Congo-Red-Complex in Histological Sections. *Nature* 156 (3951):81-82.
- Ladiwala, A. R., J. S. Dordick, and P. M. Tessier. 2011. Aromatic small molecules remodel toxic soluble oligomers of amyloid beta through three independent pathways. *J Biol Chem* 286 (5):3209-3218.
- Lafaye, P., I. Achour, P. England, C. Duyckaerts, and F. Rougeon. 2009. Single-domain antibodies recognize selectively small oligomeric forms of amyloid beta, prevent Abeta-induced neurotoxicity and inhibit fibril formation. *Mol Immunol* 46 (4):695-704.
- Lambert, M. P., A. K. Barlow, B. A. Chromy, C. Edwards, R. Freed, M. Liosatos, T. E. Morgan, I. Rozovsky, B. Trommer, K. L. Viola, P. Wals, C. Zhang, C. E. Finch, G. A. Krafft, and W. L. Klein. 1998. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (11):6448-6453.
- Lannfelt, L., H. Basun, C. Vigo-Pelfrey, L. O. Wahlund, B. Winblad, I. Lieberburg, and D. Schenk. 1995. Amyloid beta-peptide in cerebrospinal fluid in individuals with the Swedish Alzheimer amyloid precursor protein mutation. *Neurosci Lett* 199 (3):203-206.
- Larbanoix, L., C. Burtea, E. Ansciaux, S. Laurent, I. Mahieu, L. Vander Elst, and R. N. Muller. 2011. Design and evaluation of a 6-mer amyloid-beta protein derived phage display library for molecular targeting of amyloid plaques in Alzheimer's disease: Comparison with two cyclic heptapeptides derived from a randomized phage display library. *Peptides* 32 (6):1232-1243.
- Lazo, N. D., M. A. Grant, M. C. Condron, A. C. Rigby, and D. B. Teplow. 2005. On the nucleation of amyloid beta-protein monomer folding. *Protein Sci* 14 (6):1581-1596.
- Lee, E. B., L. Z. Leng, B. Zhang, L. Kwong, J. Q. Trojanowski, T. Abel, and V. M. Lee. 2006. Targeting amyloid-beta peptide (Abeta) oligomers by passive immunization with a conformation-selective monoclonal antibody improves learning and memory in Abeta precursor protein (APP) transgenic mice. *J Biol Chem* 281 (7):4292-4299.
- Lemere, C. A., and E. Masliah. 2010. Can Alzheimer disease be prevented by amyloid-beta immunotherapy? *Nat Rev Neurol* 6 (2):108-119.
- Lesne, S., M. T. Koh, L. Kotilinek, R. Kaye, C. G. Glabe, A. Yang, M. Gallagher, and K. H. Ashe. 2006. A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 440 (7082):352-357.
- Levy-Lahad, E., E. M. Wijsman, E. Nemens, L. Anderson, K. A. Goddard, J. L. Weber, T. D. Bird, and G. D. Schellenberg. 1995. A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. *Science* 269 (5226):970-973.
- Liu, L., and R. M. Murphy. 2006. Kinetics of inhibition of beta-amyloid aggregation by transthyretin. *Biochemistry* 45 (51):15702-15709.
- Lomakin, A., G. B. Benedek, and D. B. Teplow. 1999. Monitoring protein assembly using quasielastic light scattering spectroscopy. *Methods Enzymol* 309:429-459.

- Lord, A., A. Gumucio, H. Englund, D. Sehlin, V. S. Sundquist, L. Soderberg, C. Moller, P. Gellerfors, L. Lannfelt, F. E. Pettersson, and L. N. Nilsson. 2009. An amyloid-beta protofibril-selective antibody prevents amyloid formation in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 36 (3):425-434.
- Marcello, A., O. Wirths, T. Schneider-Axmann, M. Degerman-Gunnarsson, L. Lannfelt, and T. A. Bayer. 2011. Reduced levels of IgM autoantibodies against N-truncated pyroglutamate Abeta in plasma of patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 32 (8):1379-1387.
- Masliah, E., L. Hansen, A. Adame, L. Crews, F. Bard, C. Lee, P. Seubert, D. Games, L. Kirby, and D. Schenk. 2005. Abeta vaccination effects on plaque pathology in the absence of encephalitis in Alzheimer disease. *Neurology* 64 (1):129-131.
- Mattson, M. P. 1997. Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol Rev* 77 (4):1081-1132.
- McColl, G., B. R. Roberts, A. P. Gunn, K. A. Perez, D. J. Tew, C. L. Masters, K. J. Barnham, R. A. Cherny, and A. I. Bush. 2009. The *Caenorhabditis elegans* A beta 1-42 model of Alzheimer disease predominantly expresses A beta 3-42. *J Biol Chem* 284 (34):22697-22702.
- Medecigo, M., K. Manoutcharian, V. Vasilevko, T. Govezensky, M. E. Munguia, B. Becerril, A. Luz-Madriral, L. Vaca, D. H. Cribbs, and G. Gevorkian. 2010. Novel amyloid-beta specific scFv and VH antibody fragments from human and mouse phage display antibody libraries. *J Neuroimmunol* 223 (1-2):104-114.
- Meli, G., M. Visintin, I. Cannistraci, and A. Cattaneo. 2009. Direct in vivo intracellular selection of conformation-sensitive antibody domains targeting Alzheimer's amyloid-beta oligomers. *J Mol Biol* 387 (3):584-606.
- Menendez, A., and J. K. Scott. 2005. The nature of target-unrelated peptides recovered in the screening of phage-displayed random peptide libraries with antibodies. *Anal Biochem* 336 (2):145-157.
- Moir, R. D., K. A. Tseitlin, S. Soscia, B. T. Hyman, M. C. Irizarry, and R. E. Tanzi. 2005. Autoantibodies to redox-modified oligomeric Abeta are attenuated in the plasma of Alzheimer's disease patients. *J Biol Chem* 280 (17):17458-17463.
- Morgan, D. 2011. Immunotherapy for Alzheimer's disease. *J Intern Med* 269 (1):54-63.
- Morgan, D., D. M. Diamond, P. E. Gottschall, K. E. Ugen, C. Dickey, J. Hardy, K. Duff, P. Jantzen, G. DiCarlo, D. Wilcock, K. Connor, J. Hatcher, C. Hope, M. Gordon, and G. W. Arendash. 2000. A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* 408 (6815):982-985.
- Mori, H., K. Takio, M. Ogawara, and D. J. Selkoe. 1992. Mass spectrometry of purified amyloid beta protein in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 267 (24):17082-17086.
- Mruthinti, S., J. J. Buccafusco, W. D. Hill, J. L. Waller, T. W. Jackson, E. Y. Zamrini, and R. F. Schade. 2004. Autoimmunity in Alzheimer's disease: increased levels of circulating IgGs binding Abeta and RAGE peptides. *Neurobiol Aging* 25 (8):1023-1032.
- Mucke, L. 2009. Neuroscience: Alzheimer's disease. *Nature* 461 (7266):895-897.
- Murphy, M. P., and H. Levine, III. 2010. Alzheimer's disease and the amyloid-beta peptide. *J Alzheimers Dis* 19 (1):311-323.
- Murphy, R. M., and M. M. Pallitto. 2000. Probing the kinetics of beta-amyloid self-association. *J Struct Biol* 130 (2-3):109-122.
- Murray, M. M., S. L. Bernstein, V. Nyugen, M. M. Condron, D. B. Teplow, and M. T. Bowers. 2009. Amyloid beta protein: Abeta40 inhibits Abeta42 oligomerization. *J Am Chem Soc* 131 (18):6316-6317.
- Naslund, J., V. Haroutunian, R. Mohs, K. L. Davis, P. Davies, P. Greengard, and J. D. Buxbaum. 2000. Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA* 283 (12):1571-1577.
- Nath, A., E. Hall, M. Tuzova, M. Dobbs, M. Jons, C. Anderson, J. Woodward, Z. Guo, W. Fu, R. Kryscio, D. Wekstein, C. Smith, W. R. Markesbery, and M. P. Mattson. 2003. Autoantibodies to amyloid beta-peptide (Abeta) are increased in Alzheimer's disease patients and Abeta antibodies can enhance Abeta neurotoxicity: implications for disease pathogenesis and vaccine development. *Neuromolecular Med* 3 (1):29-39.
- Nicoll, J. A., D. Wilkinson, C. Holmes, P. Steart, H. Markham, and R. O. Weller. 2003. Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. *Nat Med* 9 (4):448-452.

- O'Nuallain, B., A. D. Williams, H. P. McWilliams-Koeppen, L. Acero, A. Weber, H. Ehrlich, H. P. Schwarz, and A. Solomon. 2010. Anti-amyloidogenic activity of IgGs contained in normal plasma. *J Clin Immunol* 30:S37-42.
- Orgogozo, J. M., S. Gilman, J. F. Dartigues, B. Laurent, M. Puel, L. C. Kirby, P. Jouanny, B. Dubois, L. Eisner, S. Flitman, B. F. Michel, M. Boada, A. Frank, and C. Hock. 2003. Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization. *Neurology* 61 (1):46-54.
- Orner, B. P., L. Liu, R. M. Murphy, and L. L. Kiessling. 2006. Phage display affords peptides that modulate beta-amyloid aggregation. *J Am Chem Soc* 128 (36):11882-11889.
- Pai, A. S., I. Rubinstein, and H. Onyuksel. 2006. PEGylated phospholipid nanomicelles interact with beta-amyloid((1-42)) and mitigate its beta-sheet formation, aggregation and neurotoxicity in vitro. *Peptides* 27 (11):2858-2866.
- Pallitto, M. M., J. Ghanta, P. Heinzelman, L. L. Kiessling, and R. M. Murphy. 1999. Recognition sequence design for peptidyl modulators of beta-amyloid aggregation and toxicity. *Biochemistry* 38 (12):3570-3578.
- Paul, S., S. Planque, and Y. Nishiyama. 2010. Immunological origin and functional properties of catalytic autoantibodies to amyloid beta peptide. *J Clin Immunol* 30 Suppl 1:S43-49.
- Pearson, H. A., and C. Peers. 2006. Physiological roles for amyloid beta peptides. *J Physiol* 575:5-10.
- Permanne, B., C. Adessi, G. P. Saborio, S. Fraga, M. J. Frossard, J. Van Dorpe, I. Dewachter, W. A. Banks, F. Van Leuven, and C. Soto. 2002. Reduction of amyloid load and cerebral damage in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease by treatment with a beta-sheet breaker peptide. *FASEB J* 16 (8):860-862.
- Petkova, A. T., Y. Ishii, J. J. Balbach, O. N. Antzutkin, R. D. Leapman, F. Delaglio, and R. Tycko. 2002. A structural model for Alzheimer's beta -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (26):16742-16747.
- Piccini, A., C. Russo, A. Gliozzi, A. Relini, A. Vitali, R. Borghi, L. Giliberto, A. Armirotti, C. D'Arrigo, A. Bachi, A. Cattaneo, C. Canale, S. Torrassa, T. C. Saido, W. Markesbery, P. Gambetti, and M. Tabaton. 2005. beta-amyloid is different in normal aging and in Alzheimer disease. *J Biol Chem* 280 (40):34186-34192.
- Pike, C. J., M. J. Overman, and C. W. Cotman. 1995. Amino-terminal deletions enhance aggregation of beta-amyloid peptides in vitro. *J Biol Chem* 270 (41):23895-23898.
- Pires, R. H., M. J. Saraiva, A. M. Damas, and M. S. Kellermayer. 2011. Structure and assembly-disassembly properties of wild-type transthyretin amyloid protofibrils observed with atomic force microscopy. *J Mol Recognit* 24 (3):467-476.
- Poduslo, J. F., G. L. Curran, A. Kumar, B. Frangione, and C. Soto. 1999. Beta-sheet breaker peptide inhibitor of Alzheimer's amyloidogenesis with increased blood-brain barrier permeability and resistance to proteolytic degradation in plasma. *J Neurobiol* 39 (3):371-382.
- Portelius, E., N. Bogdanovic, M. K. Gustavsson, I. Volkman, G. Brinkmalm, H. Zetterberg, B. Winblad, and K. Blennow. 2010. Mass spectrometric characterization of brain amyloid beta isoform signatures in familial and sporadic Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 120 (2):185-193.
- Querfurth, H. W., and F. M. Laferla. 2010. Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 362 (4):329-344.
- Rangachari, V., Z. S. Davey, B. Healy, B. D. Moore, L. K. Sonoda, B. Cusack, G. M. Maharvi, A. H. Fauq, and T. L. Rosenberry. 2009. Rationally designed dehydroalanine (DeltaAla)-containing peptides inhibit amyloid-beta (Abeta) peptide aggregation. *Biopolymers* 91 (6):456-465.
- Reed, M. N., J. J. Hofmeister, L. Jungbauer, A. T. Welzel, C. Yu, M. A. Sherman, S. Lesne, M. J. Ladu, D. M. Walsh, K. H. Ashe, and J. P. Cleary. 2011. Cognitive effects of cell-derived and synthetically derived Abeta oligomers. *Neurobiol Aging* 32 (10):1784-1794.
- Ritchie, K., and S. Lovestone. 2002. The dementias. *Lancet* 360 (9347):1759-1766.
- Russo, C., T. C. Saido, L. M. DeBusk, M. Tabaton, P. Gambetti, and J. K. Teller. 1997. Heterogeneity of water-soluble amyloid beta-peptide in Alzheimer's disease and Down's syndrome brains. *FEBS Lett* 409 (3):411-416.
- Russo, C., E. Violani, S. Salis, V. Venezia, V. Dolcini, G. Damonte, U. Benatti, C. D'Arrigo, E. Patrone, P. Carlo, and G. Schettini. 2002. Pyroglutamate-modified amyloid beta-peptides--AbetaN3(pE)--strongly affect cultured neuron and astrocyte survival. *J Neurochem* 82 (6):1480-1489.
- Saido, T. C., W. Yamao-Harigaya, T. Iwatsubo, and S. Kawashima. 1996. Amino- and carboxyl-terminal heterogeneity of beta-amyloid peptides deposited in human brain. *Neurosci Lett* 215 (3):173-176.

- Schenk, D., R. Barbour, W. Dunn, G. Gordon, H. Grajeda, T. Guido, K. Hu, J. Huang, K. Johnson-Wood, K. Khan, D. Kholodenko, M. Lee, Z. Liao, I. Lieberburg, R. Motter, L. Mutter, F. Soriano, G. Shopp, N. Vasquez, C. Vandevent, S. Walker, M. Wogulis, T. Yednock, D. Games, and P. Seubert. 1999. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400 (6740):173-177.
- Schilling, S., T. Lauber, M. Schaupp, S. Manhart, E. Scheel, G. Bohm, and H. U. Demuth. 2006. On the seeding and oligomerization of pGlu-amyloid peptides (in vitro). *Biochemistry* 45 (41):12393-12399.
- Schilling, S., U. Zeitschel, T. Hoffmann, U. Heiser, M. Francke, A. Kehlen, M. Holzer, B. Hutter-Paier, M. Prokesch, M. Windisch, W. Jagla, D. Schlenzig, C. Lindner, T. Rudolph, G. Reuter, H. Cynis, D. Montag, H. U. Demuth, and S. Rossner. 2008. Glutaminyl cyclase inhibition attenuates pyroglutamate Abeta and Alzheimer's disease-like pathology. *Nat Med* 14 (10):1106-1111.
- Schlenzig, D., S. Manhart, Y. Cinar, M. Kleinschmidt, G. Hause, D. Willbold, S. A. Funke, S. Schilling, and H. U. Demuth. 2009. Pyroglutamate formation influences solubility and amyloidogenicity of amyloid peptides. *Biochemistry* 48 (29):7072-7078.
- Schneeberger, A., M. Mandler, F. Mattner, and W. Schmidt. 2010. AFFITOME(R) technology in neurodegenerative diseases: the doubling advantage. *Hum Vaccin* 6 (11):948-952.
- Schneeberger, A., M. Mandler, O. Otawa, W. Zauner, F. Mattner, and W. Schmidt. 2009. Development of AFFITOPE vaccines for Alzheimer's disease (AD)--from concept to clinical testing. *J Nutr Health Aging* 13 (3):264-267.
- Shankar, G. M., S. Li, T. H. Mehta, A. Garcia-Munoz, N. E. Shepardson, I. Smith, F. M. Brett, M. A. Farrell, M. J. Rowan, C. A. Lemere, C. M. Regan, D. M. Walsh, B. L. Sabatini, and D. J. Selkoe. 2008. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 14 (8):837-842.
- Smith, G. P., and V. A. Petrenko. 1997. Phage Display. *Chem Rev* 97 (2):391-410.
- Sohn, J. H., J. O. So, H. J. Hong, J. W. Kim, D. R. Na, M. Kim, H. Kim, E. Nam, H. J. Ha, Y. H. Kim, and I. Mook-Jung. 2009. Identification of autoantibody against beta-amyloid peptide in the serum of elderly. *Front Biosci* 14:3879-3883.
- Song, M. S., I. Mook-Jung, H. J. Lee, J. Y. Min, and M. H. Park. 2007. Serum anti-amyloid-beta antibodies and Alzheimer's disease in elderly Korean patients. *J Int Med Res* 35 (3):301-306.
- Soto, C., E. M. Sigurdsson, L. Morelli, R. A. Kumar, E. M. Castano, and B. Frangione. 1998. Beta-sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: implications for Alzheimer's therapy. *Nat Med* 4 (7):822-826.
- Stine, W. B., L. Jungbauer, C. Yu, and M. J. LaDu. 2011. Preparing synthetic Abeta in different aggregation states. *Methods Mol Biol* 670:13-32.
- Strozyk, D., K. Blennow, L. R. White, and L. J. Launer. 2003. CSF Abeta 42 levels correlate with amyloid-neuropathology in a population-based autopsy study. *Neurology* 60 (4):652-656.
- Szabo, P., D. M. Mujalli, M. L. Rotondi, R. Sharma, A. Weber, H. P. Schwarz, M. E. Weksler, and N. Relkin. 2010. Measurement of anti-beta amyloid antibodies in human blood. *J Neuroimmunol* 227 (1-2):167-174.
- Szabo, P., N. Relkin, and M. E. Weksler. 2008. Natural human antibodies to amyloid beta peptide. *Autoimmun Rev* 7 (6):415-420.
- Tabira, T. 2010. Immunization therapy for Alzheimer disease: a comprehensive review of active immunization strategies. *Tohoku J Exp Med* 220 (2):95-106.
- Taddei, K., S. M. Laws, G. Verdile, S. Munns, K. D'Costa, A. R. Harvey, I. J. Martins, F. Hill, E. Levy, J. E. Shaw, and R. N. Martins. 2010. Novel phage peptides attenuate beta amyloid-42 catalysed hydrogen peroxide production and associated neurotoxicity. *Neurobiol Aging* 31 (2):203-214.
- Tekirian, T. L., A. Y. Yang, C. Glabe, and J. W. Geddes. 1999. Toxicity of pyroglutaminated amyloid beta-peptides 3(pE)-40 and -42 is similar to that of A beta1-40 and -42. *J Neurochem* 73 (4):1584-1589.
- Thal, D. R., U. Rub, M. Orantes, and H. Braak. 2002. Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology* 58 (12):1791-1800.
- Thuncke, M., A. Lobbia, U. Kosciessa, T. Dyrks, A. E. Oakley, J. Turner, W. Saenger, and Y. Georgalis. 1998. Aggregation of A beta Alzheimer's disease-related peptide studied by dynamic light scattering. *J Pept Res* 52 (6):509-517.

- Tjernberg, L. O., A. Pramanik, S. Bjorling, P. Thyberg, J. Thyberg, C. Nordstedt, K. D. Berndt, L. Terenius, and R. Rigler. 1999. Amyloid beta-peptide polymerization studied using fluorescence correlation spectroscopy. *Chem Biol* 6 (1):53-62.
- Tomic, J. L., A. Pensalfini, E. Head, and C. G. Glabe. 2009. Soluble fibrillar oligomer levels are elevated in Alzheimer's disease brain and correlate with cognitive dysfunction. *Neurobiol Dis* 35 (3):352-358.
- Townsend, M., G. M. Shankar, T. Mehta, D. M. Walsh, and D. J. Selkoe. 2006. Effects of secreted oligomers of amyloid beta-protein on hippocampal synaptic plasticity: a potent role for trimers. *J Physiol* 572:477-492.
- Van Dam, D., and P. P. De Deyn. 2006. Drug discovery in dementia: the role of rodent models. *Nat Rev Drug Discov* 5 (11):956-970.
- van Groen, T., I. Kadish, K. Wiesehan, S. A. Funke, and D. Willbold. 2009. In vitro and in vivo staining characteristics of small, fluorescent, Abeta42-binding D-enantiomeric peptides in transgenic AD mouse models. *ChemMedChem* 4 (2):276-282.
- van Groen, T., K. Wiesehan, S. A. Funke, I. Kadish, L. Nagel-Steger, and D. Willbold. 2008. Reduction of Alzheimer's disease amyloid plaque load in transgenic mice by D3, A D-enantiomeric peptide identified by mirror image phage display. *ChemMedChem* 3 (12):1848-1852.
- van Marum, R. J. 2008. Current and future therapy in Alzheimer's disease. *Fundam Clin Pharmacol* 22 (3):265-274.
- Van Regenmortel, M. H., and S. Muller. 1998. D-peptides as immunogens and diagnostic reagents. *Curr Opin Biotechnol* 9 (4):377-382.
- Walsh, D. M., D. M. Hartley, Y. Kusumoto, Y. Fezoui, M. M. Condron, A. Lomakin, G. B. Benedek, D. J. Selkoe, and D. B. Teplow. 1999. Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates. *J Biol Chem* 274 (36):25945-25952.
- Wang, X. P., J. H. Zhang, Y. J. Wang, Y. Feng, X. Zhang, X. X. Sun, J. L. Li, X. T. Du, M. P. Lambert, S. G. Yang, M. Zhao, W. L. Klein, and R. T. Liu. 2009. Conformation-dependent single-chain variable fragment antibodies specifically recognize beta-amyloid oligomers. *FEBS Lett* 583 (3):579-584.
- Ward, R. V., K. H. Jennings, R. Jepras, W. Neville, D. E. Owen, J. Hawkins, G. Christie, J. B. Davis, A. George, E. H. Karran, and D. R. Howlett. 2000. Fractionation and characterization of oligomeric, protofibrillar and fibrillar forms of beta-amyloid peptide. *Biochem J* 348:137-144.
- Weksler, M. E., N. Relkin, R. Turkenich, S. LaRusse, L. Zhou, and P. Szabo. 2002. Patients with Alzheimer disease have lower levels of serum anti-amyloid peptide antibodies than healthy elderly individuals. *Exp Gerontol* 37 (7):943-948.
- Wiesehan, K., K. Buder, R. P. Linke, S. Patt, M. Stoldt, E. Unger, B. Schmitt, E. Bucci, and D. Willbold. 2003. Selection of D-amino-acid peptides that bind to Alzheimer's disease amyloid peptide abeta1-42 by mirror image phage display. *Chembiochem* 4 (8):748-753.
- Wiesehan, K., J. Stohr, L. Nagel-Steger, T. van Groen, D. Riesner, and D. Willbold. 2008. Inhibition of cytotoxicity and amyloid fibril formation by a D-amino acid peptide that specifically binds to Alzheimer's disease amyloid peptide. *Protein Eng Des Sel* 21 (4):241-246.
- Wirhth, O., C. Erck, H. Martens, A. Harmeier, C. Geumann, S. Jawhar, S. Kumar, G. Multhaup, J. Walter, M. Ingelsson, M. Degerman-Gunnarsson, H. Kalimo, I. Huitinga, L. Lannfelt, and T. A. Bayer. 2010. Identification of low molecular weight pyroglutamate A{beta} oligomers in Alzheimer disease: a novel tool for therapy and diagnosis. *J Biol Chem* 285 (53):41517-41524.
- Xu, W., T. Kawarabayashi, E. Matsubara, K. Deguchi, T. Murakami, Y. Harigaya, M. Ikeda, M. Amari, R. Kuwano, K. Abe, and M. Shoji. 2008. Plasma antibodies to Abeta40 and Abeta42 in patients with Alzheimer's disease and normal controls. *Brain Res* 1219:169-179.
- Xu, Y., J. Shen, X. Luo, W. Zhu, K. Chen, J. Ma, and H. Jiang. 2005. Conformational transition of amyloid beta-peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (15):5403-5407.
- Zhang, S., K. Iwata, M. J. Lachenmann, J. W. Peng, S. Li, E. R. Stimson, Y. Lu, A. M. Felix, J. E. Maggio, and J. P. Lee. 2000. The Alzheimer's peptide a beta adopts a collapsed coil structure in water. *J Struct Biol* 130 (2-3):130-141.

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schematische Darstellung der fortgeschrittenen Alzheimerschen Pathologie. ....	2
Abbildung 2: Schematische Übersicht der APP-Prozessierung. ....	3
Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung des Aggregationsmechanismus von A $\beta$ . ....	5
Abbildung 4: Schematische Darstellung der aktualisierten Amyloid-Kaskaden-Hypothese. ....	6
Abbildung 5: Chemische Katalyse der Pyroglutamatbildung. ....	8
Abbildung 6: Schematischer Vergleich der aktiven und passiven Immuntherapie. ....	12
Abbildung 7: Schematische Übersicht der Phagendisplayselektion. ....	15
Abbildung 8: Prinzip eines Spiegelbild-Phagendisplay. ....	16
Abbildung 9: Schematische Darstellung der immobilisierten A $\beta$ pE-Peptidepräparationen. ....	27
Abbildung 10: Messung der dynamischen Lichtstreuung von verschiedenen A $\beta$ -Isoformen. ....	34
Abbildung 11: Gelfiltrationschromatogramm von A $\beta$ . ....	37
Abbildung 12: ThT-Aggregationstest zur relativen Quantifizierung des Fibrillengehalts in A $\beta$ -Monomeren, Oligomeren und -Fibrillen. ....	38
Abbildung 13: Dot-Blot-Analysen von A $\beta$ -Monomeren, -Oligomeren und -Fibrillen. ....	39
Abbildung 14: Western-Blot-Analysen von A $\beta$ -Monomeren, -Oligomeren und -Fibrillen. ....	39
Abbildung 15: ELISA zur relativen Quantifizierung von immobilisierten A $\beta$ -Monomeren, -Oligomeren und -Fibrillen. ....	41
Abbildung 16: ELISA zur relativen Quantifizierung der A $\beta$ 1-42-Monomer bindenden Antikörper in humanen Seren verschiedener Patientengruppen. ....	42
Abbildung 17: ELISA zur relativen Quantifizierung der A $\beta$ 1-42-Oligomer bindenden Antikörper in humanen Seren verschiedener Patientengruppen. ....	43
Abbildung 18: ELISA zur relativen Quantifizierung der A $\beta$ 1-42-Fibrillen bindenden Antikörper in humanen Seren verschiedener Patientengruppen. ....	44
Abbildung 19: ELISA zur relativen Quantifizierung der Antikörperbindung an A $\beta$ 1-42-Konformere in humanen Seren der AD-Gruppe. ....	44
Abbildung 20: ELISA zur relativen Quantifizierung der Antikörperbindung an A $\beta$ 1-42-Konformere in murinen Seren vor einer Immunisierung. ....	46
Abbildung 21: ELISA zur relativen Quantifizierung der Antikörperbindung an A $\beta$ 1-42-Konformere in murinen Seren nach der Immunisierung mit AD03. ....	47
Abbildung 22: ELISA zur relativen Quantifizierung der Antikörperbindung an A $\beta$ 1-42-Konformere in murinen Seren nach der Immunisierung mit AD02. ....	48
Abbildung 23: Anreicherungs-ELISA mit Phagen, die gegen A $\beta$ pE ohne Aggregationskeime selektiert wurden. ....	50
Abbildung 24: Anreicherungs-ELISA mit Phagen, die gegen niedermolekulare A $\beta$ pE-Aggregate selektiert wurden. ...	50
Abbildung 25: Anreicherungs-ELISA mit Phagen, die gegen hochmolekulare A $\beta$ pE-Aggregate selektiert wurden. ....	51
Abbildung 26: Einzelphagen-ELISA mit Phagen, die gegen A $\beta$ pE ohne Aggregationskeime selektiert wurden. ....	52
Abbildung 27: Einzelphagen-ELISA mit Phagen, die gegen niedermolekulare A $\beta$ pE-Aggregate selektiert wurden. ....	53
Abbildung 28: Einzelphagen-ELISA mit Phagen, die gegen hochmolekulare A $\beta$ pE-Aggregate selektiert wurden. ....	53
Abbildung 29: Aminosäure-Zusammensetzung der Peptide, die gegen verschiedene A $\beta$ pE-Konformere selektiert wurden. ....	54
Abbildung 30: PepSpot-Analysen zur Bestimmung des Bindeepitops der Fluoreszenz-markierten d-Peptide an A $\beta$ 1-42 und A $\beta$ pE. ....	55
Abbildung 31: Histologische Färbung von Plaques im Kortex von Tg2576-Mäusen mit D4-F, D5-F und Kongorot. ....	57
Abbildung 32: Histologische Färbung von Plaques im Kortex von Tg2576 Mäusen mit D6-F, D7-F und Kongorot. ....	57

---

Abbildung 33: Anreicherungs-ELISA mit Dodekamer-präsentierenden Phagen, die gegen A $\beta$ 1-42 Oligomere selektiert wurden.....	59
Abbildung 34: Anreicherungs-ELISA von Septamer-präsentierenden Phagen, die gegen A $\beta$ 1-42 Oligomere selektiert wurden.....	60
Abbildung 35: Einzelphagen-ELISA mit Septamer-präsentierenden Phagen, die gegen A $\beta$ 1-42 Oligomere selektiert wurden.....	61
Abbildung 36: Einzelphagen-ELISA mit Dodekamer-präsentierenden Phagen, die gegen A $\beta$ 1-42 Oligomere selektiert wurden.....	62
Abbildung 37: Aminosäure-Zusammensetzung der septameren und dodekameren Peptide, die gegen A $\beta$ 1-42 Oligomere selektiert wurden.....	63
Abbildung 38: ELISA zur relativen Quantifizierung der Bindung von DO1-F an verschiedene A $\beta$ 1-42 Konformere.....	64
Abbildung 39: ELISA zur relativen Quantifizierung der Bindung von DO2-F an verschiedene A $\beta$ 1-42 Konformere.....	64
Abbildung 40: ELISA zur relativen Quantifizierung der Bindung von DO3-F an verschiedene A $\beta$ 1-42 Konformere.....	65
Abbildung 41: ThT-Aggregationstest von A $\beta$ 1-42 zur Quantifizierung des relativen Fibrillengehalts in Gegenwart von DO1.....	66
Abbildung 42: ThT-Aggregationstest von A $\beta$ 1-42 zur Quantifizierung des relativen Fibrillengehalts in Gegenwart von DO2.....	67
Abbildung 43: ThT-Aggregationstest von A $\beta$ 1-42 zur Quantifizierung des relativen Fibrillengehalts in Gegenwart von DO3.....	68
Abbildung 44: Messung der dynamischen Lichtstreuung von A $\beta$ 1-42 in Gegenwart von DO3.....	69
Abbildung 45: Schematische Darstellung der möglichen therapeutischen Effekte der AD02-Fibrillen-Bindung.....	79
Abbildung 46: Schema zur potentiellen Modifikation der Aggregation von A $\beta$ durch DO3.....	84
Abbildung 47: Schema zur Immobilisierung verschiedener A $\beta$ - und A $\beta$ pE-Fragmente auf der PepSpot-Membran.....	88
Abbildung 48: ELISA zur Quantifizierung der Bindung von D3-F an verschiedene A $\beta$ 1-42 Konformere.....	89
Abbildung 49: Messung der dynamischen Lichtstreuung von A $\beta$ 1-42 in Gegenwart von DO3.....	90

## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Auflistung der synthetischen A $\beta$ -Peptide.....	19
Tabelle 2: Auflistung der synthetischen D-Peptide.....	19
Tabelle 3: Auflistung der Puffer.....	20
Tabelle 4: Auflistung der Medien.....	20
Tabelle 5: Auflistung der Kits.....	21
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Antikörper.....	21
Tabelle 7: Übersicht der murinen Seren.....	22
Tabelle 8: Übersicht der humanen Seren.....	22

## DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich Prof. Dr. Dieter Willbold für die Bereitstellung des sehr abwechslungsreichen und aktuellen Themas, für die ausgezeichneten und angenehmen Arbeitsbedingungen in seinem Institut und für seine freundliche und fördernde Art danken. Es ist mir eine Freude, ihn meinen Doktorvater nennen zu dürfen.

Prof. Dr. Christine Rose danke ich ganz herzlich für die Übernahme des Korreferats.

Dr. Susanne Aileen Funke danke ich insbesondere für ihre fundierte Betreuung und Unterstützung, ihre herzliche und hilfsbereite Art und die vielen anregenden Diskussionen sowohl fachlicher als auch privater Natur.

Dr. Dirk Bartnik, Lei Wang-Dietrich, Ellen Kammula und all meinen anderen Doktorschwestern und -brüdern danke ich für die wissenschaftliche Kollegialität und den privaten Beistand im und jenseits vom Laboralltag.

Dem gesamten Institut für Strukturbiochemie bin ich für die vielen helfenden Hände zu großem Dank verpflichtet. Die ausgesprochen freundliche Arbeitsatmosphäre und gute Organisation im Labor sind einmalig gewesen und haben maßgeblich zur Entstehung dieser Dissertation beigetragen.

Der Probiodrug AG und Dr. Dagmar Schlenzig sowie Dr. Martin Kleinschmidt im Besonderen danke ich für die Bereitstellung der zahlreichen Peptide und die hilfreichen Diskussionen im Rahmen unserer Zusammenarbeit.

Dr. Markus Mandler und Prof. Dr. Achim Schneeberger von der AFFIRIS AG danke ich für die ausgesprochen angenehme Kooperation und die Bereitstellung wertvoller Materialien.

Prof. Dr. Carsten Korth und Dr. Andreas Müller-Schiffmann bin ich ebenfalls für die schnelle und unkomplizierte Mitarbeit zu Dank verpflichtet

Meiner kleinen Schwester Yesim Çınar danke ich dafür, dass sie mich wieder daran erinnert hat, wie interessant die Forschung sein kann.

Mein größter Dank aber gilt meinen Eltern Ali und Şehriban Çınar, ohne deren liebevolle und aufopfernde Art ich es niemals bis hierher geschafft hätte. Die größte Freude dieser Doktorarbeit bereitet mir die Tatsache, dass ich sie stolz machen kann. Sizi çok seviyorum ve sizsiz bunları hiç başaramazdım!

## **EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Hiermit versichere ich, dass ich meine Dissertation ohne Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Jülich, den

---

(Yeliz Çınar)