

**„Evaluation von D-enantiomeren Peptiden als
mögliche Wirkstoffkandidaten in einem
Alzheimer-Mausmodell“**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Tina Dunkelmann
aus Kühlungsborn

Düsseldorf, Juni 2015

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. Karl-Josef Langen

Tag der mündlichen Prüfung: 07.07.2015

Das Vergnügen des Unwissens ist auf seine Weise genauso groß wie das Vergnügen des Wissens.

Aldous Huxley

I Inhaltsverzeichnis

I Inhaltsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1 Alzheimer-Demenz	1
1.1.1 Die familiäre und die sporadische Alzheimer-Demenz	2
1.1.2 Der klinische Verlauf der Alzheimer-Demenz	3
1.1.3 Neuropathologie	3
1.2 Das β -Amyloid-Protein	5
1.2.1 Amyloid-(Kaskaden)-Hypothese	5
1.2.2 Prozessierung des Amyloid-Vorläufer-Proteins zu A β	7
1.2.3 Pyroglutamat-modifiziertes A β	9
1.2.3.1 Die Bildung des pEA β (3-42)	10
1.2.3.2 Die Bedeutung von pEA β (3-42) in der AD	11
1.3 Das TBA2.1-Mausmodell	12
1.4 Therapeutische Ansätze der Alzheimer-Demenz	14
1.5 D3 und D3D3 als potentielle Wirkstoffkandidaten	16
2. Zielstellung der Arbeit	18
3. Material und Methoden	20
3.1 Material	20
3.1.1 Materialien für die Tierhaltung	20
3.1.2 Verhaltenstestapparaturen und Zubehör	20
3.1.3 Laborgeräte	21
3.1.4 Labormaterialien	24
3.1.5 Chemikalien	26
3.1.6 Puffer und Lösungen	29
3.1.7 Kits	30
3.1.8 Oligonukleotide	31
3.1.9 D-enantiomere Peptide	32
3.1.10 Antikörper	32
3.1.11 Software und Datenbanken	33
3.2 Methoden	35

3.2.1 TBA2.1-Mausmodell.....	35
3.2.1.1 Tierhaltung	35
3.2.1.2 Genotypisierung	37
3.2.1.2.1 DNA-Isolation	38
3.2.1.2.2 Polymerase-Kettenreaktion	38
3.2.1.2.3 Agarose-Gelelektrophorese	40
3.2.2 Verhaltensanalysen	41
3.2.2.1 Primäre Untersuchung (SHIRPA-Test)	42
3.2.2.2 Beschleunigender Rotarod-Test.....	42
3.2.2.3 Greifstärke-Test	43
3.2.2.4 Modifizierter Stabtest	44
3.2.3 Quantifizierung von pEA β (3-42) und Immunfluoreszenzanalyse von A β im Gehirn	44
3.2.3.1.1 Organpräparation	44
3.2.3.1.2 Aufarbeitung des Gewebes zur Anfertigung von Kryoschnitten	45
3.2.3.1.3 Immunfluoreszenzbasierende Darstellung und Quantifizierung von A β	45
3.2.3.1.4 A β -Extraktion	46
3.2.3.1.5 Analyse der Proteinkonzentration	47
3.2.3.1.6 Enzyme-linked immunosorbent assay.....	48
3.2.4 Intraperitoneale Behandlung der TBA2.1-Mäuse mit D-enantiomeren Peptiden.....	49
3.2.5 Statistische Analyse	49
4. Ergebnisse	51
4.1 Charakterisierung des TBA2.1-Mausmodells.....	51
4.1.1 Verhaltensanalysen des Phänotyps	51
4.1.1.1 Primäre Untersuchung des SHIRPA-Tests	52
4.1.1.1.1 Panelstudie	52
4.1.1.1.2 Trendstudie	53
4.1.1.2 Beschleunigter Rotarod-Test	55
4.1.1.2.1 Panelstudie	55
4.1.1.2.2 Trendstudie	57
4.1.1.3 Greifstärke-Test	60
4.1.1.4 Modifizierter Stabtest	61

4.1.2 Analyse der Amyloid-Pathologie.....	62
4.1.2.1 Immunfluoreszenz der amyloiden Ablagerungen	62
4.1.2.2 Biochemische Quantifizierung von pEA β (3-42) in TBA2.1-Gehirnen .	64
4.2 Intrapertoneale Behandlung mit D3 und D3D3	65
4.2.1 Einfluss der D-Peptide D3 und D3D3 auf den Phänotyp der TBA2.1	66
4.2.2 Einfluss der D-Peptide D3 und D3D3 auf die motorische Koordination	68
4.2.3 Einfluss der D-Peptide D3 und D3D3 auf die A β -Ablagerungen	69
4.2.4 Einfluss der D-Peptide D3 und D3D3 auf die pEA β (3-42)- Konzentration.....	70
5. Diskussion	72
5.1 Charakterisierung der TBA2.1	73
5.1.1 Makroskopische Beobachtungen homozygoter TBA2.1-Mäuse	73
5.1.2 Motorik der homozygoten TBA2.1-Mäuse	75
5.1.3 Phänotyp der heterozygoten TBA2.1	79
5.1.4 Korrelation der makroskopischen Beobachtung mit der motorischen Koordination	79
5.1.5 Pathologie der homozygoten TBA2.1-Mäuse	81
5.1.6 Gesamtdiskussion des Phänotyps transgener TBA2.1	83
5.2 D3 und D3D3 als potentielle Wirkstoffe zur Therapie.....	85
6. Zusammenfassung	90
7. Summary	92
II Literaturverzeichnis	93
III Abkürzungsverzeichnis	105
IV Abbildungsverzeichnis	107
VI Tabellenverzeichnis.....	108
VII Anhang	109
1. Eidstattliche Erklärung.....	109
2. Ein-Buchstaben-Aminosäure-Code	110
VIII Danksagung	111

1. Einleitung

1.1 Alzheimer-Demenz

Die Alzheimer-Demenz (AD) ist die häufigste neurodegenerative Erkrankung der älter werdenden Gesellschaft und betrifft mehr als die Hälfte der Demenzfälle (siehe Abbildung 1), (Clarfield 2003, Finder und Glockshuber 2007). Im Krankheitsverlauf der AD wird zunehmend das Kurzzeit- und das Langzeitgedächtnis beeinträchtigt (MacDuffie, Atkins *et al.* 2012). Außerdem entwickeln sich Einschränkungen der Sprache und Veränderungen der Persönlichkeit des Menschen (LaFerla, Green *et al.* 2007, Mucke 2009).

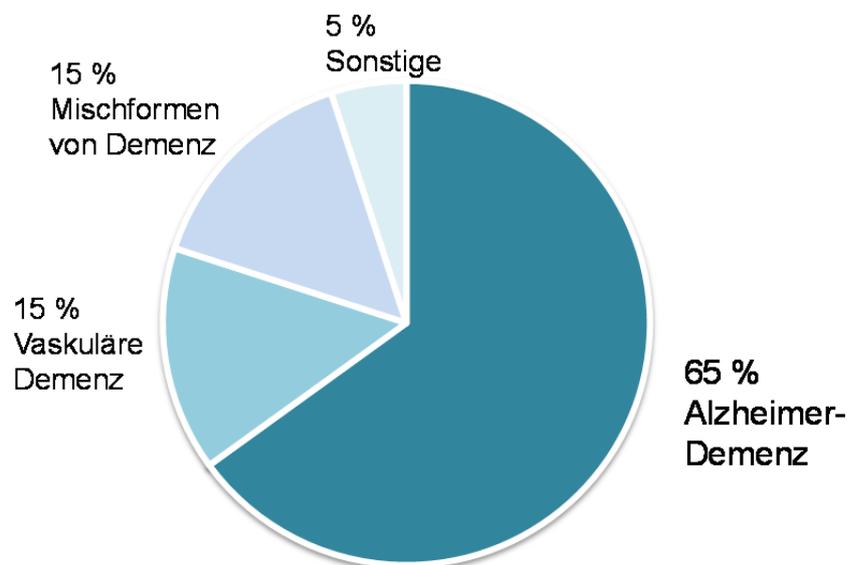


Abbildung 1: Prozentuale Darstellung der Demenz-Krankheiten Alzheimer-Demenz ist die häufigste Form der Demenz, gefolgt von Vaskulärer Demenz und Mischformen von Demenz nach (Sütterlin, Hoßmann *et al.* 2011).

Im Jahr 2006 lag die Prävalenz weltweit bei mehr als 26,6 Millionen Menschen. Die Tendenz ist aufgrund der älter werdenden Gesellschaft weiter steigend. Für das Jahr 2050 wird eine Prävalenz von über 106 Millionen prognostiziert (Brookmeyer, Johnson *et al.* 2007, Leal und Yassa 2013). Dadurch ergibt sich nicht nur ein gesteigertes gesundheitliches, sondern auch ein gesteigertes wirtschaftliches Interesse. Allein für Europa wurden für das Jahr 2008 die

Gesundheitskosten für Demenzkranke auf 177 Milliarden Euros geschätzt (Wimo, Jonsson *et al.* 2011). Daher ist die weitere Forschung zum grundlegenden Verständnis und zur Heilung der Alzheimer-Demenz ein unsagbar wichtiges Gebiet. Im folgenden Kapitel werden die zwei Formen der Alzheimer-Demenz, der klinische Verlauf und die neuropathologischen Merkmale näher erörtert.

1.1.1 Die familiäre und die sporadische Alzheimer-Demenz

Im Allgemeinen lässt sich die AD in eine familiäre und eine sporadische AD untergliedern (Eckert, Marques *et al.* 2003). Die familiäre AD betrifft weniger als 1 % der AD-Patienten und wird durch genetische Mutationen hervorgerufen. Aus diesem Grund tritt sie nur in verschiedenen, einzelnen Familien auf (Blennow, de Leon *et al.* 2006). Weiterhin lässt sich die familiäre AD in eine früh auftretende und eine spät auftretende Form unterteilen (Woo, Baik *et al.* 2011). Die ersten Symptome der früh auftretenden Form treten zwischen dem 30. und dem 65. Lebensjahr auf. Bei Patienten der spät auftretenden Form und der sporadischen AD werden die ersten Symptome erst ab dem 65. Lebensjahr festgestellt (Piaceri, Nacmias *et al.* 2013).

Im Gegensatz zu der familiären AD kann für die sporadische AD noch keine eindeutige Ursache bestimmt werden. Aktuelle Forschungen gehen davon aus, dass es sich bei der sporadischen AD nicht um nur eine Ursache handelt, sondern dass die sporadische AD eine multifaktorielle Krankheit ist (Iqbal und Grundke-Iqbal 2010, Morris, Honea *et al.* 2014). Dazu gehören unter anderem der Einfluss durch genetische Faktoren, vaskuläre Veränderungen, den Lebenswandel oder durch Stoffwechselerkrankungen (Imtiaz, Tolppanen *et al.* 2014, Reitz und Mayeux 2014). Als größter Risikofaktor wurde das Lebensalter identifiziert (Keller 2006). Im Alterungsprozess verlieren die Zellen ihre Plastizität, wodurch die Anpassungsfähigkeit der Zellen an zum Beispiel oxidativen Stress oder an einen gestörten Energiemetabolismus nur noch eingeschränkt vorhanden ist. Diese Veränderungen wirken zusätzlich auf die Neuronen und fördern somit den neurodegenerativen Prozess (Riddle, Sonntag *et al.* 2003, Fjell, McEvoy *et al.* 2014, Sykora, Misiak *et al.* 2015).

1.1.2 Der klinische Verlauf der Alzheimer-Demenz

Der klinische Verlauf der AD besteht aus den drei folgenden Stadien: die präklinische AD, das Stadium der leichten kognitiven Beeinträchtigungen und das Stadium der Demenz. In der präklinischen AD sind noch keine Symptome vorhanden, allerdings sind Veränderungen, wie z.B. erste Ablagerungen des β -Amyloid-Proteins und/oder des Tau-Proteins (siehe 1.1.3), in der Zerebrospinalflüssigkeit (CSF) oder im Gehirn bereits messbar (Budson und Solomon 2012, Sperling und Johnson 2013, Riedel 2014). Aktuelle Berichte deuten darauf hin, dass diese Veränderungen wahrscheinlich mehr als 20 Jahre vor den ersten Symptomen auftreten. Allerdings konnte bisher noch kein diagnostischer Test dazu entwickelt werden (Bateman, Xiong *et al.* 2012, Thies und Bleiler 2013). In dem Stadium der leichten kognitiven Beeinträchtigung werden die ersten Veränderungen des Denkvermögens wahrgenommen (Albert 2011). Aber nicht jeder Patient, der an einer leichten kognitiven Beeinträchtigung leidet, entwickelt eine Demenz. Im Stadium der Demenz vermindern sich die Gedächtnisfunktion, das Denkvermögen und die Bewältigung des Alltags (Roberts und Knopman 2013). Die daraus resultierenden physischen Beeinträchtigungen, Mangelernährung und eine verringerte Immunantwort begünstigen das Eindringen von schwerwiegenden Infektionen, die zum Tode führen können. Die häufigste Todesursache der AD-Patienten ist die Pneumonie (Kalia 2003).

Bislang kann die klinische Diagnose der AD nur lange nach Ausbruch der Krankheit erfolgen. Nach Diagnosestellung beträgt die Lebenserwartung noch ungefähr drei bis neun Jahre bis zum Tod des Patienten. Eine zweifelsfreie Bestätigung der Krankheit ist zum bisherigen Kenntnisstand nur *post mortem* möglich (Hampel, Prvulovic *et al.* 2011, Ridge, Ebbert *et al.* 2013).

1.1.3 Neuropathologie

Ein makroskopisches Merkmal in den Gehirnen von Demenzerkrankten ist die zerebrale Atrophie, die in der AD im Hippokampus und im Kortex präsent ist (Abbildung 2, links). Im Vergleich zum gesunden, alternden Menschen ist die

zerebrale Atrophierate der AD-Patienten um das sechsfache erhöht (Fox, Cousins *et al.* 2000, Fotuhi, Hachinski *et al.* 2009). Daraus wird deutlich, welchem Ausmaß an neurodegenerativen Prozessen das Gehirn der AD-Patienten ausgesetzt ist.

In der mikroskopischen Analyse treten in der Pathogenese der AD zwei spezifische, abnorme Proteinstrukturen auf, die beide aus stark unlöslichen und dicht gepackten Filamenten aufgebaut sind. Dabei handelt es sich um senile Plaques und neurofibrilläre Bündel, siehe Abbildung 2, rechts (Bloom 2014). Die senilen Plaques sind extrazelluläre Aggregate des β -Amyloid-Proteins. Die neurofibrillären Bündel („neurofibrillary tangles“, NFTs) bestehen aus einer hyperphosphorylierten Form des Tau-Proteins im Zytoskelett der Neuronen (Balin und Hudson 2014). Die Anreicherung beider Proteine beginnt im entorhinalen Kortex und im Hippokampus. Im weiteren Verlauf der Krankheit breiten sich die senilen Plaques und die NFTs in den frontalen, in den parietalen und in den frontal assoziierten Kortex aus. Die ersten Läsionen entstehen zuerst im Hippokampus und im Assoziationskortex, da die dafür zuständigen Neurone nur wenig myelinisiert und somit leicht vulnerabel sind. Diese Bereiche sind für das Gedächtnis und das Lernen verantwortlich. Die stark myelinisierten Neurone hingegen sind erst im Endstadium der AD betroffen (Braak, Del Tredici *et al.* 2000, Bartzokis 2004, Jahn 2013).

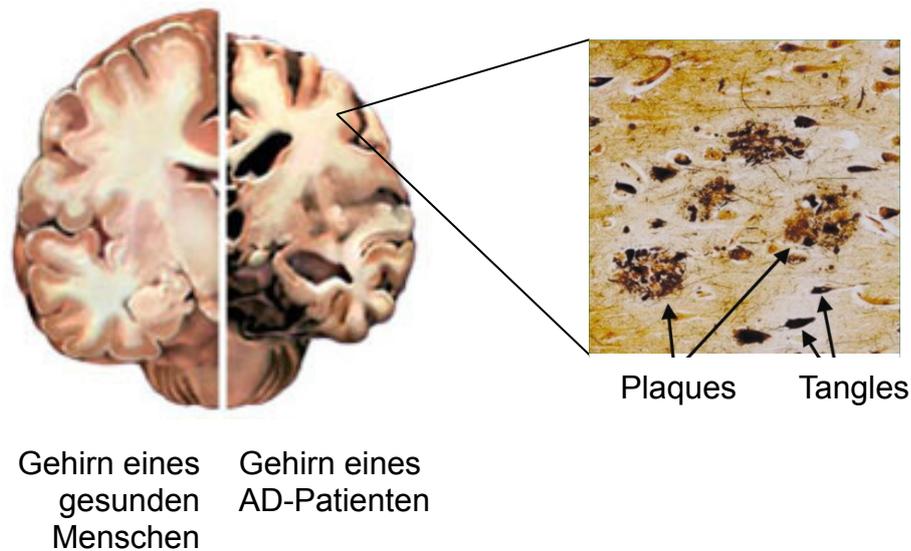


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Pathologie der AD. In der Abbildung ist das Gehirn eines AD-Patienten im Vergleich zu einem gesunden Menschen dargestellt. Das AD-Gehirn ist durch zerebrale Atrophie und durch Protein-Ablagerungen gekennzeichnet. Die senilen Plaques sind als hellbraune, extrazelluläre Aggregate und die neurofibrillären Bündel als dunkelfarbene, intrazelluläre Anreicherung dargestellt, abgeändert nach (Blennow, de Leon *et al.* 2006) und www.alz.org.

1.2 Das β -Amyloid-Protein

Das β -Amyloid-Protein ($A\beta$) trägt einen wichtigen Teil zur Pathogenese der Alzheimer-Demenz bei. Aus diesem Grund soll im folgenden Abschnitt die Amyloid-(Kaskaden)-Hypothese, die Prozessierung des Amyloid-Vorläufer-Proteins und eine besondere Isoform von $A\beta$, das Pyroglutamat-modifizierte $A\beta(3-42)$, beleuchtet werden.

1.2.1 Amyloid-(Kaskaden)-Hypothese

Die Pathogenese der AD ist ein vielseitig diskutiertes Gebiet und bis heute noch nicht eindeutig geklärt. Eine der einflussreichsten Hypothesen Endes des 20. Jahrhunderts war die Amyloid-Kaskaden-Hypothese. In dieser Hypothese wurden die senilen Plaques als erste Läsion und somit als der Ursprung der Pathogenese der sporadischen AD erachtet. Als nachfolgende und daraus resultierende Ergebnisse wurden NFTs, degenerierte Neurone, vaskuläre

Veränderungen und letztendlich die Demenz angesehen (Hardy und Higgins 1992). Seit ihrer Aufstellung wurde die Amyloid-Kaskaden-Hypothese weiter zur „Amyloid-Hypothese“ modifiziert, da spätere Erkenntnisse eine lineare Beziehung zwischen der Demenz und der Anhäufung der senilen Plaques nicht eindeutig belegen konnten (Klein 2002, Karran, Mercken *et al.* 2011). In der Amyloid-Hypothese werden die Oligomere von A β , auch als A β abgeleitete, diffusionsfähige Liganden bezeichnet, als Auslöser der Kaskade definiert (Haass und Selkoe 2007). Oligomere bilden eine Zwischenstufe in der Aggregation von Plaques. Dabei lagern sich A β -Monomere über weitere Zwischenstufen zu Oligomeren zusammen, welche sich über weitere Zwischenstufen zu Fibrillen akkumulieren. Mehrere Bündel von Fibrillen bilden letztendlich die senilen Plaques (Haass und Selkoe 2007, Klyubin, Cullen *et al.* 2012). Die Oligomere sind im Gegensatz zu den senilen Plaques als toxische Spezies erkannt worden. Eine Spezies von A β , die ein hohes Aggregationspotential zu Oligomeren aufweist, ist A β (1-42), auf die in späteren Abschnitten weiter eingegangen wird (Lue, Kuo *et al.* 1999). Es ist nachgewiesen worden, dass die Oligomere die Funktion der Synapsen durch die Inhibierung der hippokampalen Langzeit-Potenzierung beeinträchtigen, die einen entscheidenden Einfluss auf das Erinnerungsvermögen ausübt (Lambert, Barlow *et al.* 1998, Walsh, Klyubin *et al.* 2002, Haass und Selkoe 2007). Im weiteren Verlauf der Kaskade werden die senilen Plaques und auch lokale Entzündungsreaktionen als nachfolgende Ereignisse erachtet. Diese Ereignisse verstärken wiederum die synaptische und auch die neuronale Dysfunktion. Oxidativer Stress und ein gestörter Ionenhaushalt sind die Folge. Dies beeinträchtigt auch das Tau-Protein und es entstehen NFTs. Die Störung der Homöostase und das weiter daraus resultierende Sterben der Neuronen setzen sich weiter im Gehirn fort. Als Konsequenz folgt das Stadium der Demenz, siehe auch Abbildung 3 (Haass und Selkoe 2007). Auch wenn diese Hypothese bislang nicht zweifelsfrei bewiesen werden konnte, ist sie allgemein anerkannt worden (Morris, Clark *et al.* 2014, Rosenblum 2014).

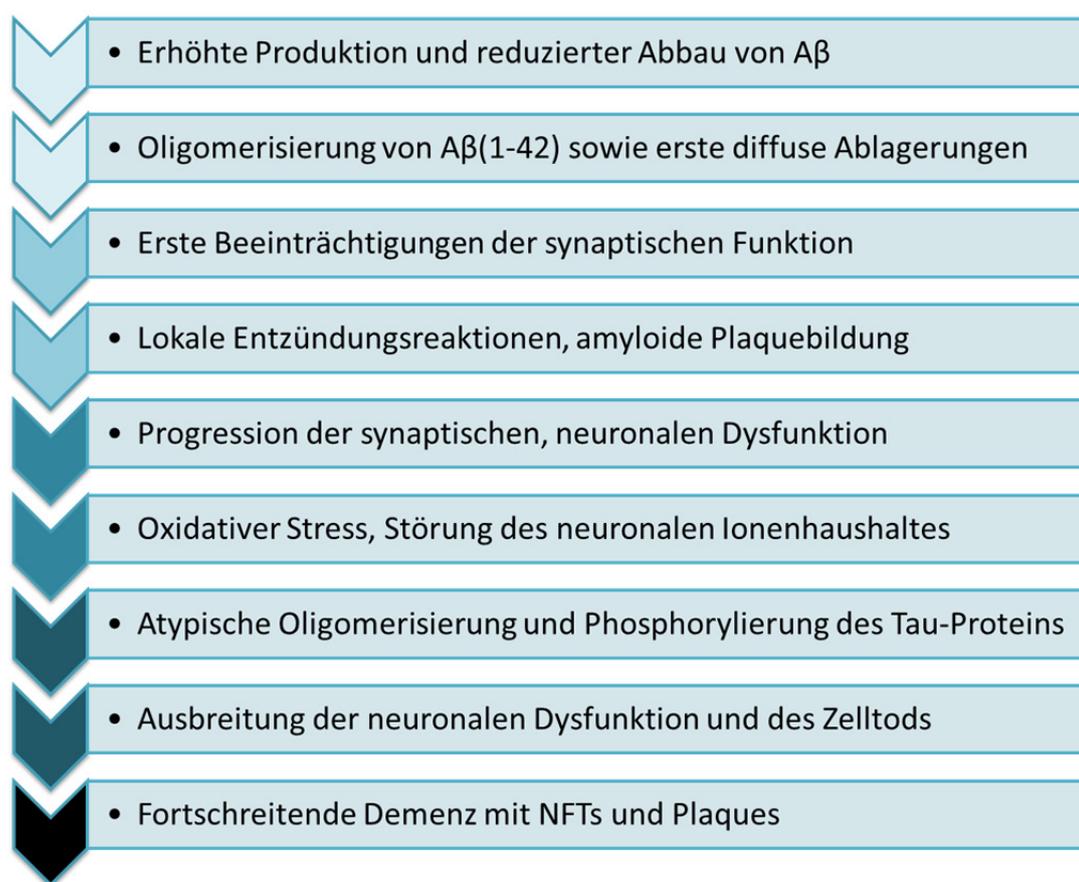


Abbildung 3: Amyloid-Hypothese. Die Amyloid-Hypothese beschreibt die Oligomerisierung von A β (1-42) als Auslöser der synaptischen Dysfunktionen, wodurch eine Kaskade an Neuronen schädigenden Ereignissen in Gang gesetzt wird, die letztendlich zur Demenz mit NFTs und Plaques führt, nach (Haass und Selkoe 2007).

1.2.2 Prozessierung des Amyloid-Vorläufer-Proteins zu A β

A β entsteht durch die Prozessierung des Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP), einem Typ I Transmembran-Glykoprotein. Die physiologische Funktion von APP konnte bisher noch nicht eindeutig identifiziert werden. Es wird aber diskutiert, ob APP als Rezeptor für einen Liganden oder als Wachstumsfaktor agieren könnte (O'Brien und Wong 2011, Dawkins und Small 2014). Tatsache wiederum ist, dass APP sowohl in neuronalen als auch nicht-neuronalen Zellen ubiquitär exprimiert wird (Muller und Zheng 2012).

Die Proteolyse von APP kann über den nicht-amyloidogenen und über den amyloidogenen Weg erfolgen. Im nicht-amyloidogenen Weg wird APP durch eine

α -Sekretase (z. B. ADAM9, ADAM10, ADAM17 und weitere) oder durch eine β -Sekretase innerhalb der A β -Region geschnitten, so dass kein A β gebildet werden kann. Die entstandenen Produkte sind das C-terminale Fragment 83 (C83) und die lösliche N-terminale Ektodomäne, sAPP α . Während A β aus dem amyloidogenen Weg neurotoxisch wirkt, besitzt hingegen sAPP α eine neuroprotektive Funktion. C83 kann durch die γ -Sekretase noch in die intrazelluläre Domäne von APP (AICD) und das lösliche P3 gespalten werden (Zheng und Koo 2006, Zhou, Chan *et al.* 2011, Claeysen, Cochet *et al.* 2012, Zhang, Ma *et al.* 2012).

Der pathogene Weg ist der amyloidogene Weg, über den das ungefähr 4 kDa große A β freigesetzt wird (siehe Abbildung 4). Dafür verantwortlich sind zwei Aspartyl-Proteasen: eine β -Sekretase, auch β -site APP cleaving enzyme (BACE-1) genannt, und die γ -Sekretase. Die β -Sekretase durchspannt die Membran und besitzt ihr aktives Zentrum im Lumen. Das katalytische Zentrum der γ -Sekretase besteht aus dem Heterodimer Präsenilin-1 und -2 (PS1 und PS2) sowie aus drei Membranproteinen (Nicastrin, Stabilisationsfaktor Aph-1 und dem Präsenilin-Verstärker Pen-2) (Zhang, Thompson *et al.* 2011, Reitz und Mayeux 2014). Im amyloidogenen Weg zu A β schneidet zuerst die β -Sekretase an Position 671 von APP. Dabei entsteht ein großes, lösliches N-terminales Fragment (sAPP β) und das 99 Aminosäuren lange C-terminale Fragment (C99-Fragment). Das C99-Fragment wird im Anschluss durch die γ -Sekretase zwischen der 38. und 43. Aminosäure geschnitten. Es werden die intrazelluläre Domäne von APP (AICD) und das monomere A β frei (Rajendran und Annaert, Sathya, Premkumar *et al.* 2012).

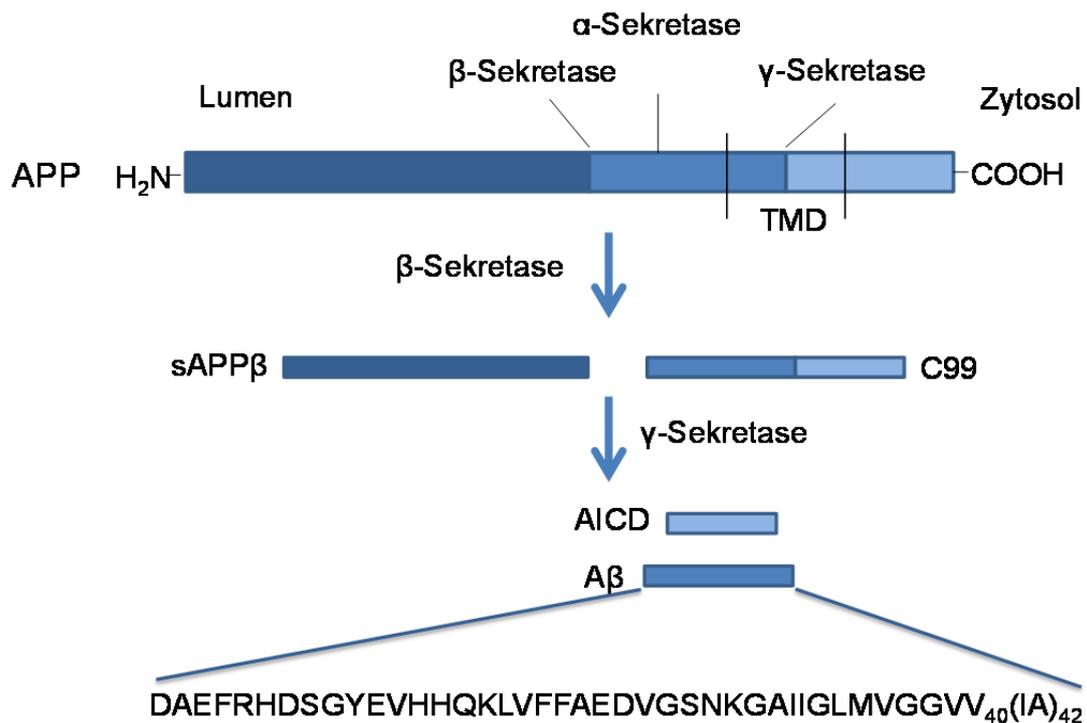


Abbildung 4: Proteolytische Spaltung von APP zu Aβ. APP kann über den nicht-amyloidogenen Weg und den amyloidogenen Weg prozessiert werden. Im nicht-amyloidogenen Weg schneidet die α-Sekretase innerhalb der Aβ-Region, so dass kein Aβ prozessiert wird. Im amyloidogenen Weg bewirkt die Proteolyse durch die β- und die γ-Sekretase die Freisetzung von Aβ. Die Aminosäuresequenz von Aβ₁₋₄₀ bzw. Aβ₁₋₄₂ ist unten dargestellt, nach (Kumar-Singh 2009, Bekris, Yu *et al.* 2010).

1.2.3 Pyroglutamat-modifiziertes Aβ

In den Gehirnen von sporadischen und familiären Alzheimer-Patienten wurden verschiedene Isoformen von Aβ identifiziert, die sich aufgrund der multiplen Schnittstellen der γ-Sekretase oder durch posttranslationale Modifikationen voneinander unterscheiden. Die am häufigsten vorkommenden Isoformen sind Aβ₁₋₄₂, Aβ₄₋₄₂, Aβ₁₋₄₀ und das Pyroglutamat-modifizierte Aβ₃₋₄₂ (pEAβ₃₋₄₂) (Portelius, Bogdanovic *et al.* 2010, Kumar und Walter 2011, Rajendran und Annaert 2012). Das pEAβ₃₋₄₂ spielt in der AD eine besondere Rolle, da es die Aggregationsbildung von Aβ nachweislich verstärkt. Aus diesem

Grund wird im folgenden Abschnitt die Bildung und die Bedeutung des pEA β (3-42) ausführlicher ergründet.

1.2.3.1 Die Bildung des pEA β (3-42)

Der Ausgangspunkt für die Bildung des pEA β (3-42) ist das A β (1-42) (Sequenz siehe Abbildung 4), das am N-Terminus um zwei Aminosäuren zu A β (3-42) gekürzt wird. Der Mechanismus, der die N-terminale Verkürzung bewirkt, ist noch unklar. Denkbar wäre die Entstehung in der Prozessierung von APP oder die post-translationelle Modifikation durch Aminopeptidasen. Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass das A β -degradierende Enzym Neprilysin neben anderen Schnittstellen auch zwischen Position 2 und 3 schneidet (Leissring, Lu *et al.* 2003). Ein weiterer Mechanismus könnte dem Einwirken von reaktiven Sauerstoffspezies zugrunde liegen, welches zur Oxidation und schließlich zur Spaltung der Peptidbindung führen könnte (Kowalik-Jankowska, Ruta *et al.* 2004).

Im nächsten Schritt wird A β (3-42) an Position 3 zu Pyroglutamat modifiziert. Diese Reaktion kann entweder aus der Aminosäure Glutamat (E) oder der Aminosäure Glutamin (Q) hervor gehen (Schilling, Hoffmann *et al.* 2004, Cynis, Schilling *et al.* 2006). Das Glutamat wird mit Hilfe der Glutaminylyklase unter Wasserabspaltung zu pEA β (3-42) zyklisiert, siehe Abbildung 5A (Schilling, Hoffmann *et al.* 2004, Schilling, Appl *et al.* 2008). Unter Abspaltung von Ammoniak erfolgt die Modifizierung des Glutamins entweder ebenfalls durch die Glutaminylyklase oder durch eine spontane, chemische Reaktion, siehe Abbildung 5B (Cynis, Schilling *et al.* 2006, Jawhar, Wirths *et al.* 2011).

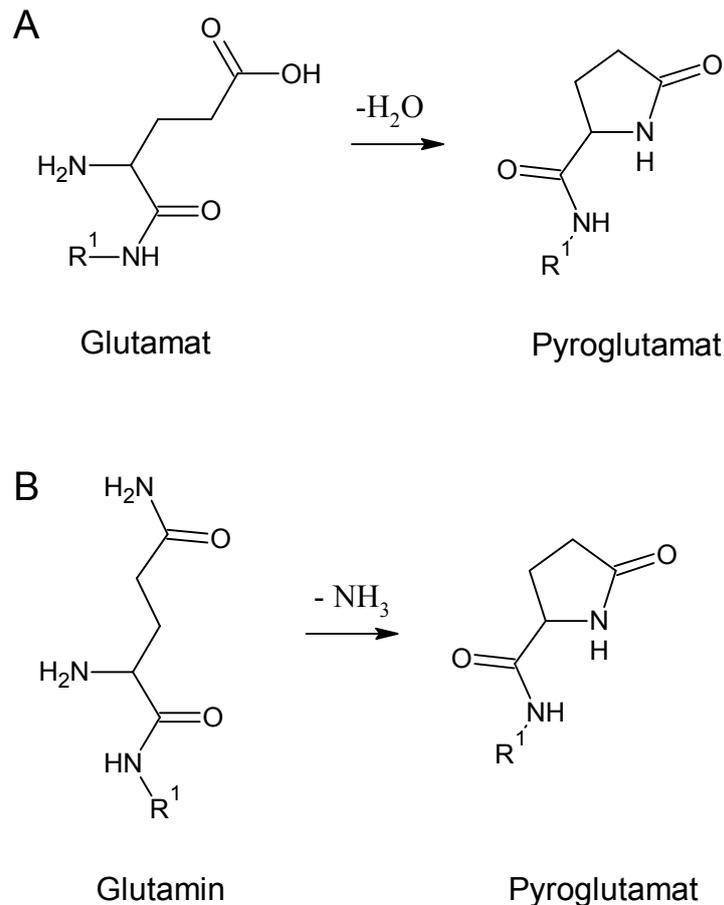


Abbildung 5: Bildung des Pyroglutamats aus Glutamat oder Glutamin. Glutamat (A) und Glutamin (B) sind Ausgangsprodukte für die Zyklisierung zu Pyroglutamat, nach (Wirths, Breyhan *et al.* 2009)

1.2.3.2 Die Bedeutung von pEA β (3-42) in der AD

Das pEA β (3-42) besitzt in der AD eine besondere Rolle, da es einen entscheidenden Einfluss auf die Bildung der A β -Aggregation hat. Es konnte gezeigt werden, dass pEA β (3-42) ein Bestandteil diffuser Plaques ist, die der Bildung der senilen Plaques voraus gehen. Damit wird die Akkumulierung von pEA β (3-42) als eines der ersten Ereignisse in der Aggregation von A β deutlich (Saido, Iwatsubo *et al.* 1995). Die Aggregation von pEA β (3-42) findet bis zu 250-mal schneller als die von A β (1-42) statt, wodurch sich das Gleichgewicht zwischen den Monomeren und Oligomeren in Richtung der Oligomere verschiebt

(Schilling, Lauber *et al.* 2006, Nussbaum, Schilling *et al.* 2012). Diese verstärkte Oligomerisierung resultiert in einer erhöhten Toxizität. Bereits eine Konzentration von 1 μ M oligomeren pEA β (3-42) beeinträchtigt die Zellviabilität von wildtypischen Neuronen und Gliazellen nachweislich, wohingegen oligomeres A β (1-42) in gleicher Konzentration keinen signifikanten Einfluss auf die Zellviabilität hat. Erst eine Ko-Oligomerisierung mit 5 % pEA β (3-42) in 95 % A β (1-42) bewirkt eine erhöhte Toxizität und führt zu meta-stabilen, hybriden Oligomeren, die bei einer getrennten Oligomerisierung nicht auftreten (Nussbaum, Schilling *et al.* 2012). Zusätzlich ist bestätigt worden, dass pEA β (3-42) eine erhöhte Resistenz gegenüber Proteasen im Vergleich zu A β (1-42) aufweist (Russo, Violani *et al.* 2002).

Aufgrund dieser und weiterer, ähnlicher Ergebnisse wird pEA β (3-42) eine initiale Rolle in der A β -Aggregation zugesprochen, die bereits auch mit der Aktivität von Prionen verglichen wurde (Russo, Violani *et al.* 2002, Schilling, Appl *et al.* 2008, Nussbaum, Schilling *et al.* 2012, Bayer und Wirths 2014). Neben dem Einfluss auf die Aggregation von A β , ist auch eine Beeinträchtigung der Kognition durch Inhibierung der hippokampalen Langzeitpotenzierung durch pEA β (3-42) nachweisbar (Schlenzig, Ronicke *et al.* 2012).

Die gesteigerte Aggregation und Initiierung zur Bildung von toxischen Oligomeren sowie die Inhibierung der Langzeitpotenzierung stellen pEA β (3-42) als ein potentiell Zielmolekül zur weiteren Erforschung der Krankheit und zur Anwendung in der Therapie dar. Das in dieser Arbeit genutzte pEA β (3-42)-tragende *In-vivo*-Modell ist das TBA2.1-Mausmodell, das im folgenden Abschnitt ausführlicher behandelt wird.

1.3 Das TBA2.1-Mausmodell

Das TBA2.1-Mausmodell ist ein transgenes Modell zur Untersuchung von pEA β (3-42) in der AD, siehe auch 1.2.3. In den hetero- und homozygoten TBA2.1-Mäusen wird das unzyklisierte, humane A β (Q3-42) im Hintergrund C57BL/6 x DBA1 exprimiert, das post-translational zu pEA β (3-42) modifiziert wird. Als Ausgangspunkt wird an Position 3 der A β -Sequenz Glutamin für die Reaktion zu Pyroglutamat genutzt, da es ein einfacheres Substrat für die

Glutaminylzyklase darstellt und zusätzlich spontan zu pEA β (3-42) reagieren kann (Jawhar, Wirths *et al.* 2011). Für die transgene Expression des A β Q(3-42) wird eine Expressionskassette genutzt, in der die kodierenden Sequenzen des Vorläuferhormons des Thyreoliberins an die Sequenz von A β (Q3-42) gekoppelt ist. Dadurch ist es möglich, dass die Freisetzung von A β (Q3-42) über den sekretorischen Signalweg erfolgt. Der THY1-Promotor bewirkt eine neuronenspezifische Expression, siehe auch Abbildung 6 (Wirths, Breyhan *et al.* 2009, Alexandru, Jagla *et al.* 2011).

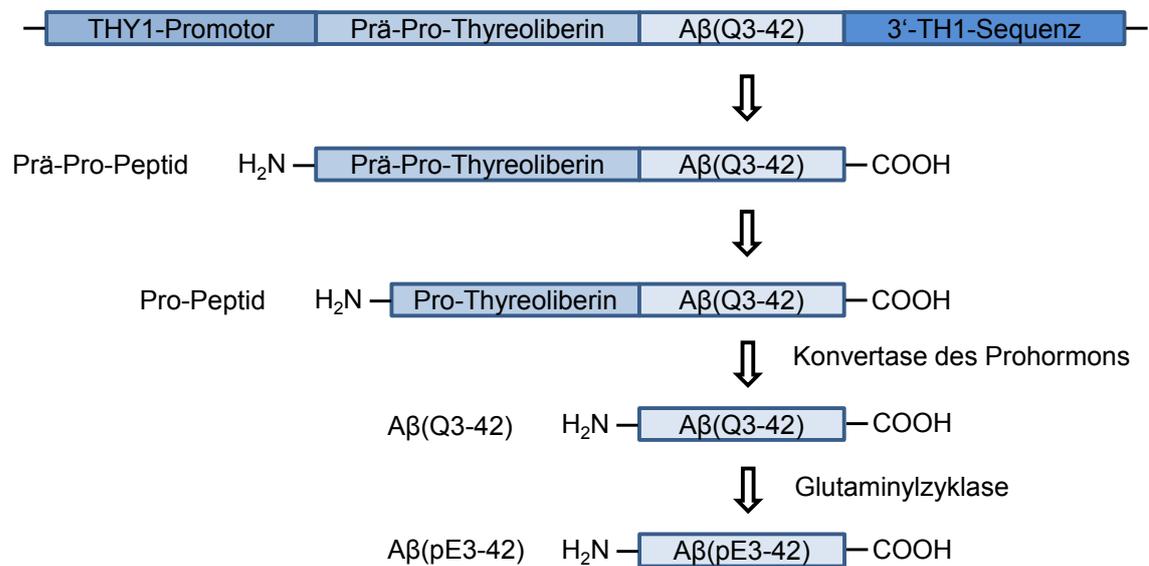


Abbildung 6: Transgenkonstrukt des TBA2.1-Mausmodells. In dieser Expressionskassette ist das A β (Q3-42) am N-Terminus mit der kodierenden Sequenz des Vorläuferhormons des Thyreoliberins, dem Prä-Pro-Thyreoliberin, gekoppelt. Das Pro-Thyreoliberin wird durch eine Konvertase innerhalb des trans-Golgi und der sekretorischen Vesikel geschnitten, wodurch die Freisetzung von A β (Q3-42) innerhalb des sekretorischen Signalwegs bewirkt wird. Der THY1-Promotor bewirkt eine neuronenspezifische Expression. A β (Q3-42) wird von der Glutaminylzyklase zu pEA β (3-42) umgewandelt, nach (Alexandru, Jagla *et al.* 2011).

Die TBA2.1-Mäuse (TBA2.1) sind erstmalig durch Alexandru *et al.* beschrieben. In homozygoten TBA2.1 sind Alters-abhängige Ablagerungen von A β (x-42) und pEA β (3-42) im lateralen Striatum, in der CA-1-Region des Hippokampus, in den *Colliculi inferiores* des Mittelhirns und in der *Formatio reticularis* des Hirnstammes detektierbar. Ebenso zeigt sich bereits in den Gehirnen von drei

Monate alten homozygoten TBA2.1 ein Neuronenverlust von bis zu 35 % in der CA1-Region im Hippokampus. Zusätzlich kann bereits in zwei Monate alten homozygoten TBA2.1 reaktive Astrozytose und eine Mikrogliose, als Hinweise auf eine Entzündungsreaktion, gemessen werden, die sich bis zu einem Alter von fünf Monaten wieder reduziert. In fünf Monate alten homozygoten TBA2.1 kann zusätzlich ein Verlust von 50 % der Pyramiden-Neuronen gemessen werden sowie eine signifikant, reduzierte Langzeitpotenzierung, die für die Funktion des Gedächtnisses wichtig ist. Neben den pathologischen Auffälligkeiten zeigt sich in homozygoten TBA2.1 bereits in den ersten Wochen ein sensomotorischer Phänotyp und auch ein reduziertes Körpergewicht, die sich bis zum Alter von fünf Monaten weiter verstärken. Dieser sensomotorische Phänotyp definiert sich in den homozygoten TBA2.1 durch das Vorhandensein eines Tremors und eines Rigors, durch Haltungsauffälligkeiten und durch eine reduzierte Motorkoordination auf dem Rotarod. In den Gehirnen der heterozygoten TBA2.1 sind erst im Alter von 21 Monaten A β (x-42) und pEA β (3-42) nachweisbar, die dem zerebralen Niveau von weniger als einen Monate alten homozygoten TBA2.1 entspricht. Im Verhalten zeigen die heterozygoten TBA2.1 keine Auffälligkeiten gegenüber den wildtypischen Tieren (Alexandru, Jagla *et al.* 2011). Das Ausmaß des früh beginnenden, sensomotorischen Phänotyps der homozygoten TBA2.1 bekräftigt die Toxizität von pEA β (3-42). Während die deutlich spätere Entwicklung von A β und pEA β (3-42) in den HET auf einen Schwellenwert von pEA β (3-42) zur Entwicklung eines Phänotyps deutet. Somit stellen die TBA2.1-Mäuse ein interessantes Modell dar, um den Einfluss von pEA β (3-42) zu charakterisieren und um potentielle Wirkstoffe zu testen, die an pEA β (3-42) ansetzen.

1.4 Therapeutische Ansätze der Alzheimer-Demenz

Bislang wurde noch kein Wirkstoff zur Heilung der AD gefunden, so dass die Krankheit bisher nur symptomatisch und palliativ behandelt werden kann (Anand, Gill *et al.* 2014). Dafür sind bisher vier Acetylcholinesterase-Hemmer und ein nicht-kompetitiver N-Methyl-D-Aspartat-(NMDA)-Agonist durch die „Food and Drug Administration“ der Vereinigten Staaten von Amerika zugelassen (Aisen,

Cummings *et al.* 2012). Die Acetylcholinesterase-Hemmer, wie z.B. Galantamin oder Donepezil, konzentrieren sich auf die Funktionsverlängerung des Botenstoffes Acetylcholin, der einen entscheidenden Einfluss auf das Gedächtnis ausübt (Auld, Kornecook *et al.* 2002, Kumar, Singh *et al.* 2015). Der nicht-kompetitiver NMDA-Agonist Memantin wird eingesetzt, um das Eindringen von Kalzium in die Neuronen und somit eine Kalzium-stimulierte Apoptose zu verhindern (Aisen, Cummings *et al.* 2012). Letztendlich bedingen diese Wirkstoffe nur eine kurzfristige Verringerung der Symptome, aber der Krankheitsfortschritt lässt sich nicht aufhalten (Salomone, Caraci *et al.* 2012).

Für die Entwicklung einer ursächlichen Therapie sind bisher mehr als 100 potentielle Wirkstoffkandidaten gescheitert. Der Großteil der Ansätze konzentriert sich unter anderem auf die Inhibition der β - oder γ -Sekretase, Inhibitoren der Tau-Phosphorylierung, die Immuntherapie oder die Modulation der A β -Aggregation (Giacobini und Gold 2013, Li, Ebrahimi *et al.* 2013, Anand, Gill *et al.* 2014). Die Inhibition der β - und γ -Sekretase bestrebt eine Reduktion der pathologischen Prozessierung von APP, um die Bildung von A β zu minimieren. Die Inhibition der β -Sekretase hat sich als mögliche Strategie etabliert, während sich die Modulation der γ -Sekretase aufgrund der vielen möglichen Nebenwirkungen bislang als sehr schwierig herausstellt (Han und Mook-Jung 2014). Ein vielversprechender β -Sekretase-Inhibitor ist MK-8931, der die A β -Konzentration im CSF nachhaltig reduziert und sich aktuell in Phase 2 der klinischen Studien befindet (Yan und Vassar 2014). Für die Modulation der Tau-Phosphorylierung wird in vielen Studien die Inhibition der Hyperphosphorylierung oder der Aggregation des Tau-Proteins bestrebt. In einigen Studien (z.B. Lithium, Valproat, Koffein) sind bereits positive Resultate, wie z.B. die Verbesserung der Kognition, erzielt worden, aber aufgrund von Inkonsistenzen in den Ergebnissen sind noch weitere Überprüfungen nötig (Han und Mook-Jung 2014). Ein vielversprechender Kandidat zur Inhibition der Aggregation des Tau-Proteins ist das Methylthioniniumchlorid (auch Methylenblau), das nicht nur die Aggregation von A β mindert, sondern auch antioxidativ wirkt. Methylthioniniumchlorid befindet sich derzeit in Phase 3 der klinischen Studien (Desai 2009, Salomone, Caraci *et al.* 2012). Im Ansatz der Immuntherapie wird in vielen Studien eine Heilung der

AD durch aktive oder passive Immunisierung oder durch Modulation des Immunsystems hinsichtlich der Toxizität und des Abbaus von A β erzielt. In klinischen Studien zeigen sich positive Effekte, wie z.B. die Reduzierung der senilen Plaques und die Verbesserung der Kognition, welche allerdings mit starken Nebenwirkungen assoziiert ist (Galimberti, Ghezzi *et al.* 2013, Lannfelt, Relkin *et al.* 2014). Im Ansatz der Modulation der A β -Aggregation wird eine Reduktion von Oligomeren und der größeren Aggregaten angestrebt (Giacobini und Gold 2013, Rosenblum 2014). Dabei werden oftmals Peptide eingesetzt, die die β -Faltblattstruktur der Fibrillen aufbrechen oder eine hohe Bindungsaffinität zu A β aufweisen (Sun, Funke *et al.* 2012). Der Einsatz von Peptiden wird oft wegen ihrer erhöhten Spezifität und Wirksamkeit bevorzugt (Craik, Fairlie *et al.* 2013). Nachteilig hingegen ist die hohe Proteaseanfälligkeit, wodurch insbesondere oral verabreichte Peptide eine niedrige Halbwertszeit besitzen (Lien und Lowman 2003). Dies kann durch die Verwendung von D-enantiomeren Peptiden (D-Peptiden) umgangen werden, da sie eine erhöhte Proteaseresistenz und eine geringere Immunogenität im Vergleich zu L-enantiomeren Peptiden (L-Peptide) besitzen (Dintzis, Symer *et al.* 1993, Soto, Kindy *et al.* 1996, Funke und Willbold 2012). Ein Verfahren zur Selektion von spezifischen D-enantiomeren Peptiden ist das Spiegelbild-Phagendisplay. In diesem Verfahren wird das enantiomere Spiegelbild des Zielmoleküls eingesetzt. Es werden Bakteriophagen genutzt, die jeweils verschiedene L-enantiomere Peptide am Hüllprotein gebunden haben. Durch die Bindung der L-Peptide an das Spiegelbild des Zielmoleküls wird ein L-Peptid selektiert, dessen Spiegelbild durch chemische Synthese aus D-enantiomeren Aminosäuren in gleicher Sequenz erhalten werden kann, das an das originale L-enantiomere Zielmolekül bindet (Schumacher, Mayr *et al.* 1996, Funke und Willbold 2009). Ein aussichtsreicher Wirkstoffkandidat, der durch das Spiegelbild-Phagendisplay selektiert worden ist, ist das im folgenden Abschnitt näher behandelte D3.

1.5 D3 und D3D3 als potentielle Wirkstoffkandidaten

D3 ist ein D-Peptid, das durch ein Spiegelbild-Phagendisplay gegen A β selektiert ist (Schumacher, Mayr *et al.* 1996, Wiesehan und Willbold 2003, van Groen,

Wiesehan *et al.* 2008). Es ist gezeigt, dass die orale Gabe oder die hippocampale Infusion von D3 in doppelt-transgenen APP^{swe}/PS1^{dE9}-Mäusen das räumliche Lernverhalten der Mäuse im Morris Wasserlabyrinth signifikant verbessert. Die Analysen der jeweiligen Gehirne demonstrieren außerdem eine Reduktion der senilen Plaques im Hippokampus und im Kortex sowie eine Reduktion der Plaque-assoziierten Entzündung im Randbereich der Plaques (Funke, van Groen *et al.* 2010, van Groen, Kadish *et al.* 2013). Zudem ist *in vitro* nachweisbar, dass D3 die A β -Oligomere reduziert und in amorphe, hochmolekulare Aggregate umwandelt, die keine geordnete „Cross“- β -Faltblattstruktur aufweisen (Funke, van Groen *et al.* 2010).

Auf der Basis von D3 sind weitere D-Peptide rational konzipiert. Ein Derivat ist das D-Peptid D3D3, das ein Kopf-zu-Schwanz-Tandempeptid von D3 darstellt. D3D3 ist konzipiert, um die Affinität von D3 durch eine verstärkte Avidität zu erhöhen. Anhand der bisherigen Ergebnisse stellen D3 und wahrscheinlich auch D3D3 potentielle Wirkstoffkandidaten in der Modulation der A β -Aggregation dar, die es wert sind eingehend untersucht zu werden.

2. Zielstellung der Arbeit

Alzheimer-Demenz ist die häufigste neurodegenerative Krankheit und betrifft mehr als 26,6 Millionen Menschen weltweit. Diese Krankheit zeichnet sich klinisch durch eine progressive Beeinträchtigungen des Kurzzeit- und des Langzeitgedächtnisses, der Persönlichkeit und der Sprache aus. In der Pathologie der Krankheit existieren drei entscheidende Charakteristika: die zerebrale Atrophie, neurofibrilläre Bündel des hyperphosphorylierten Tau-Proteins und extrazelluläre Plaques des β -Amyloid-Proteins. Die Ursache der sporadischen AD konnte bislang nicht eindeutig identifiziert werden. Aktuelle Forschungen postulieren allerdings die Akkumulation von A β zu Oligomeren als kausales Ereignis in der Amyloid-Hypothese. Die Oligomere bilden eine Zwischenstufe in der Bildung von extrazellulären Plaques und gelten als besonders toxisch. Eine Isoform von A β , von der geglaubt wird, dass es die Oligomerisierung initiiert, ist das Pyroglutamat-modifizierte A β (3-42), pEA β (3-42). Es zeichnet sich durch eine verstärkte Aggregationsbildung, eine erhöhte Toxizität und eine erhöhte Resistenz gegenüber Proteasen im Vergleich zu A β (1-42) aus. Zudem ist nachgewiesen, dass pEA β (3-42) die Langzeitpotenzierung inhibiert und dadurch einen entscheidenden Einfluss auf das Gedächtnis ausübt. Somit stellt pEA β (3-42) ein mögliches Zielmolekül zur Therapie der Alzheimer-Demenz dar, denn bislang existiert kein Wirkstoff zur Heilung oder Verzögerung des Krankheitsprozesses. Viele Therapieansätze nutzen den Einsatz von L-enantiomeren Peptiden, die allerdings aufgrund ihrer Proteaseanfälligkeit nur eine geringe Halbwertszeit besitzen. Dies kann durch die Verwendung von D-enantiomeren Peptiden verbessert werden, die ebenfalls eine geringere Immunogenität als L-enantiomere Peptide aufweisen. Ein D-enantiomeres Peptid für die potentielle Therapie der Alzheimer-Demenz ist D3. Es ist gezeigt, dass D3 die toxischen Oligomere *in vitro* reduziert und in amorphe Aggregate umwandelt. Bisherige Untersuchungen bestätigen außerdem, dass durch die Behandlung mit D3 *in vivo* die Plaques reduziert und die Kognition verbessert wird. Die Wirkung von D3 gegenüber pEA β (3-42) ist bisher unklar und stellt ein vielversprechendes Ziel in der weiteren Evaluation der therapeutischen Wirksamkeit von D3 dar. Auf

Basis von D3 sind weitere D-Peptide rational konzipiert. Eines dieser D-Peptide ist D3D3, das ein Kopf-zu-Schwanz-Tandempeptid von D3 darstellt.

Daher war es das Ziel dieser Arbeit D3 und D3D3 auf die therapeutische Wirkung gegenüber pEA β (3-42) im TBA2.1 Mausmodell zu erforschen. Transgene TBA2.1-Mäuse exprimieren das unzyklisierte A β (Q3-42), das posttranslational zu Pyroglutamat-modifiziertem A β (3-42) umgewandelt wird. Anhand der Literatur weisen homozygote TBA2.1 einen sensomotorischen Phänotyp auf, der in dieser Arbeit zunächst validiert und weiter charakterisiert wurde. Anhand der daraus gewonnenen Daten wurde dieses Modell genutzt werden, um die Wirkung von D3 und D3D3 gegenüber pEA β (3-42) zu testen.

3. Material und Methoden

3.1 Material

Nachfolgend sind die in dieser Arbeit verwendeten Materialien tabellarisch dargestellt. Nicht aufgelistete Materialien entsprechen dem Laborstandard.

3.1.1 Materialien für die Tierhaltung

Es wurden folgende Materialien, siehe Tabelle 1, für die Haltung der Tiere durch die Mitarbeiter in der zentralen Tierhaltung des Forschungszentrums Jülich verwendet.

Tabelle 1: Material für die Tierhaltung. Gelistete Darstellung der verwendeten Materialien für die Tierhaltung, unterteilt in Name und Hersteller.

Name	Hersteller
Espen Tiereinstreu AB 368	AsBe-Wood GmbH, Buxtehude, Deutschland
Futtermittel, V153x R/M/H auto	ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland
Käfigsystem, SealsafePlus AERO IVC Green Line	TECNIPLAST Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg, Deutschland
Nestbaumaterial, Nestlet (Maus)	PLEXX B.V., Elst, Niederlande

3.1.2 Verhaltenstestapparaturen und Zubehör

Die verwendeten Apparaturen und zugehörigen Teile für die Verhaltensanalysen sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Verwendete Verhaltensapparaturen und Zubehör. Gelistete Darstellung der verwendeten Verhaltensapparaturen und Zubehör, unterteilt in Name und Hersteller.

Name	Hersteller
Käfig-Typ 3H (Arena für SHIRPA-Test)	BIOSCAPE EBECO GmbH, Castrop-Rauxel, Deutschland
Glasfaserstab	Praktiker AG i.I., Kirkel, Deutschland
Grip-Strength-Meter	Ugo Basile Srl, Gemonio, Italien
Mouse Rota-Rod	Ugo Basile Srl, Gemonio, Italien
Stab mit Fuß	Zentralinstitut für Engineering, Elektronik und Analytik, Forschungszentrum Jülich GmbH, Jülich, Deutschland
Tischklingel	TIGER Deutschland GmbH, Flensburg, Deutschland

3.1.3 Laborgeräte

In Tabelle 3 sind die verwendeten Laborgeräte aufgelistet.

Tabelle 3: Verwendete Laborgeräte. Listung der verwendeten Laborgeräte, unterteilt in Gerät, Name und Hersteller.

Gerät	Name	Hersteller
Geldokumentationssystem	Doc-Print VX2 Geldokumentationssystem	Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld, Deutschland
Gelelektrophorese-System	Compact L/XL Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland

Gerät	Name	Hersteller
Homogenisationsystem	Precellys24	Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, Frankreich
Kamera für das Laser Dissection Microscope	Leica DFC310 FX	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Kryostat	Kryostat für Forschung und Routine Leica CM3050 S	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Laser Dissection Microscope	Leica LMD6000	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Magnetrührer	RCT basic safety control	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau, Deutschland
Membranvakuumpumpe	Membranvakuumpumpe Laboport	KNF Neuberger, Inc., Trenton, Vereinigte Staaten von Amerika
Mikrotiterplattenreader	POLARstar OPTIMA	BMG Labtech GmbH, Ortenberg, Deutschland
Mikrowelle	AEG Micromat	Electrolux Hausgeräte GmbH, Nürnberg, Deutschland

Gerät	Name	Hersteller
pH-Meter	Hanna Instruments HI 9025 Micro Computer pH Meter	HANNA Instruments Deutschland GmbH, Kehl am Rhein, Deutschland
Spannungsgeber	Powerpack DC	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Vereinigte Staaten von Amerika
Sterilbank	Hera Safe KS 18	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Thermocycler	CFX96 Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Vereinigte Staaten von Amerika
Thermoschüttler	Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Ultraschallbad	Ultraschallbad Sonorex	Bandelin Electronic, Berlin, Deutschland
Ultrazentrifuge	Optima Max-XP	Beckman Coulter GmbH, Brea, Vereinigte Staaten von Amerika

Gerät	Name	Hersteller
UV-Tisch	Fischbrand UV- Transilluminator FT- 20E/312	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Vortexmischer	Heidolph Reax 2000 Schüttelmaschine	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Vortexmischer	Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Waage	Sartorius BL 1500 S	Data Weighing Systems, Inc., Elk Grove, Vereinigte Staaten von Amerika
Wärmesystem	GAYMAR-T-Pump Wärmesystem	Eickemeyer - Medizintechnik für Tierärzte KG, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge	Microcentrifuge 5415D	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

3.1.4 Labormaterialien

Es wurden die folgenden Labormaterialien genutzt, die in Tabelle 4 aufgelistet sind.

Tabelle 4: Labormaterialien. Auflistung der verwendeten Labormaterialien, unterteilt in Name und Hersteller.

Name	Hersteller
Centrifuge tube	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Cryomold Standard	Sakura Finetek Europe B.V. KvK, Alphen aan den Rijn, Niederland
Deckgläschen	Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Eppendorf-Reaktionsgefäße, LoBind Tubes	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Färbekasten und Gestell	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Flüssigkeitsblocker, Liquid Blocker Super PapPen	Daido Sangyo Co. Ltd., Tokyo, Japan
ALZET Micro-Osmotic Pump Model 1004	Durect Corporation, Cupertino, Vereinigte Staaten von Amerika
Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen, Nunc 96 Well-Platte	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Mikrotommesser, 16 cm long, profile c	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Nahtmaterial, PGA Resorba	Resorba Medical GmbH, Nürnberg, Deutschland
pH-Indikatorstäbchen, nicht-blutend, pH 6,5 – 10 Spezialindikator	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Precellys Keramik-Kit 1.4 mm	Bertin Technologies, Montigny-le- Bretonneux, Frankreich

Name	Hersteller
Rotilabo-Spritzenfilter, PVDF, steril, Porengröße 22 µm, außen 33 mm	Carl Roth GmbH + Co, KG, Karlsruhe, Germany
Skalpell, Handle #4	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Skalpellklingen, Extra Fine Bonn Scissors	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Spatel und Löffel, Probe and Spatula	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
StarFrost Objektträger	W. Knittel Glasbearbeitungs GmbH, Braunschweig, Deutschland

3.1.5 Chemikalien

In Tabelle 5 sind alle verwendeten Chemikalien aufgeführt.

Tabelle 5: Chemikalien. Auflistung der verwendeten Chemikalien, unterteilt in Name und Hersteller.

Name	Hersteller
10x PCR Puffer mit 15 mM MgCl ₂	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
ACCUGENE 10 X PBS-1 L	Lonza Verviers SPRL, Verviers, Belgien
Ameisensäure 98 % EMSURE® ACS	VWR International, Radnor, Vereinigte Staaten von Amerika
Antisedan	Orion Pharma AS Animal Health, Hamburg, Deutschland

Name	Hersteller
Aqua-Poly/Mount	Polysciences, Inc., Warrington, Vereinigte Staaten von Amerika
Borsäure	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
Complete Protease Inhibitor Tablette, EDTA free	Roche Diagnostics, Basel, Schweiz
Deoxynucleoside Triphosphate Set, PCR Grade	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Deutschland
Diethanolamin	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
DNA-Molecular Weight Marker XIV	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Deutschland
Domitor	Orion Pharma AS Animal Health, Hamburg, Deutschland
Ethanol, 96 - 99 %	VWR International, Radnor, Vereinigte Staaten von Amerika
Ethyldiamintetraessigsäure	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
Gel Green Nucleic Acid Gel Stain	Biotium Inc., Hayward, Vereinigte Staaten von Amerika
Glycerol	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
Ketamin	CompuGroup Medical Deutschland AG, Koblenz, Deutschland
Mouse Ig Blocking Reagent	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, Vereinigte Staaten von Amerika

Name	Hersteller
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid-Infusionslösung 154	Berlin-Chemie AG, Berlin, Deutschland
Natriumzitrat	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
Natriumhydrochlorid	Carl Roth GmbH+Co, KG, Karlsruhe, Germany
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH+Co, KG, Karlsruhe, Germany
Nuclease-Free Water (not DEPC-Treated)	AMBION GmbH, Kassel, Deutschland
Paraformaldehyd, 37 %-ig	VWR International, Radnor, Vereinigte Staaten von Amerika
Rimadyl	Pfizer Deutschland GmbH, Würselen, Deutschland
Taq DNA-Polymerase	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Tissue-Tek O.C.T. Compound	Sakura Finetek Europe B.V. KvK, Alphen aan den Rijn, Niederland
Triton X-100	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
Trizma Base	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
Trizma Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
Universal-Agarose	Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld, Deutschland

3.1.6 Puffer und Lösungen

In der nachfolgenden Tabelle 6 wurden die verwendeten Puffer und Lösungen dargestellt.

Tabelle 6: Puffer und Lösungen. Darstellung der verwendeten Puffer und Lösungen, unterteilt in Name und Reagenzien.

Name	Reagenzien
0,2 % DEA	0,2 % (v/v) Diethanolamin in ddH ₂ O
1 M Tris-Puffer	1 M Tris (pH 11,3) in dd H ₂ O
10 mM Natriumcitratpuffer	10 mM Natriumcitrat in ddH ₂ O (pH 6,0)
4 % Paraformaldehyd	4 % (v/v) Paraformaldehyd (37 %) in PBS
5 x TBE-Puffer	1,1 M Trizma-Base, 900 mM Borsäure, 25 mM EDTA in ddH ₂ O (pH 8,3)
6 x Ladepuffer	30 % (v/v) Glycerol, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau in ddH ₂ O
70 % Ameisensäure	70 % (v/v) Ameisensäure in ddH ₂ O
200 mM Natriumhydroxidlösung	200 mM Natriumhydroxid in ddH ₂ O
Blocklösung	1 % (w/v) BSA, 2,8 % (v/v) Mouse Ig Blocking Reagent in TBS-T

Name	Reagenzien
PBS	10 % (v/v) ACCUGENE 10 X PBS-1 L in ddH ₂ O
Pursept-A Xpress	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland
TBS-T	30 mM Trizma-Base, 10 mM Tris-Hydrochlorid, 500 mM Natriumchlorid, 1 % (v/v) Triton X-100 in ddH ₂ O
Tris-Puffer	20 mM Tris, 250 mM NaCl, 1 Tablette Complete Protease Inhibitor, EDTA free (pH 8,3)

3.1.7 Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten Kits wurden in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Kits. Auflistung der verwendeten Kits, unterteilt in Name, Komponenten und Hersteller.

Name	Verwendete Komponenten	Hersteller
Amyloid-beta (N3pE-42) ELISA	Microtiter Plate Enzyme Conjugate Standard Conjugate Buffer TMB Substrate Solution TMB Stop Solution Wash Buffer Concentrate (40x)	IBL International, Hamburg, Deutschland
Bio-Rad Protein Assay	Dye Reagent Concentrate Standard	Bio-Rad, München, Deutschland

Name	Verwendete Komponenten	Hersteller
Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit	Lysis Solution T Lysis Solution C Column Preparation Solution Wash Solution Concentrate Elution Solution Proteinase K GenElute Miniprep Binding Columns in tubes Collection Tubes, 2.0 mL capacity	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
Micro BCA Protein Assay Kit	Micro BCA Reagent A (MA) Micro BCA Reagent B (MB) Micro BCA Reagent C (MC) Bovine Serum Albumin Standard Ampules, 2mg/mL	Pierce Biotechnology, Rockford, Vereinigte Staaten von Amerika

3.1.8 Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide, siehe Tabelle 8, wurden durch BioTeZ Berlin Buch GmbH (Berlin, Deutschland) synthetisiert und durch Gelfiltration gereinigt.

Tabelle 8: Oligonukleotide. Auflistung der verwendeten Oligonukleotide, unterteilt in Primer-Code und DNA-Sequenz (5'-3').

Primer-Code	DNA-Sequenz (5'- 3')
TBA-12	TGCCCATATGTCCTAAGCTC
TBA-13	CAGCTTCCATGGCAGTATTT
TBA-15	GGCATGACAGATACCAAAGC

3.1.9 D-enantiomere Peptide

Die verwendeten D-Peptide bestehen ausschließlich aus D-enantiomeren Aminosäuren. Das D-Peptid D3 ist durch Spiegelbild-Phagendisplay selektiert, während das auf D3-basierende Derivat D3D3 rational konzipiert ist (van Groen, Wiesehan *et al.* 2008). Die beiden D-Peptide wurden durch JPT Peptide Technologies GmbH (Berlin, Deutschland) synthetisiert und durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gereinigt. Der Reinheitsgrad (> 95 %) wurde durch Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation mit Flugzeitmassenspektrometer-Detektion überprüft. Die verwendeten D-enantiomeren Peptide sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: D-enantiomeren Peptide. Darstellung der verwendeten D-enantiomeren Peptide, unterteilt in Name, Sequenz, Molekulargewicht, Charge(n) und Lieferfirma.

Name	Sequenz	Modi-fikation	Charge(n)
D3	rprrlhthrr	Amidgruppe am C-Terminus	150812HSDW
D3D3	rprrlhthrrrrprrlhthrr	Amidgruppe am C-Terminus	030712A6a

3.1.10 Antikörper

Die verwendeten Antikörper wurden in der nachfolgenden Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Antikörper. Angegeben sind die verwendeten Antikörper, unterteilt in Name, Spender, Klonalität und Hersteller.

Name	Spender	Klonalität	Hersteller
Beta-Amyloid, 1-16 (6E10), Monoclonal Antibody, purified	Maus	Monoclonal	Covance Inc., Princeton, Vereinigte Staaten von Amerika

Name	Spender	Klonalität	Hersteller
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 conjugate	Ziege	Polyclonal	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland

3.1.11 Software und Datenbanken

Zusätzlich zu der in Tabelle 11 gelisteten Software und Datenbanken wurde auch Microsoft Office 2010 zur Auswertung genutzt.

Tabelle 11: Software und Datenbanken. Auflistung der verwendeten Software, unterteilt in Name und Entwickler/Firma.

Name	Entwickler/Firma
GraphPad PRISM 5.0	GraphPad Software Inc., La Jolla, Vereinigte Staaten von Amerika
ImageJ	National Institutes of Health, Bethesda, Vereinigte Staaten von Amerika
InVivoStat	Simon Bate und Robin Clark, Vereinigtes Königreich
IrfanView	Irfan Skiljan, Wiener Neustadt, Österreich
Laser Microdissection Leica LMD Software	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Leica Application Suite 4.0	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland

Name	Entwickler/Firma
POLARstar OPTIMA Version 2.00	BMG Labtech GmbH, Ortenberg, Deutschland
PubMed.gov	National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, Rockville Pike, Vereinigte Staaten von Amerika
StatView	SAS Institute Inc., Cary, Vereinigte Staaten von Amerika

3.2 Methoden

3.2.1 TBA2.1-Mausmodell

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das TBA2.1-Mausmodell genutzt (Alexandru, Jagla *et al.* 2011). Die ersten Zuchttiere wurden von der Firma Probiodrug AG, ehemals Ingenium Pharmaceuticals AG, zur Verfügung gestellt. Die nachfolgende Zucht und Haltung erfolgte in der Forschungszentrum Jülich GmbH.

3.2.1.1 Tierhaltung

Die Tiere wurden in der zentralen Tierhaltung innerhalb der Forschungszentrum Jülich GmbH untergebracht. In den Haltungsräumen und den Laborräumen herrschte eine Klima-kontrollierte Umgebung (22 °C, 54 % Feuchtigkeit, 12-Stunden-Lichtzyklus). Es wurden pro Käfig (Typ 2) bis zu 4 Tiere gehalten. Zusätzlich zu der Einstreu befand sich in jedem Käfig Nestbaumaterial zur Förderung des Wohlbefindens. Die Tiere hatten Zugang zu Wasser und Futter *ad libitum*. Die Anzahl der genutzten Tiere ist in Tabelle 12 dargestellt. Die geltenden Gesetze für die an Mäusen durchgeführten Tests wurden eingehalten und durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz, Nordrhein-Westpfahlen genehmigt (AZ84-02.04.2011.A359). Basierend auf der Literatur, in der ein progressiver Phänotyp in den homozygoten TBA2.1-Mäusen beschrieben wurde, wurden alle homozygoten TBA2.1-Mäuse aufgrund ihres Phänotyps im Alter von 5 Monaten getötet und waren ebenfalls als Zuchttiere ausgeschlossen (Alexandru, Jagla *et al.* 2011).

Tabelle 12:Übersicht der Versuche. Darstellung der Versuche an TBA2.1-Mäusen, unterteilt in Versuch, Alter, Geschlecht und Anzahl der Tiere pro Genotyp.

Versuch	Alter [Monate]	Geschlecht	Anzahl der		
			Wildtyp-Mäuse	heterozygoten Mäuse	homozygoten Mäuse
Panelstudie: Analyse des Phänotyps	2 - 5	männlich und weiblich	10	7	11
Trendstudie: Analyse des Phänotyps	2	männlich	8	8	9
	3		8	7	6
	4		10	12	11
	5		10	12	11
	18		10	7	-
	21		9	8	-
	24		6	5	-
Querschnittsstudie: Greifstärke-Test und modifizierter Stabtest	5	männlich	11	9	10
Querschnittsstudie: Analyse der Amyloid-Pathologie	5	männlich	6	-	6

Versuch		Alter [Monate]	Geschlecht	Anzahl der		
				Wild- typ- Mäuse	hetero- zygoten Mäuse	homo- zygoten Mäuse
Querschnitts- studie: Quantifi- zierung des pEA β (3-42)- Gehalts	DEA- lösliche Fraktion	5	männlich	5	-	6
	un- lösliche Fraktion	5	männlich	3	-	3
Intra- peritoneale Behandlung mit Placebo, D3 und D3D3	Placebo	4-5	weiblich	6	-	7 (4, 7)*
	D3			7	-	8 (4, 7)*
	D3D3			7	-	8 (5, 7)*

*Die Anzahl der Tiere, dessen A β -Spiegel auf Basis der Immunfluoreszenz und/oder biochemisch quantifiziert worden sind, sind in Klammern folgendermaßen vermerkt: (Immunfluoreszenz-, Biochemische Analyse).

3.2.1.2 Genotypisierung

Von allen verwendeten Tieren wurde der Genotyp bestimmt. Dazu wurde zuerst die DNA aus Schwanzbiopsien isoliert. Die DNA der transgenen und/oder der dazu gehörigen wildtypischen Fragmente wurden in einer Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert, anschließend elektrophoretisch aufgetrennt und durch UV-Licht detektiert.

3.2.1.2.1 DNA-Isolation

Zur Bestimmung des Genotyps wurden 1-2 mm große Schwanzbiopsien genutzt, die von den Mitarbeitern der zentralen Tierhaltung zur Verfügung gestellt und bei -20 °C gelagert wurden. Für die DNA-Isolation wurde das Sigma Aldrich Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit verwendet. Die Lösungen Proteinase K und die Lösung Wash Solution wurden gemäß den Angaben des Herstellers hergestellt. Im ersten Schritt des Kits wurden die Schwanzbiopsien in 20 µl der Lösung Proteinase K in 180 µl der Lösung Lysis T über Nacht bei 55 °C und 300 rpm lysiert. Die Zugabe von 200 µl der Lösung Lysis C bewirkte die Denaturierung der DNA durch chaotrope Salze. Das Lysat wurde auf dem Vortexmischer gemischt und durch Zugabe von 200 µl Ethanol die Bindung der DNA an eine Silikamembran eines Mikrozentrifugenröhrchen gefördert. Diese Mikrozentrifugenröhrchen wurden zuvor mit 500 µl der Lösung Column Preparation Solution beladen und bei 12.000 x g für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde entsorgt. Der Großteil des Lysats (ohne Tierhaare) wurde auf diese Mikrozentrifugenröhrchen aufgetragen, bei 6.500 x g für 1 min zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die an die Silikamembran gebundene DNA wurde zweimal mit 500 µl der Lösung Wash Solution gewaschen (6.500 x g für 1 min, 16.000 x g für 3 min). Der Durchfluss wurde nach jedem Waschschritt entsorgt. Im letzten Schritt wurde die gereinigte DNA mit 200 µl Elution Solution, einer Tris-EDTA-Lösung, inkubiert und bei 6.500 x g für 1 min eluiert. Die gereinigte DNA wurde bis zur Analyse bei 4°C gelagert.

3.2.1.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die DNA der transgenen und entsprechenden wildtypischen Fragmente der TBA2.1 Mäusen aus 3.2.1.2.1 wurde in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Der dazu erforderliche Reaktionsansatz setzte sich aus nukleasefreiem Wasser, 10 x PCR Puffer mit 15 mM MgCl₂, einem Mix aus Deoxynucleoside Triphosphate Set, Oligonukleotiden (TBA-12, TBA-13, TBA-15), Taq DNA-Polymerase und aus einem Teil der gereinigten DNA zusammen, siehe auch Tabelle 13.

Tabelle 13: Reaktionsansatz der Polymerase-Kettenreaktion. Darstellung des Reaktionsansatzes für die Polymerase-Kettenreaktion, unterteilt in Reagenzien, Endkonzentration und Menge [μl].

Reagenzien	Endkonzentration	Menge [μl]
nukleasefreies Wasser	-	14
10 x PCR Puffer mit 15 mM MgCl_2	0,7 x Puffer mit 1 mM MgCl_2	1.25
25 mM Deoxynucleoside Triphosphate Set	1,8 mM (jedes Nucleosid)	0.1
10 pmol/ μl TBA-12	0,07 μM	0.25
10 pmol/ μl TBA-13	0,07 μM	0.25
10 pmol/ μl TBA-15	0,07 μM	0.25
5 U/ μl Taq-Polymerase	0,5 U	0.1
gereinigte DNA	-	1

Dieser Reaktionsansatz wurde bei verschiedenen Temperaturen im CFX96 Real-Time PCR Detection System inkubiert. In Abhängigkeit der Temperatur wurde die DNA in mehreren Zyklen denaturiert (94 °C), mit den spezifischen Oligonukleotiden (TBA-12, TBA-13 und TBA-15) hybridisiert (55 - 61 °C) und mit dem Deoxynucleoside-Triphosphate Set elongiert (72 °C), siehe auch Tabelle 14. Die amplifizierten PCR-Fragmente lagerten bis zur Analyse bei 4 °C.

Tabelle 14: Temperaturschema der Polymerase-Kettenreaktion. Darstellung des verwendeten Temperaturschemas der Polymerase-Kettenreaktion, unterteilt in Temperatur, Zeit und Zyklen.

Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
94	180	
94	30	2x
61	30	
72	90	
94	30	2x
59	30	
72	90	
94	30	2x
57	30	
72	90	
94	30	28x
55	30	
72	90	
94	30	
61	30	
72	600	
4	∞	

3.2.1.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die amplifizierten PCR-Fragmente aus 3.2.1.2.2 wurden in einer Agarose-Gelelektrophorese dargestellt. Das Prinzip der Gelelektrophorese beruht auf der Ionenbeweglichkeit im elektrischen Feld in Abhängigkeit von Größe und Ladung. Aufgrund der gleichmäßig verteilten Ladung durch die Phosphatreste im DNA-Rückgrat ist es möglich, die amplifizierten PCR-Fragmente der Größe nach aufzutrennen und somit zu identifizieren (Aaij und Borst 1972, Lee, Costumbrado *et al.* 2012).

Für das Agarose-Gel wurde 1,5 % Universal-Agarose in 0,5 x TBE-Puffer für 5 Minuten in der Mikrowelle gekocht und mit Gel green nucleic acid stain (1:10000) versetzt. Das Gel wurde in einen Gelschlitten mit Kamm des Compact L/XL Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus gegossen. Nach der Polymerisation der Agarose wurde das Gel mit 3 µl DNA Molecular Weight Marker X sowie mit 10 µl der amplifizierten PCR-Fragmente inklusive 6 x

Ladepuffer beladen. Es erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung bei 120 V für 2 Stunden. Die PCR-Fragmente wurden mit dem Doc-Print VX2 Geldokumentationssystem visualisiert und digitalisiert. Die Genotypen wurden nach der Größe der Banden im Bezug zum DNA Marker bestimmt. Das Wildtyp-Fragment betrug 587 bp und das transgene Fragment betrug 459 bp. Die heterozygoten Tiere trugen in logischer Konsequenz beide Allele und somit waren auch beide Genprodukte zu identifizieren, siehe auch Abbildung 7.

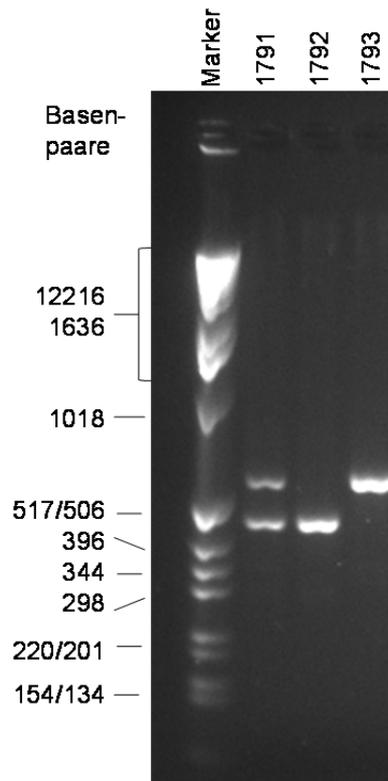


Abbildung 7: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Fragmente zur Bestimmung des Genotyps in den TBA2.1 Mäusen. Das Gelbild (Ausschnitt) zeigt exemplarisch den DNA Molecular Weight Marker X (Marker, Spur 1) sowie die PCR-Fragmente der TBA-Tiere 1791 (heterozygot, Spur 2), 1792 (homozygot, Spur 3) und 1793 (wildtypisch, Spur 4).

3.2.2 Verhaltensanalysen

Zur Charakterisierung des Phänotyps wurden verschiedene Verhaltensanalysen durchgeführt. Alle benutzten Apparaturen wurden vor und nach jedem Tier mit Pursept-A Xpress gereinigt. Die Experimentatoren waren blind gegenüber dem Genotyp und der Behandlung. Es wurden heterozygote, homozygote TBA2.1 im

Vergleich zu den Wildtypen evaluiert. Die Wildtypen stammten aus der Zucht der TBA2.1 und entsprachen dem Hintergrundstamm. Die Verhaltensdaten der 18 Monate alten heterozygoten und wildtypischen TBA2.1-Mäuse wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Elke Butzküven erhoben.

3.2.2.1 Primäre Untersuchung (SHIRPA-Test)

Der SHIRPA-(SmithKline Beecham, Harwell, Imperial College, Royal London Hospital, phenotype assessment)-Test ist eine semiquantitative Analyse zur Charakterisierung eines Phänotyps (Rogers, Fisher *et al.* 1997). In dieser Arbeit wurde die primäre Untersuchung aus dem SHIRPA-Test genutzt, um ein Hervortreten des Phänotyps der TBA2.1-Mäuse zu analysieren. Dazu wurden die Mäuse in eine Arena der Größe 18 cm x 42,5 cm x 26,5 cm (H x B x T) gesetzt. Es folgte eine individuelle und makroskopische Beobachtung und Analyse in den folgenden Kriterien: Körperhaltung, Gangart, Wachsamkeit, Antwort auf Berührung, Schreckreaktion, Berührungsreaktion der Ohren, Lidschlussreflex, Greif- und Streckreflex, Schmerzreflex, Stellreflex und die Fähigkeit eines Klimmzuges. Jedes Tier wurde anhand seines Verhaltens in jedem Kriterium von 0 bis 3 bewertet. Dazu wurde das folgende Schema genutzt: 0 keine Veränderung, 1 eventuell verändert, 2 verändert, 3 extrem verändert gegenüber dem Wildtyp. Die Bewertungen der Kriterien wurden pro Maus addiert und zur Analyse genutzt.

3.2.2.2 Beschleunigender Rotarod-Test

Im beschleunigten Rotarod-Test wurden die motorische Koordination der Tiere getestet (Jones und Roberts 1968, Shiotsuki, Yoshimi *et al.* 2010). In dem Gerät (Mouse Rota-Rod) befindet sich ein rotierender Zylinder, auf dem die Tiere sich mit ansteigender Geschwindigkeit bewegen sollen. Fiel ein Tier herunter, so wurde die Zeit gestoppt. Die Zeit diente als Maß der Koordination. Der in dieser Arbeit verwendete Test wurde nach dem bisher beschriebenen Protokoll für das TBA2.1-Mausmodell durchgeführt (Alexandru, Jagla *et al.* 2011). Der Test bestand aus einem Training und drei Testsitzungen, die innerhalb von zwei

Tagen durchgeführt wurden. Das Training fand am ersten Tag statt. Dabei mussten die Mäuse mindestens 60 Sekunden bei vier Umdrehungen die Minute (upm) laufen. Schaffte es eine Maus nicht innerhalb von 60 Versuchen dieses Kriterium zu erfüllen, so wurde das Tier aus dem Experiment genommen. Nach dem Training hatten die Tiere 3 Stunden Zeit zur Erholung. Danach wurden die Tiere zur Habituation für 30 min einzeln gesetzt. Im Anschluss begann die erste Testsitzung. Dabei stieg die Rotationsgeschwindigkeit des Zylinders von 4 bis 40 upm innerhalb von 5 Minuten an. Die maximale Zeit pro Lauf betrug 10 Minuten. Jedes Tier lief 3 Durchgänge im Abstand von 15 Minuten. Am zweiten Tag fanden die beiden weiteren Testsitzungen inklusive erneuter Habituationen nach dem gleichen Prinzip statt. Dazwischen hatten die Tiere eine Erholungsphase von 3 Stunden. Die gemessene Latenzzeit aller Läufe wurde zur Analyse des motorischen Lernverhaltens und der motorischen Koordination genutzt.

3.2.2.3 Greifstärke-Test

In dem Greifstärke-Test wurde die maximale Greifstärke der Vorderpfoten gemessen, die die Tiere einsetzen, um sich an einem Zugsystem des „Grip-Strength Meters“ festzuhalten. Dazu wurden die Tiere zur Habituation für 30 Minuten einzeln und anschließend dreimal die Kraft der einzelnen Tiere gemessen. Zwischen den Messungen hatten die Tiere jeweils 15 Minuten Zeit zur Erholung. Für die Messung wurde das Tier am Schwanz angehoben und zu dem Zugsystem des Gerätes geführt, welches das Tier intuitiv greift. Danach wurde das Tier auf die horizontale Ebene gebracht und kontinuierlich von dem Zugsystem wegbewegt bis es los ließ. Die maximale Greifstärke der Vorderpfoten wurde innerhalb des Gerätes über einen Signalverstärker in Pond gemessen, digitalisiert und nachträglich in die internationale Einheit Newton umgerechnet.

3.2.2.4 Modifizierter Stabtest

Mit dem modifizierten Stab-Test können Basalganglien-assoziierte Bewegungsstörungen gemessen werden (Ogawa, Hirose *et al.* 1985, Meredith und Kang 2006). Dazu wurde ein 50 cm langer, angerauter Stab mit Fuß in eine Arena der Größe 19,5 cm x 55 cm x 33 cm (H x B x T) gestellt. Der Boden des Stabes wurde 4 cm hoch mit Streumaterial bedeckt. Vor dem Test wurden die Tiere 30 Minuten einzeln zur Habituation gesetzt. Danach wurde die Maus mit dem Kopf nach unten an die Spitze des Stabes platziert, um den kompletten Stab nach unten zum Streumaterial zu laufen. Der Lauf wurde nach einem Punktesystem bewertet. Die Zahl 0 bedeutet, dass die Maus kontinuierlich heruntergelaufen ist. Die Zahl 1 bezeichnet einen nicht vollständigen Lauf in Kombination mit teilweisem Rutschen oder Fallen. Rutscht die Maus den Stab komplett hinunter, wurde es als 2 bewertet. Fällt sie hingegen direkt herunter, wurde der Lauf mit der Punktzahl 3 bewertet. Insgesamt gab es 3 Läufe pro Maus im Abstand von 15 Minuten. Zur Analyse wurde die Summe der Punktzahlen, der Stabtest-Score, genutzt.

3.2.3 Quantifizierung von pEA β (3-42) und Immunfluoreszenzanalyse von A β im Gehirn

Um die Pathologie der TBA2.1 sowie den Einfluss durch D3 und D3D3 im Vergleich zur Placebogruppe zu evaluieren, wurden biochemisch die zerebrale pEA β (3-42)-Konzentration und die amyloiden Aggregate im Gehirn auf Immunfluoreszenzbasis untersucht. Die biochemische Quantifizierung und ein Teil der Immunfluoreszenzfärbungen wurden im Rahmen der Masterarbeit von Kerstin Teichmann durchgeführt.

3.2.3.1.1 Organpräparation

Zur Gewinnung der Gehirne wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet. Es wurde zur Bestätigung des Genotyps außerdem eine Schwanzbiopsie genommen. Das Gehirn wurde freigelegt, in beide Hemisphären getrennt und für die spätere Nutzung bei -80 °C gelagert. Die rechte Hemisphäre wurde zur

immunfluoreszenzbasierenden Darstellung von A β verwendet und die linke Hemisphäre diente der Quantifizierung des pEA β (3-42)-Gehalts.

3.2.3.1.2 Aufarbeitung des Gewebes zur Anfertigung von Kryoschnitten

Um A β im Gehirn anzufärben und zu analysieren, wurde eine Hemisphäre, siehe 3.2.3.1.1, an dem Kryostat für Forschung und Routine Leica CM3050 S in 10 μ m dicke Kryoschnitte geteilt. Dafür wurde die Hemisphäre auf einen Halter mit Tissue-Tek O.C.T. Compound fixiert, der in dem Kryostaten befestigt wurde. Die Kühlraumtemperatur entsprach -17 °C und die Objekttemperatur betrug -13 °C. Es wurden sagittale Schnitte der linken Hemisphäre von TBA2.1-Gehirnen angefertigt, die auf einem Objektträger platziert bei 37 °C getrocknet und anschließend bei -80 °C gelagert worden.

3.2.3.1.3 Immunfluoreszenzbasierende Darstellung und Quantifizierung von A β

Mit Hilfe von Antikörperfärbungen konnte der A β -Gehalt im Gehirn nachgewiesen und quantifiziert werden. Die Kryoschnitte aus 3.2.3.1.2 wurden bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend für 20 Minuten in 4 % PFA in PBS in der Küvette fixiert. Weiter wurden die Schnitte in TBS-T (3 x 1 min, 1 x 10 min, 2 x 1 min) in Färbekästen permeabilisiert. Danach wurden die Flächen um den Schnitt herum getrocknet und mit einem Flüssigkeitsblocker (Liquid Blocker Super PapPen) umrandet. Die nachfolgenden Flüssigkeiten wurden auf die Schnitte aufgetragen und nach der jeweiligen Inkubation vorsichtig mit der Membranvakuumpumpe Laboport abgesaugt. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, inkubierten die Schnitte für 30 min in der Blocklösung. Im Anschluss wurden die Schnitte über Nacht für 4 °C im primären Antikörper (Beta-Amyloid, 1-16, 6E10) inkubiert. Die Schnitte wurden dreimal für 4 Minuten mit TBS-T gewaschen, bevor sie mit dem sekundären Antikörper (Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody) für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Die Schnitte wurden nachfolgend noch 3 Mal für 1 Minute in TBS-T im Färbekasten gewaschen und anschließend mit Aqua-Poly/Mount und

Deckgläschen versehen. Die gefärbten Schnitte wurden bei 4 °C gelagert. Die Aufnahmen der Bilder erfolgten am Laser Dissection Microscope (LMD6000) mit der Kamera (Leica DFC310 FX) und durch die zugehörige Software (Laser Microdissection Leica LMD Software). Die quantitative Analyse der Bilder wurde mit Hilfe der Software ImageJ berechnet. Dazu wurden die Bilder in das 8 Bit-Format umgewandelt und der Hintergrund sowie die minimal detektierte Pixelzahl pro Versuch angepasst. Es wurden die gefärbte Partikelfläche, die Anzahl, die durchschnittliche Größe und der durchschnittliche Durchmesser der Partikel rechnerisch bestimmt.

3.2.3.1.4 A β -Extraktion

Für die Quantifizierung von pEA β (3-42) wurde das A β aus jeweils einer Hemisphäre eines TBA-Gehirnes extrahiert. Während des gesamten Vorgangs wurde auf Eis bzw. bei 4°C gearbeitet. Dazu wurde die linke Hemisphäre, siehe auch 3.2.3.1.1, mit dem neunfachen Gewicht der Hemisphäre mit Tris-Puffer versetzt und mit dem Precellys Keramik-Kit 1.4 mm in einem Homogenisationsystem (Precellys24) für 2 Mal 20 s bei 6.000 upm homogenisiert. Das entstandene 6,25 %ige Homogenat wurde für 15 s gevortext, 5 min im Ultraschallbad Sonorex sonifiziert, anschließend nochmalig für 15 s gevortext. Ein Milliliter des Homogenats wurde bei 175.000 upm für 30 min in der Ultrazentrifuge (Optima Max-XP) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit 200 μ l 0,2 % Diethanolamin (DEA) für 15 Minuten inkubiert und mit 800 μ l 0,2 % DEA homogenisiert und zu gleichen Bedingungen nochmalig zentrifugiert. Der Überstand repräsentierte die DEA-lösliche Fraktion von A β und wurde bis zur Analyse bei -80 °C gelagert. Das Pellet wurde mit 200 μ l 70 % Ameisensäure für 15 min inkubiert, sonifiziert und weiteren 800 μ l 70 % Ameisensäure für 45 min inkubiert und letztendlich homogenisiert. Die Lösung wurde nochmals zu den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Unterstand stellte die unlösliche Fraktion dar und wurde bei -80 °C eingefroren, aufgetaut, im Verhältnis 1:22 mit 1 M Tris neutralisiert und erneut eingefroren. Die DEA-lösliche und die unlösliche Fraktion lagerten bis zur Analyse bei -80 °C.

3.2.3.1.5 Analyse der Proteinkonzentration

Um die Konzentration an Proteinen der DEA-löslichen und der unlöslichen Fraktion zu bestimmen, wurden das Micro BCA Protein Assay Kit und der Bio-Rad Protein Assay verwendet. Das Micro BCA Protein Assay Kit eignet sich vor allem zur Bestimmung von kleinen Proteinkonzentrationen und wurde daher für die Analyse der DEA-löslichen Fraktion genutzt. Das Assay nutzt die Reduktion zweiwertiger Kupferionen in der 2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure in Anwesenheit von Proteinen in alkalischer Lösung. Dadurch werden violette Komplexe gebildet, die photometrisch quantifizierbar sind (Smith, Krohn *et al.* 1985).

Die DEA-lösliche Fraktion wurde 1:50 verdünnt und gemäß der Herstellerangaben des Kits analysiert. Dafür wurden jeweils 100 µl der DEA-löslichen Fraktion oder des Proteinstandards in einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen (Nunc 96 Well-Platte) aufgetragen. Die gleiche Menge der Lösung Working Reagent, die nach Angaben des Herstellers angesetzt wurde, wurde hinzugefügt. Die Mikrotiterplatte wurde anschließend bei 37 °C für 2 h inkubiert und anschließend bei einer Absorption von 570 nm photometrisch gemessen.

Aufgrund einer erhöhten Proteinkonzentration in der unlöslichen Fraktion wurde der Bio-Rad Protein Assay, basierend auf der Methode nach Bradford, genutzt. In diesem Assay wurde der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 genutzt, der an die basischen und aromatischen Aminosäuren von Proteinen bindet. Durch diese Bindung verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465 nm zu 595 nm. Die Bestimmung erfolgte photometrisch (Bradford 1976).

Für das Assay wurden der Standard und die Lösung Diluted Dye Reagent gemäß den Herstellerangaben hergestellt. Es wurden 10 µl der unverdünnten, unlöslichen Fraktion oder des Standards in eine Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen (Nunc 96 Well-Platte) gegeben. Dazu wurden 200 µl der Lösung diluted dye reagent hinzu gegeben und für 30 s gemischt. Nach einer Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min wurde die Absorption bei 595 nm photometrisch im POLARstar OPTIMA gemessen und durch die zugehörige Software POLARstar OPTIMA Version 2.00 digitalisiert.

3.2.3.1.6 Enzyme-linked immunosorbent assay

Der Enzym-gekoppelte Immunadsorptionstest („Enzyme-linked immunosorbent assay“, ELISA) ist eine quantitative Nachweismethode auf Basis von Antikörpern (Engvall und Perlmann 1971, Engvall 2010). Der in dieser Arbeit verwendete Amyloid-beta (N3pE-42) ELISA ist ein Sandwich-ELISA, der spezifisch humanes pEA β (3-42) detektiert. Anstelle des mitgelieferten Puffers wurde 0,2 % DEA für die DEA-lösliche Fraktion und 70 % Ameisensäure für die unlösliche Fraktion verwendet. Die Herstellung der übrigen Lösungen entsprach den Angaben des Herstellers. Als Basis des Kits wurde eine mit dem Anti-Human A β -(38-42)-Antikörper gekoppelte Mikrotiterplatte genutzt. Die einzelnen Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden entweder mit 100 μ l des Standards, des entsprechenden Puffers (Blank), der DEA-löslichen oder der unlöslichen Fraktion über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wurde die Mikrotiterplatte mehrfach (4 x 100 μ l, 4 x 200 μ l) mit der Lösung Wash Buffer gewaschen, um die unspezifischen Bindungen zu lösen. Die Mikrotiterplatte wurde danach mit 100 μ l der Lösung Enzyme Conjugate für 60 min bei 4 °C behandelt, das den Meerrettich-Peroxidase gekoppelten zweiten Antikörper Anti-Human A β N3pE (8E1) enthielt. Es erfolgten erneute Waschschriffe (4 x 100 μ l, 5 x 200 μ l), bevor 100 μ l der Lösung TMB Substrate Solution hinzu gegeben wurde. Das darin enthaltende Tetramethylbenzidin (TMB) wurde von der Meerrettich-Peroxidase umgesetzt, wodurch ein Farbumschlag ins Blaue ausgelöst wurde. Die Lösung inkubierte für 60 min bei Raumtemperatur im Dunklen. Im Anschluss wurde die Reaktion mit 100 μ l der Lösung TMB Stop Solution durch die enthaltende Schwefelsäure gehemmt und es erfolgte ein Farbumschlag ins Gelbe. Die Absorption wurde bei 450 nm im POLARstar OPTIMA gemessen. Der Leerwert wurde von den Messwerten abgezogen. In Abhängigkeit der Farbintensität und der Standardreihe konnte die pEA β (3-42)-Konzentration bestimmt werden. Die dadurch erhaltenen Messwerte wurden mit der in 3.2.3.1.5 bestimmten Proteinkonzentrationen der Proben ins Verhältnis gesetzt.

3.2.4 Intraperitoneale Behandlung der TBA2.1-Mäuse mit D-enantiomeren Peptiden

Zur kontinuierlichen Behandlung der TBA2.1-Mäuse mit D-enantiomeren Peptiden, siehe 3.1.9, wurde das Alzet-Pumpensystem (Durect Corporation, Cupertino, Vereinigte Staaten von Amerika) verwendet. Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 4 Wochen mit einer Dosis von 0,1 mg D-Peptid pro Tag durch das Micro-Osmotic Pump Model 1004 intraperitoneal behandelt. Vor der Implantation wurden 3,79 mg des jeweiligen D-Peptides pro Maus in steril filtriertem PBS gelöst. Anschließend wurde die Lösung mit 200 mM Natriumhydroxidlösung auf pH 7,4 angepasst, bevor auf das Endvolumen von 100 µl mit steril filtriertem PBS aufgefüllt wurde. Die Pumpen wurden über einen Adapter mit je 100 µl Peptidlösung oder steril filtriertem PBS (Placebo) befüllt und mit dem Flussregler versehen. Die Mäuse wurden zur Implantation mit 100 mg/kg Ketamin in Kombination mit 0,3 mg/kg Domitor durch intraperitoneale Injektion narkotisiert. Der Bauchbereich wurde großzügig rasiert und desinfiziert. Die Bauchdecke und die darunterliegende Muskelschicht wurden geöffnet. Die Pumpe wurde mit der Öffnung nach unten in das Peritoneum eingesetzt und die Öffnungen wurden mit resorbierbarem Nahtmaterial (PGA Resorba) genäht. Als Antagonist zu Domitor wurde dem Tier 0,2 mg/kg Antisedan subkutan injiziert. Des Weiteren wurde 5 mg/kg Rimadyl zur Schmerzlinderung und Entzündungshemmung subkutan verabreicht. Den Tieren wurden noch 3 weitere Tage 5 mg/kg Rimadyl subkutan injiziert. Außerdem wurden zweimal pro Woche während des gesamten Behandlungszeitraumes das Erscheinungsbild und das Gewicht der Tiere begutachtet. Als Ausschlusskriterien wurden ernste Auffälligkeiten beziehungsweise ein Gewichtsverlust von mehr als 15 % definiert. In der Studie war kein Tier von den Ausschlusskriterien betroffen.

3.2.5 Statistische Analyse

Zur statistischen Analyse wurden die Programme InVivoStat 2.5 (Clark, Shoaib *et al.* 2012), StatView 5.0.1 und GraphPad Prism 5.0 verwendet. Die Normalverteilung der Daten wurde je nach Programm entweder in einem

„Normality Probability Plot“ oder in dem Shapiro-Wilk-Test analysiert. Für normalverteilte, multiple Vergleiche wurde die einfaktorielle Varianzanalyse („One-Way analysis of variance“) oder die zweifaktorielle Varianzanalyse („Two-Way analysis of variance“) mit nachfolgendem Bonferroni- oder T-Test verwendet. Im Falle normalverteilter Daten aus einer Panelstudie wurde die zweifaktorielle Varianzanalyse im gemischten Modell („Repeated-Measures-Parametric Analyses“) mit einem nachfolgenden gepaarten T-Test („pairwise test“) verwendet. Zum Vergleich von zwei Gruppen mit normalverteiltem Charakter wurde der T-Test genutzt. Im Falle von metrisch nicht-normalverteilten Daten von mehr als 2 Gruppen wurde der Kruskal-Wallis-Test oder bei wiederholten Messungen der Friedman-Test mit dem Dunn-Test („Dunn’s Multiple Comparison Test“) *post hoc* oder der Mann-Whitney-Test angewendet. Im Vergleich von 2 Gruppen bei einer nicht-normalverteilten Datenstruktur der Mann-Whitney-Test verwendet. Für die Berechnung einer Korrelation wurde die Pearson-Korrelation („two-sided Pearson’s product moment correlation coefficient“) genutzt. Die Wahrscheinlichkeit von $p \leq 0.05$ wurde als signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

4.1 Charakterisierung des TBA2.1-Mausmodells

Das Ziel dieser Arbeit war es, verschiedene D-enantiomere Peptide als potentielle Wirkstoffkandidaten im TBA2.1-Mausmodell zu evaluieren. Um dieses Ziel zu verwirklichen, galt es im ersten Schritt den Phänotyp transgener TBA2.1-Mäuse im Verhalten und in der Pathologie zu charakterisieren und im Vergleich zur Literatur zu validieren.

4.1.1 Verhaltensanalysen des Phänotyps

Zur Charakterisierung des Verhaltens der TBA2.1-Mäuse (TBA2.1), wurden wildtypische (WT), heterozygote (HET) und homozygote (HOM) Tiere in der primären Untersuchung, in ihrer motorischen Koordination, in ihrer Greifstärke und in dem Stab-Test getestet. Basierend auf der Literatur wurden TBA2.1 im gemischten Geschlecht in der primären Untersuchung und in ihrer motorischen Koordination zuerst in einer Panelstudie analysiert, in der zu mehreren Zeitpunkten stets die gleichen Individuen getestet wurden (Alexandru, Jagla *et al.* 2011). Um einen möglichen Einfluss des Trainings und des Geschlechts in der Ausprägung des Phänotyps auszuschließen, wurden alle weiteren Tests zur Charakterisierung als Trend- oder Querschnittsstudie im gleichen Geschlecht konzipiert, in denen zu jedem Zeitpunkt unterschiedliche Individuen analysiert worden sind.

Die homozygoten TBA2.1 wurden bis zu einem Alter von fünf Monaten untersucht, da sie unter Einhaltung des Tierschutzes im Alter von fünf Monaten getötet worden sind, siehe 3.2.1.1. Die heterozygoten TBA2.1 wurden bis zu einem Alter von 24 Monaten untersucht, da in den Gehirnen der heterozygoten TBA2.1 erst ab dem Alter von 21 Monaten erste Mengen an A β (x-42) und pEA β (3-42) auftraten (Alexandru, Jagla *et al.* 2011).

4.1.1.1 Primäre Untersuchung des SHIRPA-Tests

In der primären Untersuchung des SHIRPA-Tests wurden das Aussehen, das Verhalten und die Reflexe der TBA2.1 beobachtet und bewertet. Je höher der SHIRPA-Score ausfiel, desto größer waren die makroskopischen Beobachtungen in den einzelnen Kriterien in Bezug zum Wildtyp. Zusätzlich wurde im Rahmen der primären Untersuchung auch das Körpergewicht der Tiere bestimmt, siehe 3.2.2.1.

4.1.1.1.1 Panelstudie

Die erste Testung fand im Alter von zwei Monaten und darauffolgend alle vier Wochen bis zu einem Alter von fünf Monate der gleichen Individuen im gemischten Geschlecht statt. In der Beobachtung der homozygoten TBA2.1 konnte ab spätestens einem Alter von drei Monaten eine gekrümmte Haltung, ein bewegungsstarrer und unsicherer Gang, reduzierte Reflexe sowie vom Hinterleib beginnende, wellenartige Zuckungen festgestellt werden. Ab dem Alter von zwei Monaten konnte ein um mehr als das Vierfache erhöhter SHIRPA-Score in statistischer Signifikanz zum Wildtyp gemessen werden, der bis einschließlich zum Alter von fünf Monaten vorhanden war (zweifaktorielle Varianzanalyse im gemischten Modell, Genotyp ($F_{(2,25)} = 59,01$; $p \leq 0,001$), Interaktion mit dem Alter ($F_{(6,75)} = 20,30$, $p \leq 0,001$); gepaarter T-Test, WT vs. HOM $p \leq 0,001$, im Alter von 2 bis 5 Monaten). Die heterozygoten TBA2.1 wiesen keine signifikanten Auffälligkeiten im Vergleich zu den wildtypischen TBA2.1 auf (gepaarter T-Test, WT vs. HET, nicht signifikant (n.s.) im Alter von 2 bis 5 Monaten), siehe Abbildung 8A. In der Analyse des Gewichtes konnten in dem Zeitraum keine Unterschiede zwischen den drei Gruppen entdeckt werden (zweifaktorielle Varianzanalyse im gemischten Modell, Genotyp ($F_{(2,25)} = 0,51$; $p = 0,607$); gepaarter T-Test, jeweils für WT, HET und HOM, 2 vs. 3, 2 vs. 4, 2 vs. 5 Monate, n.s.), siehe Abbildung 8B.

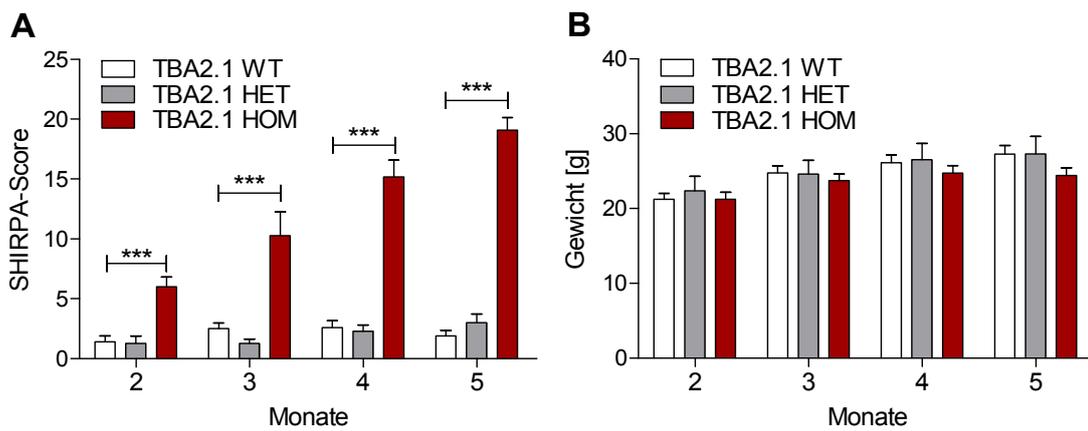


Abbildung 8: Primäre Untersuchung und Analyse des Körpergewichts der TBA2.1 in einer Panelstudie. In der primären Untersuchung des SHIRPA-Tests wurden das Aussehen, das Verhalten und die Reflexe von wildtypischen (WT), heterozygoten (HET) und homozygoten (HOM) TBA2.1 im Alter zwei bis fünf Monaten bewertet (A). Je höher der SHIRPA-Score bewertet wurde, desto größer waren die zu messenden Auffälligkeiten im Vergleich zum Wildtyp. Zu den gleichen Zeitpunkten wurde auch das Körpergewicht analysiert (B). In beiden Abbildungen sind die Mittelwerte + Standardfehler mit $***p \leq 0.001$ dargestellt.

4.1.1.1.2 Trendstudie

In der Trendstudie wurden zu jedem Zeitpunkt unterschiedliche TBA2.1-Männchen getestet. Die Beobachtungen der homozygoten TBA2.1 im Alter von zwei bis fünf Monaten ergaben spätestens ab einem Alter von drei Monaten die gleichen Auffälligkeiten wie in der Panelstudie: eine gekrümmte Haltung, einen bewegungsstarrten und unsicheren Gang, reduzierte Reflexe sowie vom Hinterleib beginnende Zuckungen. Ab dem Alter von zwei Monaten konnte ein um mehr als das Fünffache signifikant erhöhter SHIRPA-Score der homozygoten TBA2.1 im Vergleich zum Wildtyp detektiert werden. Das gleiche Verhältnis war auch im Alter von fünf Monaten messbar (zweifaktorielle Varianzanalyse, Genotyp ($F_{(2,99)} = 226,7$, $p \leq 0,0001$), Interaktion mit dem Alter ($F_{(6,99)} = 12,89$, $p \leq 0,0001$); Bonferroni-Test, WT. vs. HOM, $p \leq 0,001$ und WT vs. HET, n.s. im Alter von 2 bis 5 Monaten). Die Beobachtungen und die Analyse der heterozygoten TBA2.1 ergaben in dem Zeitraum keine signifikanten Auffälligkeiten (Bonferroni-Test, WT vs. HET, n.s. im Alter von 2 bis 5 Monaten), siehe Abbildung 9A. Erst ab einem Alter von 21 Monaten wurden auch in den heterozygoten TBA2.1 Unregelmäßigkeiten in der Haltung und im Gang deutlich.

Diese Unregelmäßigkeiten spiegelten einen um 85 % signifikant erhöhten SHIRPA-Score im Alter von 21 Monaten und einen um 41 % signifikant erhöhten SHIRPA-Score im Alter von 24 Monaten im Vergleich zu dem Wildtyp wieder (Kruskal-Wallis-Test, $p = 0,0012$, Mann-Whitney-Test, WT vs. HET, 18 Monate n.s., 21 und 24 Monate $p \leq 0,05$), siehe Abbildung 9B.

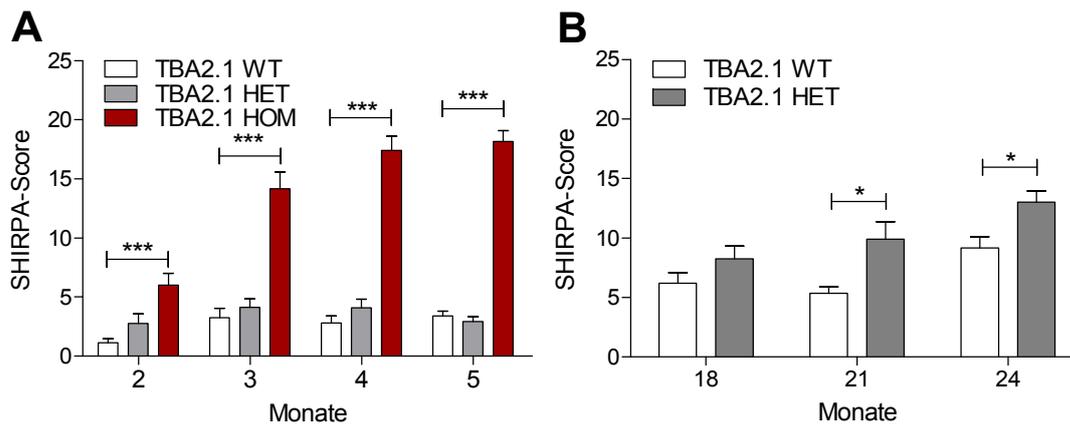


Abbildung 9: Primäre Untersuchung der TBA2.1 in einer Trendstudie. In der primären Untersuchung des SHIRPA-Tests wurden das Verhalten, das Aussehen und die Reflexe von wildtypischen (WT), heterozygoten (HET) und homozygoten (HOM) TBA2.1-Männchen im Alter zwei bis fünf Monaten (A) und 18 bis 24 Monaten (B) bewertet. Die Höhe des SHIRPA-Scores dokumentiert die Höhe der gemessenen Auffälligkeiten im Vergleich zum Wildtyp. In der Abbildung sind die Mittelwerte + Standardfehler mit *** $p \leq 0,001$ dargestellt.

Die Analyse der Körpergewichte ergab in dem Alter von drei, vier und fünf Monaten ein um bis zu 30 % reduziertes Gewicht der homozygoten TBA2.1-Männchen im Vergleich zum Wildtyp (zweifaktorielle Varianzanalyse, Genotyp ($F_{(2,98)} = 48,04$; $p \leq 0,0001$; Bonferroni-Test; WT vs. HOM, 3 Monate $p \leq 0,05$, 4 und 5 Monate $p \leq 0,001$, WT vs. HET n.s. von 2 bis 5 Monate), siehe Abbildung 10. Ab einem Alter von 21 Monaten zeigte sich auch ein um 25 % reduziertes Gewicht in den heterozygoten Tieren im Vergleich zum Wildtyp (zweifaktorielle Varianzanalyse, Genotyp ($F_{(1,40)} = 4,986$; $p = 0,0312$), Bonferroni-Test, WT vs. HET, 18 Monate n.s., 21 und 24 Monate $p \leq 0,05$)

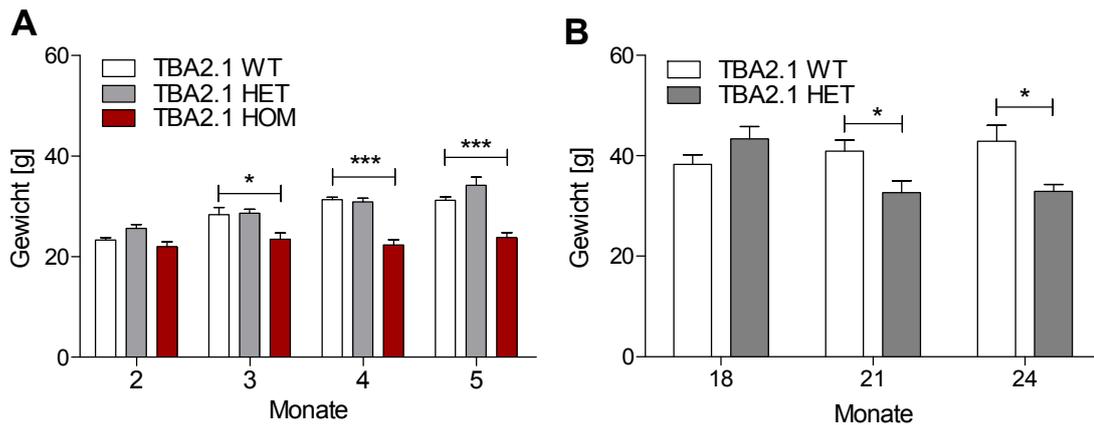


Abbildung 10: Analyse der Körpergewichte der TBA2.1 in einer Trendstudie. Innerhalb der primären Untersuchung wurde auch das Gewicht der wildtypischen (WT), heterozygoten (HET) und homozygoten (HOM) TBA2.1-Männchen im Alter von zwei bis fünf (A) und 18 bis 24 Monaten (B) gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardfehler und * $p \leq 0.05$ und *** $p \leq 0.001$.

4.1.1.2 Beschleunigter Rotarod-Test

Das motorische Lernverhalten und die motorische Koordination der TBA2.1-Tiere wurden in dem beschleunigten Rotarod-Test evaluiert. In diesem Test war es die Aufgabe der Tiere, sich auf einem rotierenden Zylinder in neun Durchläufen zu bewegen. Sind die Tiere von dem Zylinder heruntergefallen, wurde die Latenzzeit gestoppt. Die Latenzzeit wurde als Maß der motorischen Koordination genutzt und die maximale Zeit pro Durchgang betrug 10 Minuten.

4.1.1.2.1 Panelstudie

Das motorische Lernverhalten und die motorische Koordination der TBA2.1 im gemischten Geschlecht wurden im Alter von zwei bis fünf Monaten in einer Panelstudie evaluiert. Wie bereits in 4.1.1.1.1 beschrieben, wurden die Mäuse erstmalig im Alter von zwei Monaten und darauffolgend alle vier Wochen bis zum Alter von fünf Monaten analysiert. Zuerst wurde das motorische Lernverhalten pro Zeitpunkt in der Betrachtung der neun Durchgänge als Verlauf untersucht. Die homozygoten Tiere wiesen in den Altern zwei, drei und vier Monate ein reduziertes, motorisches Lernverhalten auf. Im Alter von fünf Monaten war kein Unterschied detektierbar (Friedman-Test, im Alter 2, 3 und 4 Monate: jeweils $p \leq 0,001$, 5 Monate: $p = 0,0158$; Dunn-Test, WT vs HET, n.s. im Alter von 2 bis

5 Monaten; WT vs. HOM im Alter 2 Monate: $p \leq 0,0001$, im Alter 3 Monate: $p \leq 0,01$, im Alter 4 Monate: $p \leq 0,05$, im Alter 5 Monate n.s.), siehe Abbildung 11A-D.

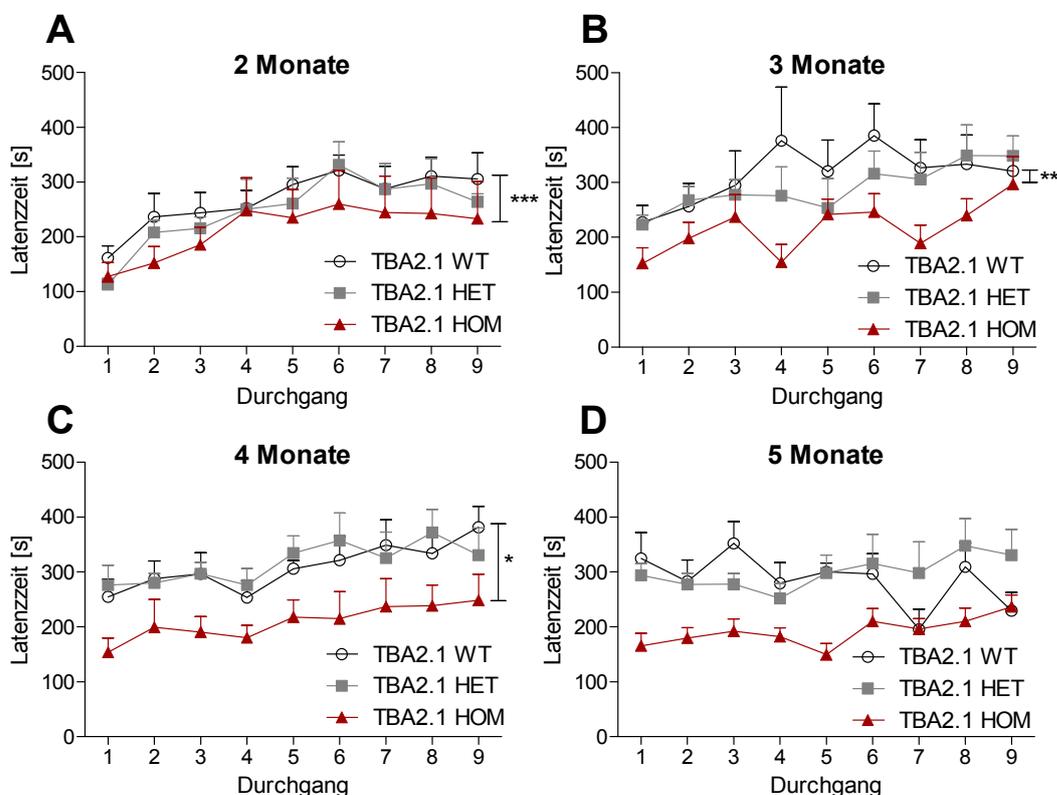


Abbildung 11: Motorisches Lernverhalten der TBA2.1 in einer Panelstudie Das motorische Lernverhalten der wildtypischen (WT), heterozygoten (HET) und homozygoten (HOM) TBA2.1 wurde im beschleunigten Rotarod-Test im Alter von zwei (A), drei (B), vier (C) und fünf Monaten (D) ermittelt. Dazu liefen die Tiere in neun Durchgängen auf einem rotierenden Zylinder. Sind die Tiere heruntergefallen, wurde die Latenzzeit gemessen und als Maß der motorischen Koordination ausgewertet. In den Abbildungen 9A–D sind die neun Durchgänge der wildtypischen, heterozygoten und homozygoten TBA2.1-Mäuse als Mittelwert + Standardfehler pro Zeitpunkt mit * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$ dargestellt.

Nachfolgend wurde die durchschnittliche, motorische Koordination der TBA2.1 im Zeitraum zwei bis fünf Monate in einer Panelstudie analysiert. Dazu wurde der Mittelwert der neun Durchgänge genutzt. Ab einem Alter von drei Monaten zeigte sich eine um mehr als 31 % signifikant verringerte, motorische Koordination der homozygoten TBA2.1 (zweifaktorielle Varianzanalyse im gemischten Modell, Genotyp ($F_{(2,75)} = 3,59$; $p = 0,043$); T-Test, WT vs. HET, im Alter von 2 bis

5 Monaten n.s., WT vs. HOM, im Alter von 2 Monaten n.s., im Alter von 3, 4 und 5 Monaten jeweils $p \leq 0,05$), siehe Abbildung 12.

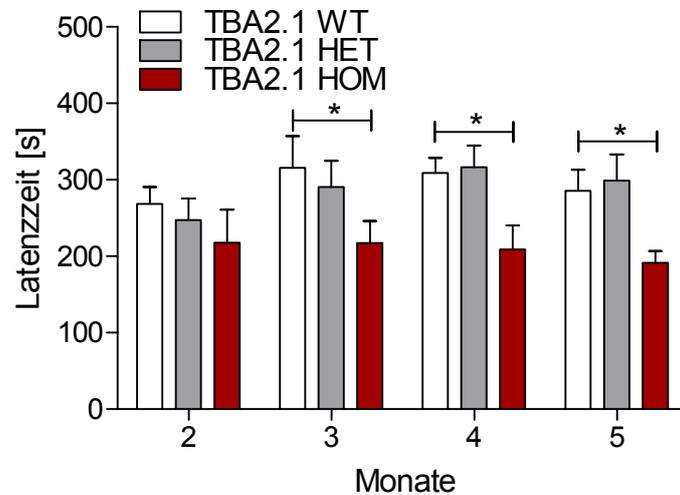


Abbildung 12: Durchschnittliche, motorischen Koordination der TBA2.1 in einer Panelstudie. Die durchschnittliche, motorische Koordination der wildtypischen (WT), heterozygoten (HET) und homozygoten (HOM) TBA2.1 wurde im beschleunigten Rotarod-Test im Alter von zwei bis fünf Monate in einer Panelstudie überprüft. In diesem Test hatten die Tiere die Aufgabe, sich in einem vorherigen Training und in neun Durchgängen auf einem rotierenden Zylinder zu bewegen. Sind die Tiere vom Zylinder heruntergefallen, wurde die Zeit gemessen. In dieser Darstellung wurden die durchschnittliche, motorische Koordination als Mittelwerte + Standardfehler mit $*p \leq 0,05$ dargestellt.

4.1.1.2.2 Trendstudie

Das motorische Lernverhalten der wildtypischen, heterozygoten und homozygoten Männchen wurde zusätzlich in einer Trendstudie untersucht. Dazu wurden zu jedem Zeitpunkt unterschiedliche Individuen getestet. Im Alter von zwei und vier Monaten konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen detektiert werden (Friedman-Test, n.s., Dunn-Test, WT vs. HOM im Alter 2 Monate und 4 Monate n.s.). Im Alter von 3 und 5 Monaten war hingegen die motorische Koordination der homozygoten Tiere reduziert (Friedman-Test, 3 Monate $p \leq 0,05$ und 5 Monate $p \leq 0,0002$; Dunn-Test, WT vs. HOM, im Alter 3 Monate $p \leq 0,05$ und im Alter 5 Monate $p \leq 0,01$), siehe Abbildung 13.

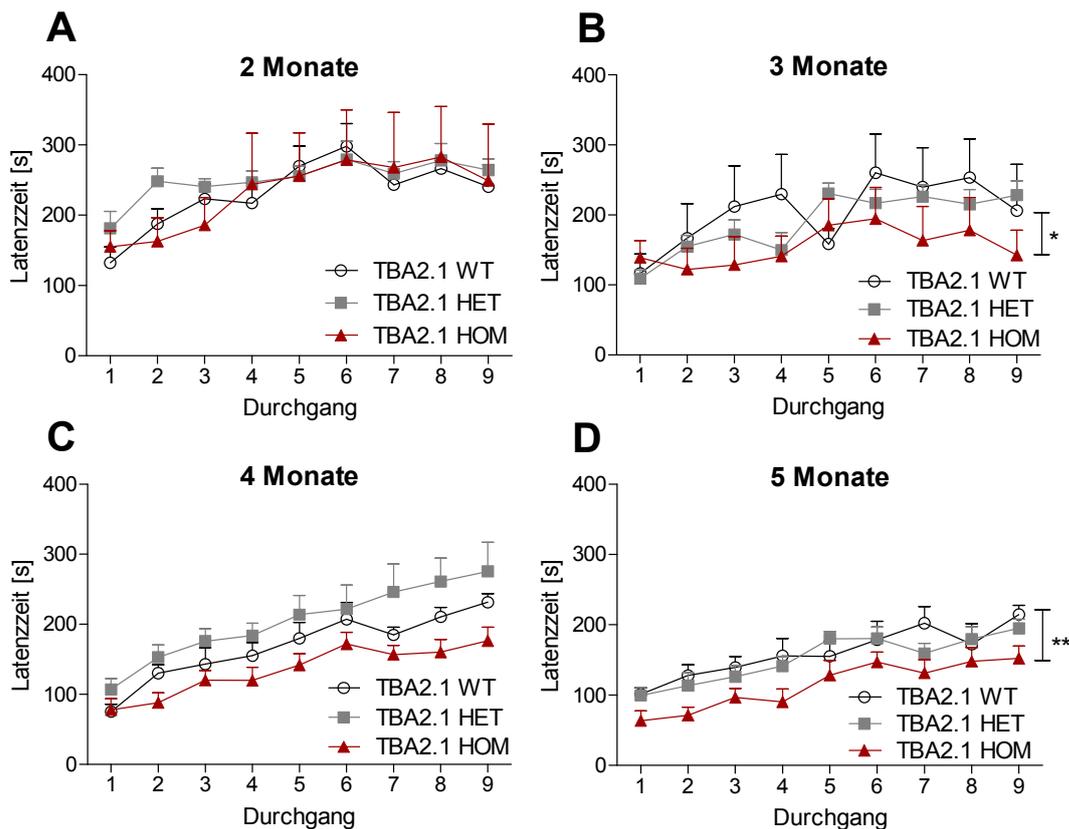


Abbildung 13: Motorisches Lernverhalten der TBA2.1 im Alter von zwei bis fünf Monaten in einer Trendstudie. Es wurde das motorische Lernverhalten von wildtypischen (WT), heterozygoten (HET) und homozygoten (HOM) TBA2.1 im beschleunigten Rotarod-Test überprüft. Fielen die Tiere herunter wurde die Latenzzeit gestoppt. Dargestellt sind die neun Durchgänge im Alter von zwei bis fünf Monaten als Mittelwert + Standardfehler pro Zeitpunkt mit * $p \leq 0.05$ und ** $p \leq 0.01$.

Das motorische Lernverhalten der heterozygoten TBA2.1 wies weder im Alter von zwei bis fünf Monaten (Abbildung 13, Dunn-Test, WT vs. HET, im Alter von 2 bis 5 Monaten n.s.) noch im Alter von 18 bis 24 Monaten (Friedman-Test, $p \leq 0,0001$, Dunn-Test, WT vs. HET, im Alter von 18 bis 24 Monaten n.s.) signifikante Unterschiede zum Wildtyp auf, siehe Abbildung 14.

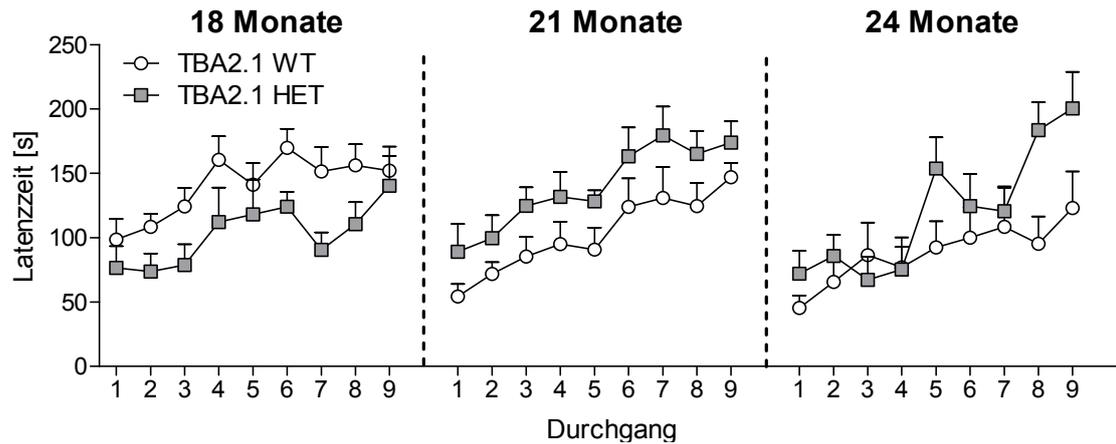


Abbildung 14: Motorisches Lernverhalten der heterozygoten TBA2.1 im Alter von 18 bis 24 Monaten. Wildtypische (WT) und heterozygote (HET) TBA2.1 wurden im Alter von 18 bis 24 Monaten im beschleunigten Rotarod-Test auf ihre motorische Koordination überprüft. Die Tiere liefen dazu in neun Durchgängen auf einem rotierenden Zylinder. Sind die Tiere heruntergefallen, wurde die Latenzzeit gemessen, die pro Durchgang als Mittelwert + Standardfehler dargestellt ist.

Zusätzlich zum motorischen Lernverhalten wurde die durchschnittliche, motorische Koordination der wildtypischen, heterozygoten und homozygoten TBA2.1 in einer Trendstudie analysiert. Weder im Alter von zwei bis fünf Monaten (Kruskal-Wallis-Test, $p = 0,5836$; Dunn-Test, WT vs. HET sowie WT vs. HOM, im Alter von 2 bis 5 Monaten n.s.) noch im Alter von 18 bis 24 Monate (einfaktorielle Varianzanalyse, Genotyp ($F_{(5,44)} = 2,426$, $p = 0,0523$); Bonferroni-Test, WT vs. HET, im Alter von 18 bis 24 Monaten n.s.) konnten signifikante Unterschiede zwischen dem Wildtyp und den hetero- bzw. homozygoten TBA2.1 gemessen werden, siehe Abbildung 15.

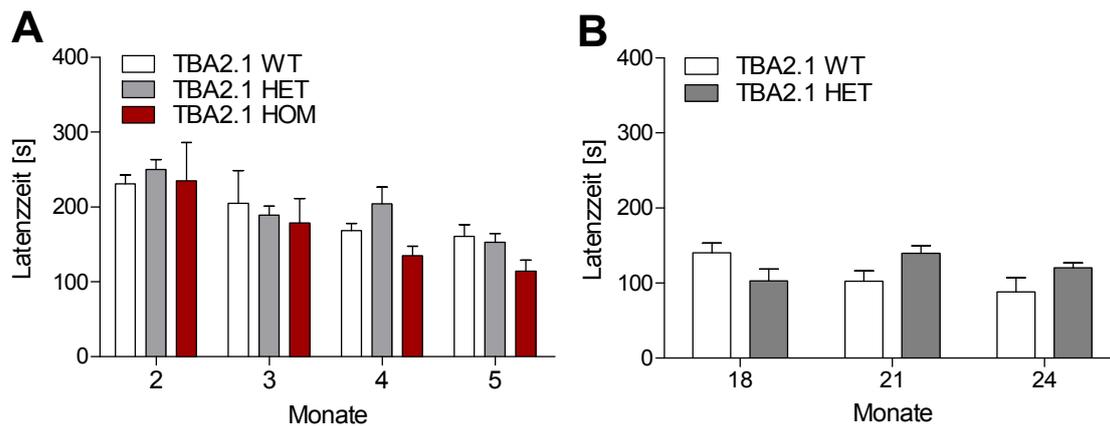


Abbildung 15: Motorische Koordination der TBA2.1 in einer Trendstudie. Die durchschnittliche, motorische Koordination wurde im beschleunigten Rotarod-Test von wildtypischen (WT), heterozygoten (HET) und homozygoten (HOM) TBA2.1 im Alter von zwei bis fünf Monaten (A) und 18 bis 24 Monaten (B) evaluiert. In diesem Test liefen die Tiere in neun Durchgängen pro Alter auf einem rotierenden Zylinder. Sind die Tiere heruntergefallen, wurde die Latenzzeit gestoppt. Die durchschnittliche, motorische Koordination pro Alter wurde als Mittelwert + Standardfehler dargestellt.

4.1.1.3 Greifstärke-Test

Die Greifstärke der männlichen TBA2.1 wurde im Greifstärke-Test in einer Querschnittsstudie gemessen. Dazu wurden die TBA2.1-Mäuse mit den Vorderpfoten an ein Zugsystem geführt, an dem sie sich intuitiv festgehalten haben. Im Anschluss wurden sie kontinuierlich vom Zugsystem weggeführt bis die TBA2.1 losgelassen haben. Die applizierte, maximale Greifstärke auf das Zugsystem wurde über einen Signalverstärker innerhalb des Gerätes gemessen. Im Alter von fünf Monaten besaßen die homozygoten TBA2.1 eine um 28 % signifikant erniedrigte Greifstärke im Vergleich zum Wildtyp. Die Greifstärke der heterozygoten TBA2.1 war nicht betroffen (einfaktorielle Varianzanalyse, Genotyp ($F_{(2,25)} = 5.020$, $p = 0.0147$; Bonferroni-Test WT vs. HET n.s., WT vs. HOM $p \leq 0,05$, im Alter von 5 Monaten), siehe Abbildung 16A. Auch im Alter von 18 bis 24 Monaten konnte keine Beeinträchtigung der Greifstärke der heterozygoten TBA2.1 gemessen werden (zweifaktorielle Varianzanalyse n.s., Bonferroni-Test, WT vs. HET n.s., im Alter von 18 bis 24 Monaten), siehe Abbildung 16B.

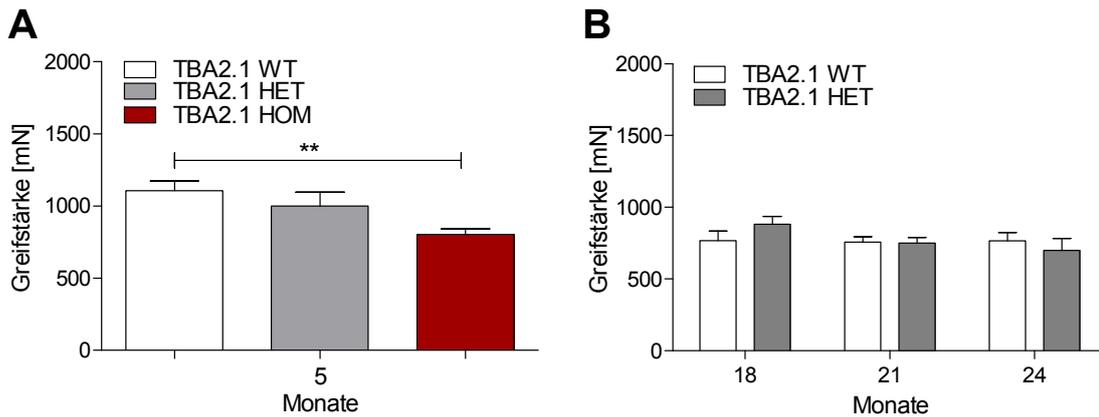


Abbildung 16: Greifstärke der TBA2.1 im Alter von fünf und 18 bis 24 Monaten. Es wurde die maximale Greifstärke der Vorderpfoten der TBA2.1 im Greifstärke-Test gemessen. Es wurden wildtypische (WT), heterozygote (HET) und homozygote TBA2.1 (HOM) im Alter von fünf Monaten (A) und 18 bis 24 Monaten (B) untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardfehler mit $**p \leq 0.01$.

4.1.1.4 Modifizierter Stabtest

Zur Untersuchung von Basalganglien-assoziierten Bewegungsstörungen wurden die TBA2.1 im modifizierten Stabtest untersucht. Im diesem Test wurde eine 50 cm hohe Stange genutzt, dessen Fuß in 4 cm Streu eingebettet wurde. Die TBA2.1 wurden mit dem Kopf nach unten auf die Stange platziert, die es galt in drei Durchgängen hinunterzulaufen. Jeder Durchgang wurde von null bis drei bewertet und als summierter Stabtest-Score analysiert. Je höher der Stabtest-Score gemessen wurde, desto weniger war ein kontinuierlicher Lauf möglich. Im Alter von fünf Monaten wiesen die homozygoten TBA2.1 einen um mehr das 12-fache erhöhten Stabtest-Score im Vergleich zum Wildtyp auf (Kruskal-Wallis-Test, $p \leq 0,0001$, Dunn-Test, WT vs. HOM $p \leq 0,001$, WT vs. HET n.s., im Alter von 5 Monaten), siehe Abbildung 17A. Der Stabtest-Score der heterozygoten TBA2.1 war im Vergleich zu dem der Wildtypen sowohl im Alter von fünf Monaten (Dunn-Test, WT vs. HET n.s.) als auch im Alter von 18 bis 24 Monaten (Kruskal-Wallis-Test, $p = 0,3551$, Dunn-Test, WT vs. HET, im Alter von 18 bis 24 Monaten jeweils n.s.) nicht signifikant unterschiedlich, siehe Abbildung 17B.

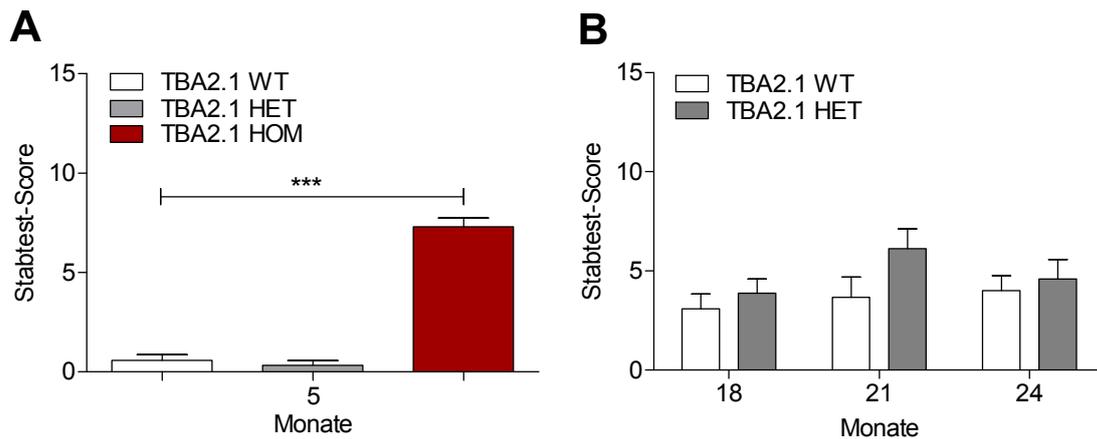


Abbildung 17: Analyse des modifizierter Stabtest von wildtypischen, heterozygoten und homozygoten TBA2.1. In dem modifizierten Stabtest wurden wildtypische (WT), heterozygote (HET) und homozygote (HOM) TBA2.1 auf Basalganglien-assoziierte Bewegungsstörungen im Alter von fünf Monaten (A) und im Alter von 18 bis 24 Monaten (B) untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardfehler mit *** $p \leq 0.001$.

4.1.2 Analyse der Amyloid-Pathologie

Zur Charakterisierung der Pathologie wurden die A β -Ablagerungen und die Konzentration von pEA β (3-42) in den Gehirnen von fünf Monate alten wildtypischen und homozygoten TBA2.1 in einer Querschnittstudie bestimmt.

4.1.2.1 Immunfluoreszenz der amyloiden Ablagerungen

Für die Analyse der A β -Ablagerungen wurden 10 μ m dicke Hirnschnitte von fünf Monate alten wildtypischen und homozygoten TBA2.1 mit dem Antikörper 6E10, der N-terminal A β (1-16) detektiert, auf Immunfluoreszenzbasis gefärbt, digitalisiert und quantifiziert, siehe 3.2.3 In den homozygoten TBA2.1 wurden Ablagerungen von A β im Kortex, Hippokampus, im Striatum und vor allem im Mittelhirn gefunden. Im Wildtyp wurden dagegen keine spezifischen Ablagerungen erkannt, siehe Abbildung 18A.

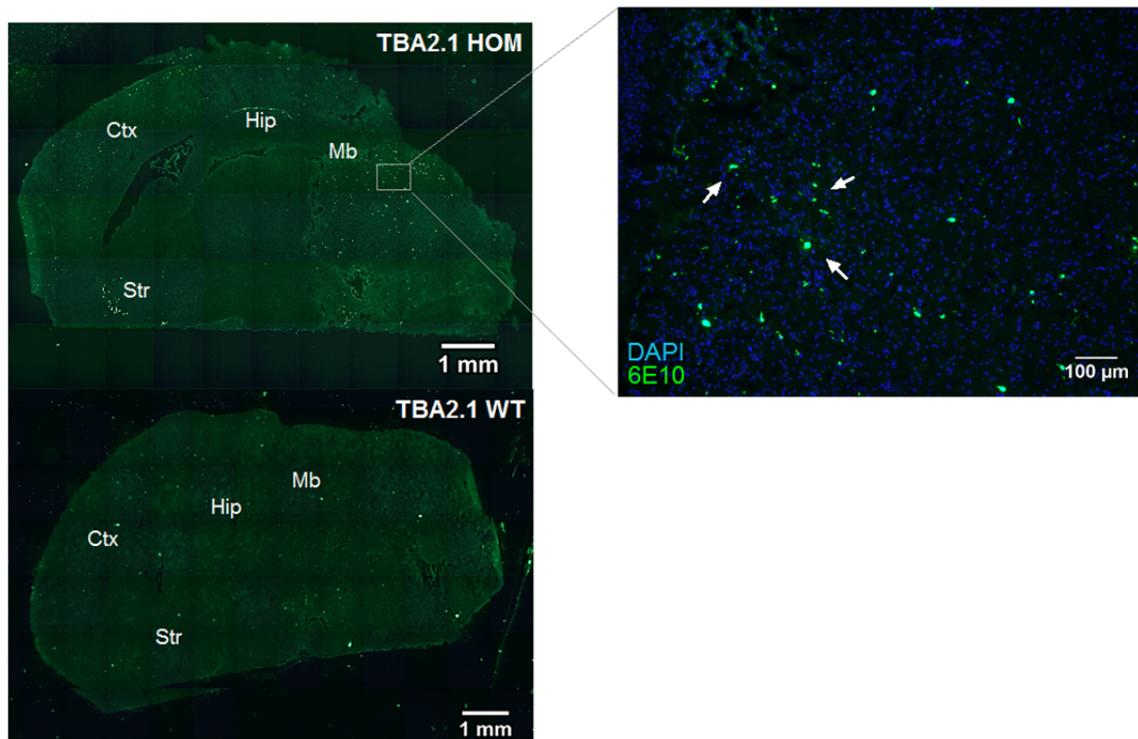


Abbildung 18: Immunfluoreszenz von A β -gefärbten wildtypischen und homozygoten TBA2.1 Es wurden 10 μ m dicke Hirnschnitte von wildtypischen (WT) und homozygoten TBA2.1 (HOM) im Alter von fünf Monaten gefärbt. In der Abbildung ist links jeweils exemplarisch eine gefärbte Hemisphäre mit dem Antikörper 6E10 von einem wildtypischen und einem homozygoten TBA2.1-Tier abgebildet. Im Gehirn von homozygoten TBA2.1 wurden Aggregate im Kortex (Cx), Striatum (Str), Hippokampus (Hip), und im Mittelhirn (Mb) detektiert. Die gefärbten Partikel in der Hemisphäre des Wildtyps konnten als Artefakte identifiziert werden. Rechts in der Abbildung ist ein 20 x vergrößerter Ausschnitt aus dem Bereich des Mittelhirns zu erkennen. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt.

Die A β -gefärbte Fläche der Hemisphäre einer homozygoten TBA2.1 betrug im Durchschnitt $0,16 \pm 0,02$ % der Gesamtfläche, die sich signifikant von der Hemisphäre eines Wildtypen unterschied (Mann-Whitney-Test, WT vs. HOM, $p = 0,0022$, im Alter von 5 Monaten), siehe Abbildung 19A. Die durchschnittliche Anzahl betrug $913,50 \pm 145,37$ Partikel pro Hemisphäre in statistischer Signifikanz zum Wildtyp (Mann-Whitney-Test, WT vs. HOM, $p = 0,0022$ im Alter von fünf Monaten), siehe Abbildung 19B. Die durchschnittliche Fläche eines gefärbten Partikels betrug $70,68 \pm 5,28$ μm^2 und besaß einen Durchmesser von durchschnittlich $10,38 \pm 0,34$ μm .

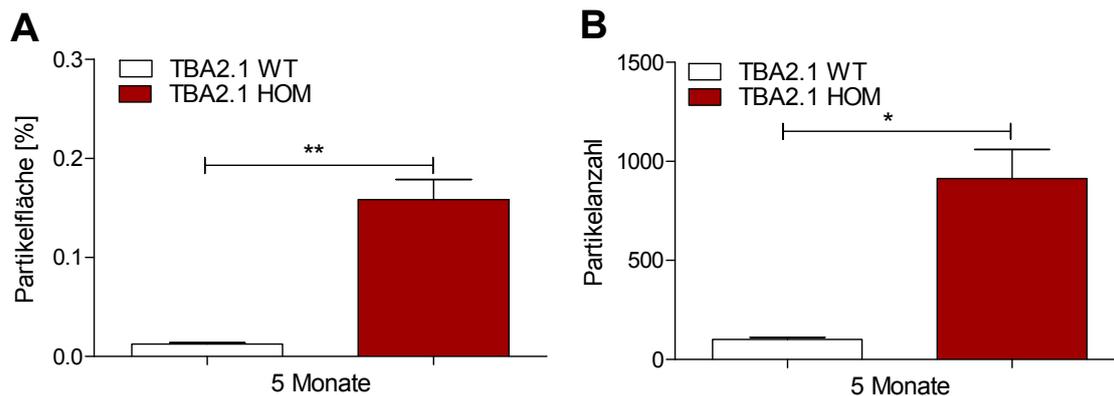


Abbildung 19: Quantifizierung von Hirnschnitten homozygoter TBA2.1 Hirnschnitte von 5 Monate alten wildtypischen (WT) und homozygoten TBA2.1 (HOM) wurden gefärbt und quantifiziert. Dargestellt ist die gefärbte Partikelfläche (A) und die Anzahl der gefärbten Partikel (B) als Mittelwert + Standardfehler mit * $p \leq 0,05$ und ** $p \leq 0,01$ dargestellt.

4.1.2.2 Biochemische Quantifizierung von pEA β (3-42) in TBA2.1-Gehirnen

Zusätzlich zu den Ablagerungen von A β wurde auch die Konzentration von pEA β (3-42) in den Gehirnen von fünf Monate alten wildtypischen und homozygoten TBA2.1 biochemisch bestimmt. Dazu wurde die DEA-lösliche und unlösliche Fraktion aus Hirnhomogenaten isoliert und in einem spezifischen pEA β (3-42)-ELISA quantifiziert, siehe 3.2.3. Die Analyse der DEA-löslichen Fraktion von homozygoten TBA2.1 ergab eine Konzentration von $1,15 \pm 0,26$ ng/ml pEA β (3-42) in statistischer Signifikanz zum Wildtyp (T-Test, WT vs. HOM, $p \leq 0,0001$, im Alter von fünf Monaten), siehe Abbildung 20A. Die unlösliche Fraktion der homozygoten TBA2.1 beinhaltete $32,28 \pm 4,24$ ng/ml pEA β (3-42), die sich signifikant vom Wildtyp unterschied (T-Test, WT vs. HOM, $p = 0,0390$, im Alter von fünf Monaten), siehe Abbildung 20

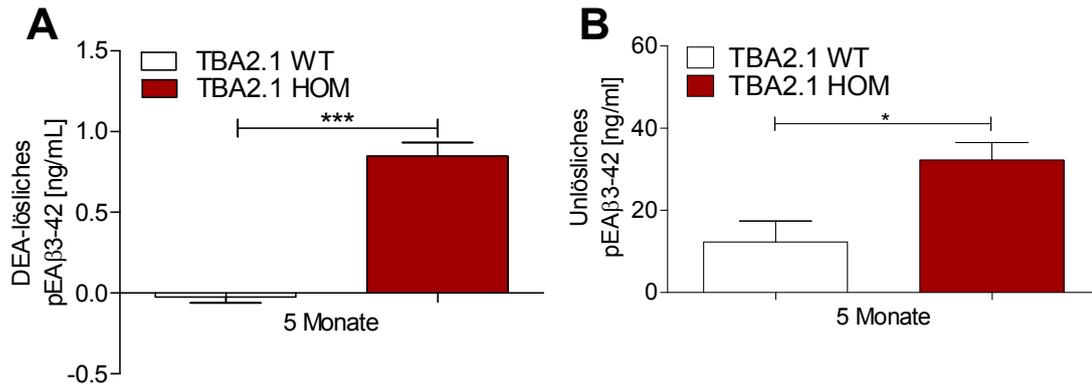


Abbildung 20: Biochemische Quantifizierung von pEA β (3-42) in der DEA-löslichen und unlöslichen Fraktion. Zur Bestimmung der DEA-löslichen (A) und unlöslichen Fraktion (B) wildtypischer (WT) und homozygoter (HOM) TBA2.1-Gehirne wurden diese in einem pEA β (3-42)-spezifischen ELISA analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert + Standardfehler mit * $p \leq 0.05$ und *** $p \leq 0.001$.

4.2 Intraperitoneale Behandlung mit D3 und D3D3

In der Charakterisierung der TBA2.1 konnte in den homozygoten Mäusen ein früh beginnender und progressiver Phänotyp festgestellt werden. Dieser zeigte sich durch Auffälligkeiten im Erscheinungsbild, durch eine defizitäre Motorik, durch zerebrale, A β -Ablagerungen und durch eine erhöhte Konzentration von pEA β (3-42) im Gehirn. In den heterozygoten Tieren konnte hingegen ein anfänglich, geringer ausgeprägter Phänotyp ab dem Alter von 21 Monaten festgestellt werden, siehe 4.1. Aus diesem Grund wurden die homozygoten TBA2.1 ausgewählt, um die potentiellen Wirkstoffkandidaten D3 und D3D3 im Vergleich zu Placebo (PBS) auf ihre therapeutische Wirkung im TBA2.1-Modell zu testen, siehe 3.2.4.

Die größten Auffälligkeiten wurden im Alter von fünf Monaten in der primären Untersuchung des SHIRPA-Tests deutlich. Aus diesem Grund wurden die Tiere im Alter von vier Monaten zur Behandlung ausgewählt. Basierend auf den bisherigen Behandlungsstudien mit D3 wurde die Dosis von 0,1 mg pro Tag über vier Wochen, appliziert durch eine osmotische Minipumpe, gewählt (Funke, van Groen *et al.* 2010). Um unspezifische Effekte durch D3 und D3D3 auszuschließen, wurden zu den gleichen Bedingungen wildtypische TBA2.1

behandelt. Die Evaluation der therapeutischen Wirkung der D-Peptide auf den Phänotyp der homozygoten TBA2.1 erfolgte in der primären Untersuchung des SHIRPA-Tests und im beschleunigten Rotarod-Test. Die Untersuchung eines möglichen Effekts auf die Pathologie wurde durch immunfluoreszenzbasierende Färbungen von A β und durch die biochemische Quantifizierung von pEA β (3-42) realisiert.

4.2.1 Einfluss der D-Peptide D3 und D3D3 auf den Phänotyp der TBA2.1

Um die therapeutische Wirkung von D3 und D3D3 auf den sensomotorischen Phänotyp zu untersuchen, wurden die Tiere vor und nach der Behandlung in der primären Untersuchung des SHIRPA-Tests analysiert. In diesem Test wurde das Erscheinungsbild, das Verhalten und die Reflexe untersucht und bewertet. Je höher der SHIRPA-Score vergeben wurde, desto größer waren die zu messenden Auffälligkeiten. Nach der Behandlung der homozygoten TBA2.1 konnte ein um mehr als 26 % signifikant erhöhter SHIRPA-Score in der Placebo- und in der D3-behandelten Gruppe im Vergleich zu vor der Behandlung festgestellt werden (zweifaktorielle Varianzanalyse im gemischten Modell, Vorher/Nachher ($F_{(1,20)} = 11,70$; $p = 0,0027$); gepaarter T-Test Placebo vorher vs. Placebo nachher, $p \leq 0,05$, D3 vorher vs. D3 nachher, $p \leq 0,05$). In der D3D3-behandelten Gruppe wurde kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu vor der Behandlung identifiziert (gepaarter T-Test, D3D3 vorher vs. D3D3 nachher, n.s.), siehe Abbildung 21A. Die Behandlung der wildtypischen TBA2.1 mit Placebo, D3 und D3D3 zeigte keine Unterschiede im Vorher-Nachher-Vergleich (Mann-Whitney-Test, vorher vs. nachher, n.s. in allen drei Gruppen), siehe Abbildung 21B.

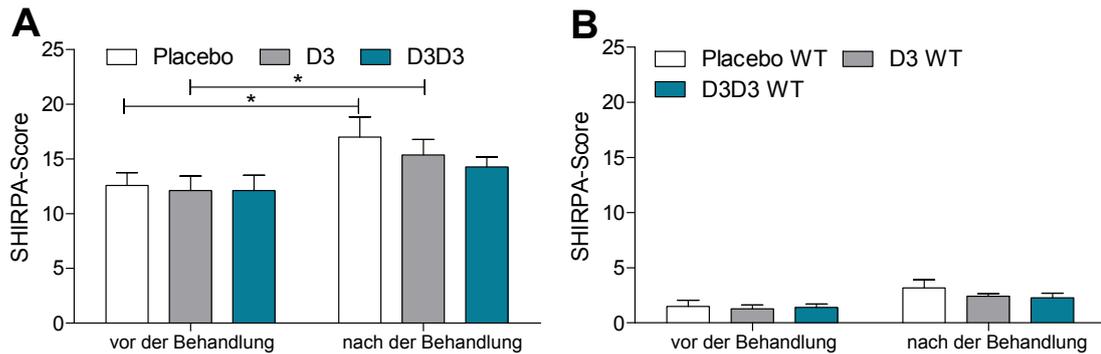


Abbildung 21: Primäre Untersuchung von Placebo-, D3- und D3D3-behandelten TBA2.1 Homozygote (HOM, A) und wildtypische (WT, B) TBA2.1 wurden mit 0,1 mg pro Tag D3, D3D3 oder Placebo (PBS) über vier Wochen behandelt. Die Tiere wurden vor und nach der Behandlung in der primären Untersuchung des SHIRPA-Tests auf das äußere Erscheinungsbild, das Verhalten und die Reflexe untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler mit * $p \leq 0.05$.

Die Analyse des Körpergewichts ergab im Vorher-Nachher-Vergleich keine signifikanten Gewichtszunahmen oder –abnahmen durch die Behandlung mit Placebo und D3 (zweifaktorielle Varianzanalyse im gemischten Modell, Vorher/Nachher ($F_{(1,20)} = 8,72$; $p = 0,0079$); gepaarter T-Test, Placebo vorher vs. Placebo nachher sowie D3 vorher vs. D3 nachher, n.s.). Die Behandlung mit D3D3 bewirkte im Gegensatz dazu eine signifikante Gewichtszunahme von ca. 5 % des Gewichtes vor der Behandlung (gepaarter T-Test, D3D3 vorher vs. D3D3 nachher, $p \leq 0,05$), siehe Abbildung 22A. Die Analyse des Körpergewichts der wildtypischen TBA2.1 ergab eine signifikante Erhöhung in der Placebo- und D3D3-behandelten Gruppe. Im Vorher-Nachher-Vergleich war keine Gewichtsänderung in der D3-behandelten Gruppen festzustellen (zweifaktorielle Varianzanalyse im gemischten Modell, Vorher/Nachher ($F_{(1,17)} = 13,04$; $p = 0,0022$); gepaarter T-Test, D3 vorher vs. D3 nachher, n.s.). Die Gewichtszunahme der Placebo-behandelten Tiere betrug ca. 6 % und die der D3D3-behandelten Tiere ca. 7 % (gepaarter T-Test, Placebo vorher vs. Placebo nachher $p \leq 0,05$, D3D3 vorher vs. D3D3 nachher $p \leq 0,01$), siehe Abbildung 22B.

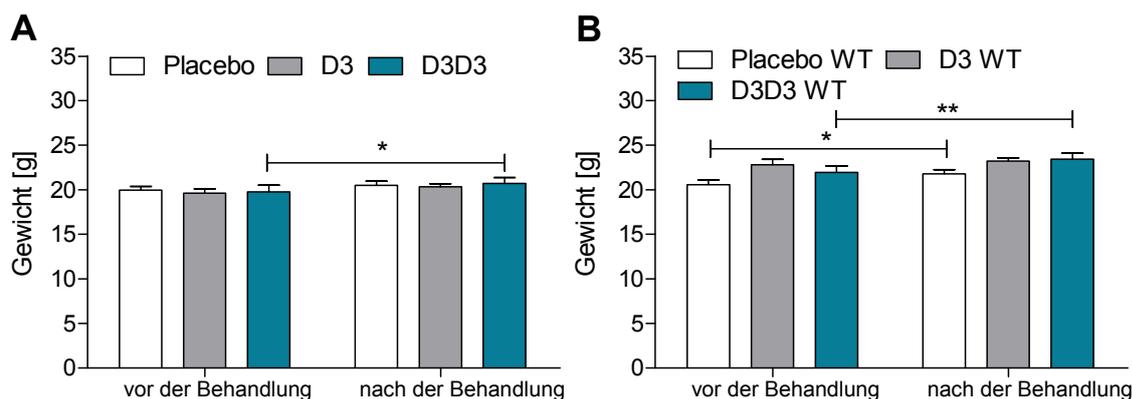


Abbildung 22: Körpergewichte vor und nach der Behandlung mit Placebo, D3 und D3D3. Die Körpergewichte vor und nach der Behandlung mit Placebo, D3 und D3D3 von homozygoten (A) und wildtypischen (HOM) TBA2.1 sind abgebildet. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardfehler und * $p \leq 0.05$ und ** $p \leq 0.01$ dargestellt.

4.2.2 Einfluss der D-Peptide D3 und D3D3 auf die motorische Koordination

Die therapeutische Wirkung von D3 und D3D3 auf die motorische Koordination der wildtypischen und der homozygoten TBA2.1 wurde ebenfalls im beschleunigten Rotarod-Test überprüft. Der Test erfolgte vor und nach der Behandlung und bestand daraus, dass die Tiere auf einem rotierenden, beschleunigten Zylinder liefen, bis sie herunterfielen. Die gemessene Latenzzeit wurde im Durchschnitt analysiert. Homozygote mit Placebo behandelte TBA2.1 wiesen eine um 31 % signifikant reduzierte, motorische Koordination auf (zweifaktorielle Varianzanalyse im gemischten Modell, Vorher/Nachher ($F_{(1,20)} = 2,76$; $p = 0,1122$); gepaarter T-Test, Placebo vorher vs. Placebo nachher, $p \leq 0,05$). In der mit D3- und D3D3-behandelten, homozygoten Gruppe konnten keine signifikanten Veränderungen der motorischen Koordination gemessen werden (gepaarter T-Test, D3 vorher vs. D3 nachher sowie D3D3 vorher sowie D3D3 nachher, n.s.), siehe Abbildung 23A. Die Behandlung der wildtypischen TBA2.1 wies keine Unterschiede auf (Mann-Whitney-Test, vorher vs. nachher, n.s in allen drei Gruppen), siehe Abbildung 23B.

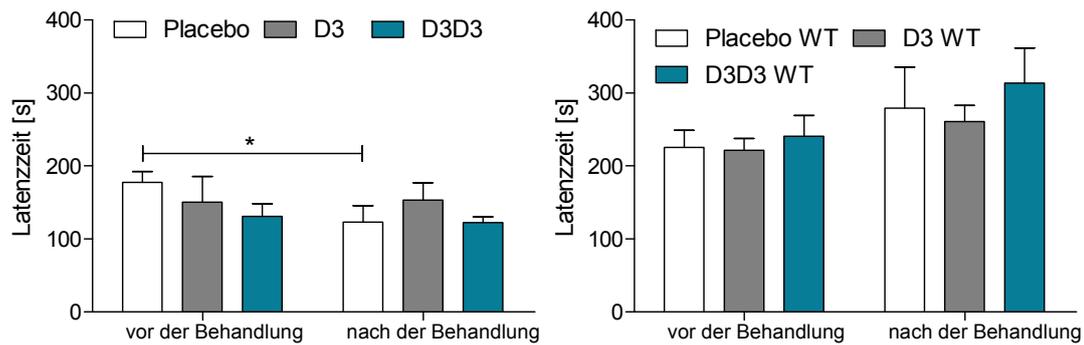


Abbildung 23: Motorische Koordination vor und nach der Behandlung mit Placebo, D3 und D3D3. Die motorische Koordination von homozygoten (A) und wildtypischen TBA2.1 (WT) (B) wurde vor und nach der Behandlung mit Placebo, D3 und D3D3 im beschleunigten Rotarod-Test evaluiert. Dazu liefen die Tiere auf einem rotierenden Zylinder bis sie heruntergefallen sind. Dargestellt ist die durchschnittliche Latenzzeit aller Durchgänge (Mittelwert + Standardfehler) und $*p \leq 0.05$.

4.2.3 Einfluss der D-Peptide D3 und D3D3 auf die A β -Ablagerungen

Die therapeutische Wirkung von D3 und D3D3 auf die A β -Ablagerungen der homozygoten TBA2.1 wurde mittels immunfluoreszenzbasierender Färbungen untersucht. Dazu wurden nach der Behandlung die Gehirne gesammelt, geschnitten und alle A β -haltigen Aggregate mit dem Antikörper 6E10 angefärbt. Die gefärbten Hirnschnitte der behandelten TBA2.1 zeigten Ablagerungen von A β im Striatum, im Mittelhirn, im Hippokampus und vereinzelt im Hirnstamm sowie im Kortex. In der Analyse der gefärbten Partikelgröße konnten keine Unterschiede zwischen den drei Gruppen gemessen werden (einfaktorielle Varianzanalyse, $p = 0,6184$, Bonferroni-Test, Placebo vs. D3 sowie Placebo vs. D3D3, n.s.), siehe Abbildung 24A. Ebenso konnten in der Partikelanzahl keine signifikanten Unterschiede detektiert werden (einfaktorielle Varianzanalyse, $p = 0,1774$, Bonferroni-Test, Placebo vs. D3 sowie Placebo vs. D3D3, n.s.), siehe Abbildung 24B.

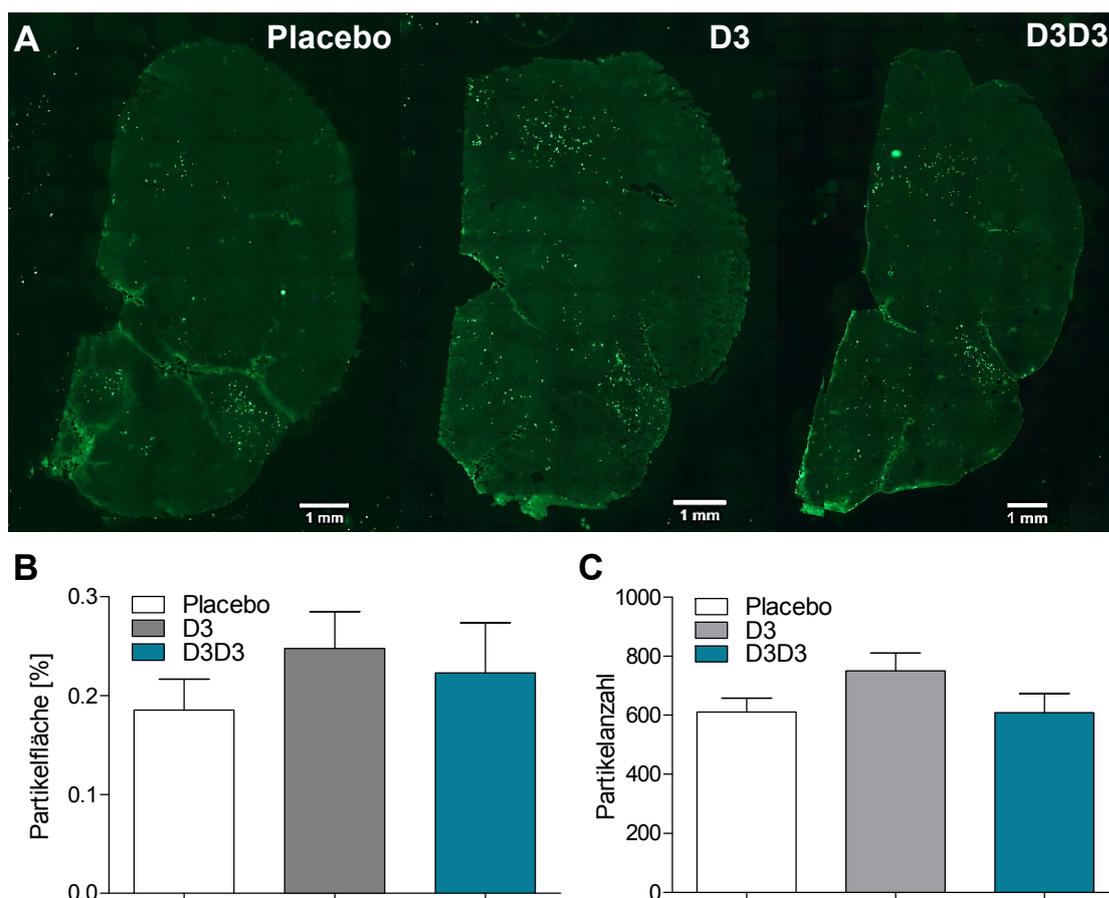


Abbildung 24: A β -Ablagerungen nach der Behandlung mit Placebo, D3 und D3D3. Es wurden die zerebralen Ablagerungen von A β homozygoter TBA2.1 mit dem Antikörper 6E10 nach der Behandlung mit Placebo, D3 und D3D3 angefärbt. Jeweils eine gefärbte Hemisphäre des Gehirns pro Behandlung ist exemplarisch dargestellt (A). Anhand dieser Färbungen wurden die gefärbte Partikelfläche (B) und die Partikelanzahl (C) quantifiziert und als Mittelwerte + Standardfehler mit dargestellt.

4.2.4 Einfluss der D-Peptide D3 und D3D3 auf die pEA β (3-42)-Konzentration

Zusätzlich zur Bestimmung der A β -Ablagerungen wurde die Wirkung von D3 und D3D3 auf die pEA β (3-42)-Konzentration im Gehirn überprüft. Dazu wurde die DEA-lösliche und die unlösliche Fraktion aus Hirnhomogenaten von homozygoten TBA2.1 extrahiert und in einem spezifischen pEA β (3-42)-ELISA biochemisch quantifiziert. Die Behandlung mit D3D3 bewirkte eine signifikante Erhöhung um 265 % von pEA β (3-42) in der DEA-löslichen Fraktion im Vergleich zum Wildtyp (einfaktorielle Varianzanalyse, $p = 0,0055$; Bonferroni-Test, Placebo

vs. D3D3, $p \leq 0,01$). Die DEA-löslichen Fraktionen aus der Placebo- und der D3-Behandlung waren wiederum nicht signifikant unterschiedlich (Bonferroni-Test, Placebo vs. D3, n.s.), siehe Abbildung 25A. In der unlöslichen Fraktion konnte zwischen den drei Gruppen kein Unterschied von pEA β (3-42) detektiert werden (Kruskal-Wallis-Test, $p = 0,9253$, Dunn-Test, Placebo vs. D3 sowie Placebo vs. D3D3, n.s.), siehe Abbildung 25B.

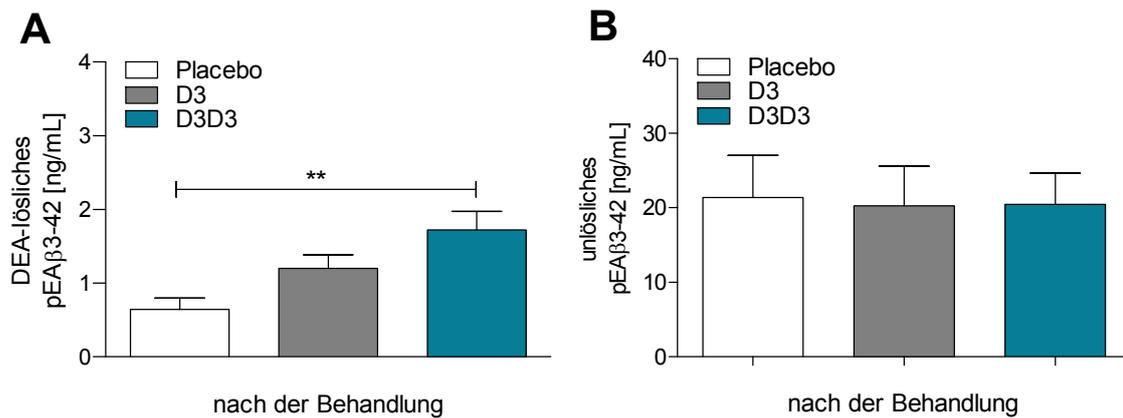


Abbildung 25: Biochemische Quantifizierung der pEA β (3-42)-Konzentration nach der Behandlung mit Placebo, D3 und D3D3 Es wurden die DEA-lösliche und die unlösliche Fraktion der Gehirne aus homozygoten TBA2.1 nach der Behandlung mit Placebo, D3 und D3D3 extrahiert und pEA β (3-42) in einem spezifischen pEA β (3-42)-ELISA nachgewiesen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler und ** $p \leq 0,01$.

5. Diskussion

Alzheimer-Demenz ist die häufigste neurodegenerative Erkrankung und betrifft mehr als 26 Millionen Menschen weltweit. In der Pathogenese der AD werden basierend auf der Amyloid-Hypothese die Oligomere von A β (1-42) als die pathogene Spezies postuliert, die zur Degeneration der Neuronen und schließlich zur Demenz führt. Aktuelle Forschungsergebnisse beschreiben eine verstärkte Oligomerisierung von Pyroglutamat-modifiziertem A β (3-42), dessen Oligomere auch eine erhöhte Toxizität im Vergleich zu A β (1-42) aufweisen. Außerdem ist nachgewiesen, dass die Anwesenheit von pEA β (3-42) die Oligomerisierung von A β (1-42) auslöst und verstärkt. Diese Erkenntnisse weisen darauf hin, dass pEA β (3-42) die Pathogenese auslösen könnte. Somit stellt pEA β (3-42) ein interessantes und wichtiges Zielmolekül in der Modulation der Aggregation von A β zur Therapie dar.

Bislang erfolgt die Therapie der Patienten nur symptomatisch und palliativ, da noch kein Wirkstoff gefunden wurde, der den Krankheitsverlauf aufhalten oder verlangsamen kann. Viele Therapieansätze konzentrieren sich auf die Inhibierung der β - und γ -Sekretase, die Modulation der Tau-Phosphorylierung oder die Modulation der Aggregation von A β . Aber bisher sind mehr als 100 Wirkstoffe in den klinischen Phasen aufgrund von starken Nebenwirkungen oder durch eine nicht erwiesene Wirksamkeit gescheitert. Ein potentieller Wirkstoffkandidat, der aus D-enantiomeren Aminosäuren besteht, ist D3. In bisherigen Studien konnte die orale Gabe von D3 in doppelt transgenen APP^{swe}/PS1^{dE9}-Mäusen eine Verbesserung des räumlichen Lernverhaltens sowie eine Reduktion der Plaques *in vivo* bewirken. Untersuchungen *in vitro* zeigten, dass D3 die toxischen Oligomere reduziert und in amorphe, hochmolekulare Aggregate umwandelt. Damit stellt D3 einen aussichtsreichen Wirkstoffkandidaten in der Modulation der Aggregation von A β dar.

Die therapeutische Wirkung von D3 gegenüber den Oligomeren von pEA β (3-42) ist bisher nicht bekannt.

Daher war das Ziel dieser Arbeit die Wirkung von D3 und dem Tandemderivat D3D3 gegenüber pE(3-42) im TBA2.1-Modell zu evaluieren. Dazu wurde

zunächst der Phänotyp transgener TBA2.1 charakterisiert und im Bezug zur Literatur evaluiert.

5.1 Charakterisierung der TBA2.1

In der vorliegenden Arbeit wurde der Phänotyp transgener TBA2.1 anhand makroskopischer Auffälligkeiten, der Motorik und der Pathologie näher untersucht. In den nachfolgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der Charakterisierung im Einzelnen diskutiert und im Anschluss in der Gesamtheit erörtert.

5.1.1 Makroskopische Beobachtungen homozygoter TBA2.1-Mäuse

Die primäre Untersuchung des SHIRPA-Tests ist ein semi-quantitatives Screeningverfahren und dient der Evaluation sensorischer und motorischer Defizite (Rogers, Fisher *et al.* 1997). Die TBA2.1 wurden im Alter von zwei bis fünf Monaten in einer Panel- und in einer Trendstudie analysiert. In beiden Studien zeigten sich ab spätestens einem Alter von drei Monaten eine gekrümmte Haltung, ein bewegungsstarrer, unsicherer Gang sowie reduzierte Reflexe der homozygoten TBA2.1. Weiter konnten vom Hinterleib beginnende, wellenartige Zuckungen beobachtet werden, die auf einen Tremor deuten (Alty und Kempster 2011). Diese Merkmale bekräftigen einen sensomotorischen Phänotyp, der ebenfalls in einen signifikant erhöhten SHIRPA-Score resultiert (Rogers, Fisher *et al.* 1997). In anderen Studien weisen homozygote TBA2.1 ab einem Alter von drei Monaten ähnliche Symptome auf. Diese sind Merkmale eines Tremors, eines Rigors und eine abnormale Haltung, eine statistische Analyse ist dazu aber nicht angegeben (Alexandru, Jagla *et al.* 2011). Das Vorgängermodell der TBA2.1 sind transgene TBA2-Mäuse, die ebenfalls posttranslational modifiziertes pEA β (3-42) exprimieren. Im Vergleich zu den homozygoten TBA2.1 besitzen heterozygoten TBA2 eine höhere, zerebrale pEA β (3-42)-Konzentration und eine reduzierte Überlebensrate. Die makroskopischen Beobachtungen der transgenen TBA2-Mäuse zeigen ebenfalls eine gekrümmte Haltung sowie eine reduzierte Motorkoordination (Wirths,

Breyhan *et al.* 2009, Alexandru, Jagla *et al.* 2011). Dies bekräftigt die Aussage eines pEA β (3-42)-induzierten, sensomotorischen Phänotyps in den homozygoten TBA2.1, der in dieser Arbeit gemessen wurde. Sensomotorische Auffälligkeiten treten nicht nur in Alzheimer-Mäusen auf, sondern auch vermehrt in Alzheimer-Patienten (Bisio, Casteran *et al.* 2012). Bereits im Stadium der leichten kognitiven Beeinträchtigungen sind Veränderungen im Gang, Auffälligkeiten in der Körperhaltung, eine Bradykinesie und vereinzelt ein Tremor vorhanden (Scarmeas, Hadjigeorgiou *et al.* 2004, Pettersson, Olsson *et al.* 2005, Nadkarni, Mawji *et al.* 2009). Bisher konnte kein Zusammenhang zwischen pEA β (3-42) und den sensomotorischen Auffälligkeiten im Menschen beschrieben werden. Aber als eine der häufigsten Spezies von A β im Gehirn ist es denkbar, dass ein Zusammenhang existiert (Portelius, Bogdanovic *et al.* 2010).

Innerhalb der primären Untersuchung wurde außerdem das Gewicht dokumentiert, das einen wichtigen Indikator der Gesundheit der Tiere darstellt (Ullman-Cullere und Foltz 1999). In der Panelstudie wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen der TBA2.1 im Alter von zwei bis fünf Monaten festgestellt. In der Trendstudie hingegen wurde ab dem Alter von drei Monaten ein um 30 % reduziertes Gewicht der homozygoten TBA2.1 deutlich. Dieser Unterschied könnte sich durch die beiden unterschiedlichen Studienkonzepte ergeben. In der Panelstudie wurden Männchen und Weibchen getestet, während in der Trendstudie nur Männchen untersucht worden sind. Dadurch, dass sich das Gewicht der Männchen zu dem Gewicht der Weibchen im Allgemeinen unterscheidet, unterliegen diese Ergebnisse möglicherweise größeren Schwankungen als die Ergebnisse der Trendstudie.

Ein weiterer möglicher Faktor stellte die der primären Untersuchung nachfolgende Testung der Tiere im beschleunigten Rotarod-Test dar. Dadurch wurden die Tiere trainiert, welches das Gewicht zusätzlich beeinflussen könnte. Alexandru *et al.* beschrieb ab einem Alter von vier Wochen ein um 30 % reduziertes Gewicht, welches in der primären Untersuchung einer Panelstudie mit gemischtem Geschlecht evaluiert wurde. In der Studie sind homozygote TBA2.1 ebenfalls im beschleunigten Rotarod-Test analysiert worden, aber es existiert keine Angabe, ob es sich dabei um die gleichen Tiere wie in der

primären Untersuchung handelt (Alexandru, Jagla *et al.* 2011). Eine weitere Ursache, die die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen von Alexandru *et al.* und dieser Arbeit erklären könnte, könnte ein allgemeiner Faktor, wie zum Beispiel die Haltung oder das Futtermittel sein. Es ist beschrieben, dass die homozygoten TBA2.1 ein verringertes Trink- und Futterverhalten besitzen, wodurch ein negativer Einfluss auf das Gewicht gegeben ist (Alexandru, Jagla *et al.* 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde das Trink- und Futterverhalten nicht analysiert, aber es wurden auch keine Auffälligkeiten durch die zuständigen Tierpfleger gemeldet.

Wirths *et al.* beschreibt in heterozygoten TBA2 ebenfalls ab einem Alter von zwei Monaten ein um mindestens 28 % reduziertes Gewicht. Eine motorische Trainingsanalyse ist nicht dokumentiert (Wirths, Breyhan *et al.* 2009). Trotz der verschiedenen Studienkonzepte, lässt sich ein Zusammenhang zwischen pEA β (3-42) und einem reduzierten Gewicht formulieren. Gewichtsanalysen von älteren Menschen weisen bereits vor der Diagnose der AD ein verringertes Gewicht auf, dass sich nach der Diagnose im Verlauf der Krankheit weiter reduziert (Gillette-Guyonnet, Nourhashemi *et al.* 2000). Es wird sogar diskutiert, ob ein reduziertes Gewicht in Zusammenhang mit anderen Faktoren einen präklinischen Indikator der AD darstellen könnte (Johnson, Wilkins *et al.* 2006, Tamura, Masaki *et al.* 2007, Inelmen, Sergi *et al.* 2010).

Zusammenfassend lassen sich ein sensomotorischer Phänotyp und ein verringertes Körpergewicht in den homozygoten TBA2.1 messen, welche wahrscheinlich durch die zerebrale pEA β (3-42)-Konzentration induziert sind. Das Feststellen ähnlicher Symptome in AD-Patienten verdeutlicht die Relevanz der Ergebnisse und lässt einen möglichen Zusammenhang zu.

5.1.2 Motorik der homozygoten TBA2.1-Mäuse

Zur Evaluation der motorischen Koordination wurden die homozygoten TBA2.1 im Alter von zwei bis fünf Monaten getestet. Das motorische Lernverhalten war in der Panelstudie im Alter von zwei bis vier Monaten und in der Trendstudie im Alter von drei und fünf Monaten reduziert. Die durchschnittliche, motorische Koordination der Tiere war hingegen in der Panelstudie im Alter von drei bis fünf

Monaten um mehr als 31 % reduziert, während in der Trendstudie kein Unterschied detektiert werden konnte. Eine mögliche Erklärung dieser Inkonsistenzen waren die verschiedenen Studienkonzepte. In der Panelstudie wurden Männchen und Weibchen analysiert, während in der Trendstudie nur Männchen getestet worden sind. Möglicherweise resultieren diese Unterschiede in den Studien aus einer geschlechtsspezifischen Ausprägung des Phänotyps. Die Analyse des Geschlechts als möglicher Kofaktor in der Panelstudie ergab allerdings keine signifikante Kovarianz (zweifaktorielle Varianzanalyse im gemischten Modell, Kofaktor Geschlecht ($F_{(1,24)} = 3,73$; $p = 0,0653$)), siehe Abbildung 26.

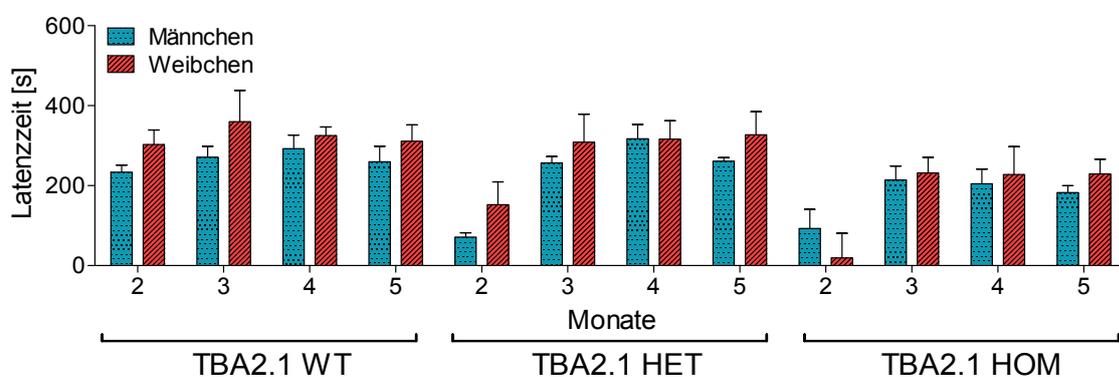


Abbildung 26: Vergleich der Latenzzeit auf dem Rotarod von männlichen und weiblichen TBA2.1 in der Panelstudie. In der Abbildung wurde die Latenzzeit von männlichen und weiblichen TBA2.1 dargestellt. Es wurden wildtypische (WT), heterozygote (HET) und homozygote (HOM) TBA2.1 analysiert.

Alexandru *et. al.* beschreibt eine geschlechtsunabhängige Ausprägung des Phänotyps (Alexandru, Jagla *et al.* 2011). Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit die ersten geborenen Würfe der TBA2.1 unabhängig vom Geschlecht und blind gegenüber dem Genotyp in der Panelstudie analysiert. Daraus ergab sich eine ungleichmäßige Verteilung von 18 getesteten Männchen und 10 getesteten Weibchen. Diese Ungleichmäßigkeit betraf vor allem die homozygote Gruppe mit neun Männchen und zwei Weibchen. Möglicherweise resultiert die nicht signifikante Wahrscheinlichkeit einer geschlechtsabhängigen Ausprägung des Phänotyps von 6 % aus einer zu kleinen Stichprobenmenge. Daher besteht die

Möglichkeit, dass die motorische Koordination der TBA2.1 einer geschlechtsspezifischen Abhängigkeit unterliegt. Diese Theorie müsste aber im direkten Vergleich von weiblichen und männlichen TBA2.1 aller drei vertretenden Genotypen eingehend geprüft werden.

Im Vergleich zur Literatur, ist eine reduzierte motorische Koordination der homozygoten TBA2.1 ab dem Alter von einem Monat detektierbar. Im Alter von fünf Monaten umfasst die motorische Koordination weniger als 20 % als die des Wildtyps (Alexandru, Jagla *et al.* 2011). In dieser Arbeit betrug die motorische Koordination hingegen im Alter von fünf Monaten in der Panelstudie 67 % und in der Trendstudie (nicht signifikant) 71 % der motorischen Koordination des Wildtyps. Mögliche Ursachen für diese Unterschiede könnten allgemeine Faktoren wie z.B. Haltungsbedingungen, anderes Futtermittel, Messschwankungen etc. sein. Aber auch der genetische Hintergrund könnte eine Rolle spielen. Das Transgen der TBA2.1 ist in den Hintergrund C57BL/6 x DBA1 eingebracht (Alexandru, Jagla *et al.* 2011). Zu Beginn dieser Arbeit wurden heterozygote TBA2.1 mit C57BL/6 verpaart, um die Zucht aufzubauen. Damit ist wahrscheinlich der Anteil an C57BL/6 im Hintergrund höher, als der Anteil in den von Alexandru *et al.* beschriebenen Mäusen. Eine weitere Ursache könnte in der Differenz zwischen den Rotarod-Apparaten liegen. Es wird zum Beispiel vermutet, dass die Oberfläche und der Durchmesser der rotierenden Zylinder einen entscheidenden Einfluss auf die Ergebnisse haben (Wahlsten, Metten *et al.* 2003, Bohlen, Cameron *et al.* 2009).

Trotz der Schwankungen zwischen den Studien liegt in der Gesamtbetrachtung aller Daten eine reduzierte, motorische Koordination der homozygoten TBA2.1 vor, die wahrscheinlich durch die zerebrale Konzentration von pEA β (3-42) ausgelöst wird. Dieser Zusammenhang wird auch in anderen transgenen Mausmodellen bestätigt. Zum Beispiel weisen transgene TBA42, die posttranslational modifiziertes pEA β (3-42) exprimieren, ebenfalls motorische Defizite in der Koordination auf (Wittnam, Portelius *et al.* 2012).

Alzheimer-Patienten haben ebenfalls eine verringerte Schrittgeschwindigkeit, eine verringerte Schrittlänge sowie einen veränderten Schrittrhythmus. Diese Merkmale sind bereits im Stadium der leichten kognitiven Beeinträchtigung

messbar (Nadkarni, Mawji *et al.* 2009). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass in AD-Patienten die motorische Koordination im frühen Stadium der Krankheit eingeschränkt ist. Eine Abhängigkeit einer verringerten Koordination und einer zerebralen Konzentration von pEA β (3-42) ist bislang nicht untersucht, ist aber dennoch nicht ausgeschlossen.

Um einen weiteren Aufschluss über die Motorik der TBA2.1 zu gewinnen, wurden fünf Monate alte TBA2.1 in dem modifizierten Stabtest und im Greifstärke-Test untersucht. Der modifizierte Stab-Test dient der Untersuchung einer Basalganglien-assoziierten Bewegungsstörung (Ogawa, Hirose *et al.* 1985, Meredith und Kang 2006). Die homozygoten TBA2.1 wiesen einen um das 12-fache erhöhten Stabtest-Score auf. Daraus lässt sich schließen, dass in homozygoten TBA2.1 wahrscheinlich eine Basalganglien-assoziierte Bewegungsstörung vorlag, die wahrscheinlich durch die zerebrale Konzentration von pEA β (3-42) induziert wurde. Zur Bestätigung dieser Bewegungsstörung wären pathologische Begutachtungen der Basalganglien wichtig. Untersuchungen der Basalganglia in Gehirnen von Alzheimer-Patienten weisen eine differenzierte Form des Striatums und des Pallidums im Vergleich zur Kontrollgruppe auf (Cho, Kim *et al.* 2014). Anhand der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse lässt sich schlussfolgern, dass die zerebrale Konzentration an pEA β (3-42) wahrscheinlich eine Basalganglien-assoziierte Bewegungsstörung induziert. Veränderungen der Basalganglien im Menschen bestätigen die Relevanz der Ergebnisse.

Die Analyse der Greifstärke ergab in homozygoten TBA2.1 eine Reduktion um 28 % im Vergleich zum Wildtyp. Dieser Unterschied wurde wahrscheinlich durch eine zerebrale Konzentration von pEA β (3-42) ausgelöst. Begutachtungen von Alzheimer-Patienten zeigen ebenfalls eine reduzierte Greifstärke auf. Es wird sogar vermutet, dass eine Beeinträchtigung dieser den kognitiven Symptomen voraus geht (Kluger, Gianutsos *et al.* 1997, Buchman, Wilson *et al.* 2007).

Daraus lässt sich zusammenfassend schlussfolgern, dass in homozygoten TBA2.1 die motorische Koordination und die Greifstärke reduziert sind und wahrscheinlich eine Basalganglien-assoziierte Bewegungsstörung vorliegt, die

wahrscheinlich durch die zerebrale Konzentration an pEA β (3-42) induziert worden sind.

5.1.3 Phänotyp der heterozygoten TBA2.1

Im Gegensatz zu den vorher beschriebenen, homozygoten TBA2.1 entwickelten sich in den heterozygoten Tieren erste Auffälligkeiten in der primären Untersuchung im Alter von 21 Monaten. Es wurden ein veränderter Gang und eine abnormale Haltung dokumentiert, die im Vergleich zum Wildtyp einen um 85 % erhöhten SHIRPA-Score ausmachten. Zudem konnte ebenfalls ab dem Alter von 21 Monaten ein um 25 % reduziertes Gewicht gemessen werden. Die Analysen im beschleunigten Rotarod, im Greifstärke-Test und im modifizierten Stab-Test ergaben bis zum Alter von 24 Monaten keine Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp. Damit ist die Entwicklung eines Phänotyps im Vergleich zu den homozygoten TBA2.1 verzögert und geringer ausgeprägt. Im gleichen Alter der heterozygoten TBA2.1 ist eine zerebrale Konzentration von 4 ng/g pEA β (3-42) messbar, welche dem Niveau von weniger als einen Monat alter homozygoter TBA2.1 entspricht (Alexandru, Jagla *et al.* 2011). Dies bekräftigt einen Zusammenhang zwischen der Konzentration von pEA β (3-42) und dem gesamten Phänotyp sowie dem Gewicht, wie es vorherige Ergebnisse ebenfalls vermuten ließen, siehe 5.1.1.

5.1.4 Korrelation der makroskopischen Beobachtung mit der motorischen Koordination

Die bisherigen Analysen konnten einen Einfluss von pEA β (3-42) auf den Phänotyp sowie auf die motorische Koordination der homozygoten TBA2.1 darstellen. Um sich ein genaueres Bild über den Zusammenhang der beiden Parameter zu verschaffen, wurde eine mögliche Korrelation der Daten aus der primären Untersuchung und des beschleunigten Rotarod-Tests analysiert. Dazu wurden die Werte der wildtypischen, heterozygoten und homozygoten TBA2.1 im Alter von zwei bis fünf Monaten aus der Panel- und der Trendstudie ins Verhältnis gesetzt, siehe Abbildung 27 und Abbildung 28. In beiden Studien

konnte eine signifikante Korrelation der primären Untersuchung mit der motorischen Koordination festgestellt werden. (Panelstudie: Pearson-Korrelation, $p = 0,0304$; Trendstudie: Pearson-Korrelation: $p = 0,0004$). Um einen Vergleich zwischen den beiden Studienkonzepten zu ziehen, lässt sich auf Basis der Wahrscheinlichkeit der Pearson-Korrelation in dem Konzept der Trendstudie eine überzeugendere Korrelation messen.

Generell wird aber in beiden Studien folgender Zusammenhang deutlich: je höher der SHIRPA-Score gemessen wurde, desto niedriger ist die zu erwartende Latenzzeit auf dem Rotarod. Anders herum formuliert: je niedriger die gemessene Latenzzeit auf dem Rotarod war, desto höher ist der zu erwartende SHIRPA-Score. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der progressive Phänotyp sowohl den sensomotorischen Phänotyp als auch die Motorkoordination umfasst, die gleichermaßen zunehmen. Die nachfolgende Abbildung zeigt die Korrelation in der Panelstudie.

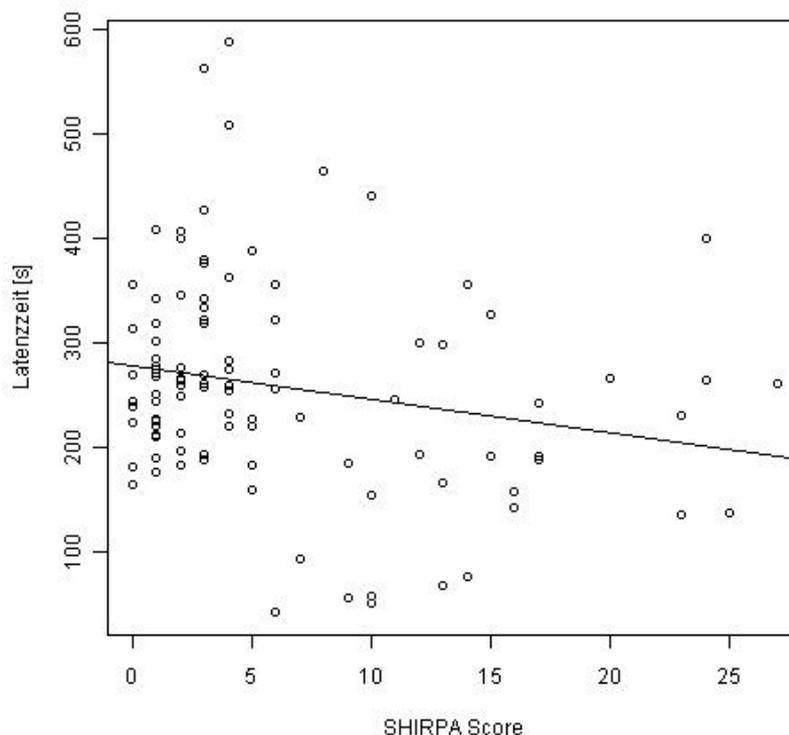


Abbildung 27: Korrelation des SHIRPA-Scores und der Latenzzeit in der Panelstudie. Es wurden die Daten der wildtypischen, heterozygoten und homozygoten TBA2.1 im Alter von zwei bis fünf Monate aus der primären Untersuchung (X-Achse) und aus dem beschleunigten Rotarod-Test (Y-Achse) aus der Panelstudie in Beziehung gesetzt. Der lineare Zusammenhang beider Analysen ist als Linie im Punkt-Diagramm dargestellt (Pearson-Korrelation, $p = 0,0304$).

Die Korrelation der Trendstudie ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

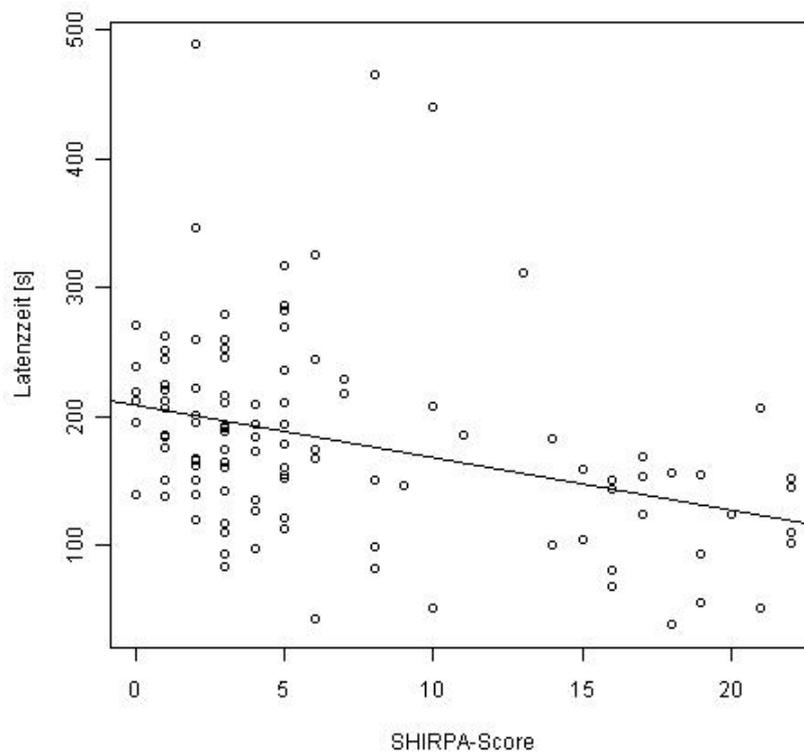


Abbildung 28: Korrelation der SHIRPA-Scores und der Latenzzeit in der Trendstudie. In dieser Darstellung wurden die Daten der wildtypischen, heterozygoten und homozygoten TBA2.1 im Alter von zwei bis fünf Monate aus der primären Untersuchung (X-Achse) und der gemessenen Latenzzeit (Y-Achse) in eine Beziehung gesetzt (Pearson-Korrelation, $p = 0,0004$).

5.1.5 Pathologie der homozygoten TBA2.1-Mäuse

Um sich einen zusammenhängenden Überblick über den Phänotyp zu verschaffen, wurde zusätzlich zum Verhalten die Pathologie der homozygoten TBA2.1 untersucht. Dazu wurden Färbungen gegen A β auf Immunfluoreszenzbasis durchgeführt und die Konzentration von pEA β (3-42) biochemisch bestimmt.

Die Färbung gegen A β erfolgte in Hirnschnitten von fünf Monate alten TBA2.1 mit dem Antikörper 6E10, der N-terminal A β (1-16) detektiert. Das Epitop des Antikörpers liegt zwischen den Aminosäureresten 3 und 8 von A β , wodurch vermutlich pEA β (3-42) und A β (Q3-42) erkannt wird. Außerdem sollte erwähnt

werden, dass der Antikörper 6E10 gegen humanes A β gerichtet ist und somit kein endogenes, murines A β anfärbt.

Es wurden Ablagerungen von A β im Striatum, im Hippokampus, im Mittelhirn, im Kortex und im Hirnstamm gefunden. In einer anderen Studie sind in den gleichen Hirnarealen Ablagerungen von A β und pEA β (3-42) detektierbar (Alexandru, Jagla *et al.* 2011). Im Vergleich zum TBA2-Modell befinden sich in den Gehirnen transgener Tiere diffuse Plaques von A β im Kortex, im Zerebellum, im Hippokampus und im Thalamus. (Wirths, Breyhan *et al.* 2009). Auch wenn dieses Muster geringfügig von dem der TBA2.1-Mäuse abweicht, so ließen sich doch spezifische Ablagerungen von A β und pEA β (3-42) in den sensorischen und motorischen Arealen des Gehirnes vorfinden. Transgene TBA2.1 exprimieren A β (Q3-42), das posttranslational zu pEA β (3-42) zyklisiert wird. Dies geschieht entweder über eine spontane chemische Reaktion oder durch Hilfe der endogenen Glutaminylzyklase (Alexandru, Jagla *et al.* 2011, Jawhar, Wirths *et al.* 2011). Die Tatsache, dass nicht nur pEA β (3-42) detektiert wird, deutet darauf hin, dass A β (Q3-42) wahrscheinlich nicht komplett durch das Enzym umgesetzt wird. Die in dieser Arbeit angefertigten Färbungen wurden ebenfalls zur Quantifizierung von A β genutzt. Die gefärbte Fläche von A β betrug ca. 0,16 % einer Hemisphäre, während ein Partikel einen durchschnittlichen Durchmesser von ca. 10 μm und eine durchschnittliche Fläche von ca. 70 μm^2 aufwies. Die Fläche der Plaques von Alzheimer-Patienten variiert zwischen 200 und 500 μm^2 im Vergleich (Serrano-Pozo, Mielke *et al.* 2012). Aufgrund dieser Größenunterschiede wäre es denkbar, dass die in homozygoten TBA2.1 gefundenen Partikel von A β keine Plaques sondern eher eine mögliche Vorstufe dessen darstellen. Alexandru *et al.* bezeichnen die Partikel von A β der homozygoten TBA2.1 als inklusionsartige Strukturen, die sich extrazellulär ablagern. Die Ablagerungen von pEA β (3-42) sind hingegen als dichte Aggregate beschrieben (Alexandru, Jagla *et al.* 2011). Aber zur weiteren Charakterisierung der detektierten Partikel wären zusätzliche Färbungen nötig, die Entzündungszellen, dystrophe Neurite und kompakte Kerne der senilen Plaques anfärben. In Alzheimer-Patienten ist pEA β (3-42) hauptsächlich in diffusen Plaques detektierbar, die eine Vorstufe der senilen Plaques sind. (Yamaguchi,

Nakazato *et al.* 1989, Saido, Iwatsubo *et al.* 1995). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Ablagerungen von pEA β (3-42) im Gehirn möglicherweise keine senilen Plaques oder eine Vorstufe dessen bilden.

Zusätzlich zu der Analyse der Ablagerungen von A β im Gehirn wurde ebenfalls die Konzentration von pEA β (3-42) im Gehirn von fünf Monate alten homozygoten TBA2.1 mit einem spezifischen pEA β (3-42)-ELISA bestimmt. Dazu wurden die DEA-lösliche und die unlösliche Fraktion von pEA β (3-42) extrahiert. Die Tris-lösliche Fraktion wurde verworfen, da erste Voruntersuchungen kein pEA β (3-42) in dieser Fraktion nachweisen konnten. Die DEA-lösliche Fraktion repräsentiert membran-assoziierte Bestandteile von pEA β (3-42), während die unlösliche Fraktion die Ablagerungen von pEA β (3-42) darstellt (Savage, Trusko *et al.* 1998, Kawarabayashi, Younkin *et al.* 2001, Jameson, Lunn *et al.* 2002). In der DEA-löslichen Fraktion wurden 1,15 ng/ml pEA β (3-42) und in der unlöslichen Fraktion wurden 32,28 ng/ml pEA β (3-42) gemessen. In der Studie von Alexandru *et al.* ist in der unlöslichen Fraktion im Alter von 3 und 7 Monaten eine Konzentration von 30 bis 40 ng/g pEA β (3-42) messbar. Die Konzentration von pEA β (3-42) im Alter von fünf Monaten ist nicht beschrieben, dennoch lässt sich eine Übereinstimmung der Ergebnisse erkennen. Die Konzentration von A β in der löslichen Fraktion wurde ebenfalls nicht angegeben (Alexandru, Jagla *et al.* 2011).

Zusammenfassend lässt sich erklären, dass sich in den sensomotorischen Hirnarealen der homozygoten TBA2.1 Ablagerungen von pEA β (3-42) befinden, die möglicherweise eine Vorstufe von Plaques darstellen. Zudem sind Anteile an pEA β (3-42) in der membranassoziierten- bzw. DEA-löslichen Fraktion und in der Ablagerungen-beihalteten bzw. unlöslichen Fraktion von A β messbar.

5.1.6 Gesamtdiskussion des Phänotyps transgener TBA2.1

Die Rolle des Pyroglutamat-modifizierten A β (3-42) gewinnt zunehmend an Bedeutung in der Pathogenese der AD. Es ist allgemein anerkannt, dass pEA β (3-42) eine verstärkte Kinetik der Oligomerisierung von A β aufweist, die in einer erhöhten Zytotoxizität resultiert (Russo, Violani *et al.* 2002, Nussbaum, Schilling *et al.* 2012). Damit wird die neurodegenerative Wirkung von pEA β (3-42)

deutlich, die durch eine Inhibierung der hippocampalen Langzeitpotenzierung durch pEA β (3-42) belegt ist (Schlenzig, Ronicke *et al.* 2012).

In dieser Arbeit wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen den sensomotorischen Defiziten und pEA β (3-42) in transgenen TBA2.1 dargestellt. Die Tatsache, dass sowohl in anderen Mausmodellen, die pEA β (3-42) exprimieren, als auch in Alzheimer-Patienten motorische Defizite vorhanden sind, untermauert den Zusammenhang. Homozygote TBA2.1 zeigten progressive Auffälligkeiten in der Haltung und im Gang, reduzierte Reflexe, ein reduziertes Gewicht sowie einen möglichen Tremor. Außerdem waren eine verringerte, motorische Koordination, eine reduzierte Greifstärke und wahrscheinlich eine Basalganglien-assoziierte Bewegungsstörung vorhanden. Gleichzeitig wurden Ablagerungen von A β und pEA β (3-42) in Hirnregionen gefunden, die für die Sensorik und Motorik zuständig sind. Dadurch wird deutlich, dass die Ablagerungen von pEA β (3-42) einen sensomotorischen Phänotyp in den homozygoten TBA2.1 induzieren.

Im Vergleich der hetero- und homozygoten TBA2.1 wurde in heterozygoten TBA2.1 ab einem Alter von 21 Monaten ein geringer Phänotyp deutlich, der sich durch Auffälligkeiten in der Haltung und dem Gang sowie durch ein reduziertes Gewicht äußerte. In der Studie von Alexandru *et al.* ist in den heterozygoten TBA2.1 ab dem gleichen Alter erstmalig eine zerebrale Konzentration von 4 ng/g an pEA β (3-42) messbar, die 6 % der zerebralen Konzentration in einem Monat alter, homozygoter TBA2.1 entspricht (Alexandru, Jagla *et al.* 2011). Die homozygoten TBA2.1 entwickelten hingegen bereits ab dem Alter von 2 bzw. 3 Monaten einen sensomotorischen Phänotyp, siehe auch 5.1.1. Die zerebrale Konzentration von pEA β (3-42) beträgt im Alter von 2 bis 3 Monaten ca. 30 bis 50 ng/g pEA β (3-42) (Alexandru, Jagla *et al.* 2011). Dies lässt vermuten, dass eine bestimmte Konzentration von pEA β (3-42) nötig ist, um einen Phänotyp in transgenen TBA2.1 zu induzieren, der dadurch in den heterozygoten TBA2.1 später auftritt und möglicherweise noch kompensiert werden kann. In homozygoten TBA2.1 wurde eine reaktive Astrozytose und Mikrogliose detektiert, wodurch ein verstärkter Abbau von pEA β (3-42) denkbar wäre (Alexandru, Jagla *et al.* 2011). *In vivo* Analysen hingegen konnten allerdings eine erhöhte

Proteaseresistenz von pEA β (3-42) gegenüber dem Abbau durch Astrozyten messen (Russo, Violani *et al.* 2002). Dadurch ist wahrscheinlich der Abbau von pEA β (3-42) in homozygoten TBA2.1 nur reduziert vorhanden. Somit wäre weiter denkbar, dass pEA β (3-42) in geringer Konzentration bis zu einem gewissen Grad abgebaut werden kann, wodurch kein bis ein geringer Phänotyp wie z.B. in den heterozygoten TBA2.1 induziert wird. Überschreitet die Konzentration einen bestimmten Schwellenwert, findet wahrscheinlich eine verstärkte Bildung von Aggregaten statt, die nicht weiter abgebaut werden können. Damit wird eine Ausprägung des Phänotyps transgener TBA2.1 in Abhängigkeit der zerebralen Konzentration von pEA β (3-42) deutlich.

Zusammenfassend lässt sich erklären, dass pEA β (3-42) in Form Ablagerungen in den sensomotorischen Hirnarealen einen sensomotorischen Phänotyp in transgenen TBA2.1 induziert, der wahrscheinlich in Abhängigkeit zu der zerebralen pEA β (3-42)-Konzentration steht.

5.2 D3 und D3D3 als potentielle Wirkstoffe zur Therapie

Ein potentieller Wirkstoffkandidat zur Modulation der Aggregation von A β ist D3, das bereits in der Behandlung von transgenen APP^{swe}/PS1^{dE9}-Mäusen eine positive Wirkung erzielte. Im Vergleich zum TBA2.1-Modell weist dieses Modell Plaques im Kortex und im Hippokampus sowie erstrangig kognitive Defizite auf (Kim, Lee *et al.* 2012, Izco, Martinez *et al.* 2014). Die orale Gabe oder eine hippokampale Infusion von D3 verbessert das räumliche Lernverhalten transgener Tiere, reduziert die senilen Plaques im Hippokampus sowie im Kortex und verringerte außerdem die Plaque-assoziierte Entzündung (van Groen, Wiesehan *et al.* 2008, Funke, van Groen *et al.* 2010, van Groen, Kadish *et al.* 2013). Außerdem konnte *in vitro* nachgewiesen werden, dass D3 die Oligomere von A β in amorphe, hochmolekulare Aggregate umwandelt, die keine geordnete „Cross“- β -Faltblattstruktur aufweisen (Funke, van Groen *et al.* 2010). Der Mechanismus der Modulation der Aggregation von A β von D3 ist noch nicht vollkommen geklärt worden, aber es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass D3 den Drehwinkel zwischen den A β -Peptiden innerhalb der Oligomere um 7 ° erweitert. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass D3 mit den Oligomere interagiert (Funke,

van Groen *et al.* 2010). Die Wirkung von D3D3 ist bisher nicht bekannt, aber dadurch dass es ein Tandemderivat von D3 darstellt, war eine ähnliche Wirkung wie D3 zu erwarten. D3D3 wurde konzipiert, um die Affinität von D3 zu A β durch eine erhöhte Avidität zu verstärken. Bisher war dieses Konzept hauptsächlich für Antikörper bekannt, aber eine neue Untersuchung mit dem Peptid Affibody demonstrierte einen ähnlichen Mechanismus. Es konnte gezeigt werden, dass Affibodies in einfacher Form nur geringe Affinitäten zum Zielmolekül besitzen, während multiple Tandempeptide der Affibodies eine erhöhte Affinität und eine erhöhte Avidität aufwiesen (Rudnick und Adams 2009, Cao, Wen *et al.* 2012). In Bezug zu D3D3 wird damit in der Theorie eine erhöhte Effizienz aufgrund einer erhöhten Avidität im Vergleich zu D3 prognostiziert.

Um die Wirkung von D3 und D3D3 auf den durch pEA β (3-42)-induzierten sensomotorischen Phänotyp und die zuvor genannte Theorie zu überprüfen, wurden 4 Monate alte homozygote und wildtypische TBA2.1 über einen Zeitraum von 4 Wochen mit D3, D3D3 oder Placebo über ein osmotisches Pumpensystem behandelt. Die Tiere wurden vor und nach der Analyse in der primären Untersuchung und im beschleunigten Rotarod-Test analysiert. Danach wurden die homozygoten TBA2.1 auf ihre Pathologie untersucht.

Die primäre Untersuchung diente der Evaluation der therapeutischen Wirkung von D3 oder D3D3 auf den sensomotorischen Phänotyp der TBA2.1. Die Analyse der Placebo-behandelten und der D3-behandelten Gruppe ergab eine signifikante Erhöhung der SHIRPA-Scores im Vorher-Nachher-Vergleich. Dies deutet auf eine Progression des Phänotyps während des Behandlungszeitraumes hin. Im Gegensatz dazu war nach der Behandlung mit D3D3 kein signifikanter Unterschied im Vorher-Nachher-Vergleich festzustellen. Dies deutet auf eine Stabilisierung der weiteren Progression des Phänotyps durch die Behandlung mit D3D3 hin.

Die Tiere wurden ebenfalls im beschleunigten Rotarod-Test auf ihre motorische Koordination hin untersucht. Die motorische Koordination der Placebo-Gruppe zeigte eine signifikante Reduktion im Vorher-Nachher-Vergleich. Die Behandlung mit D3 und D3D3 wies dagegen keine signifikanten Unterschiede im Vorher-Nachher-Vergleich auf. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass D3 und D3D3 eine

therapeutische Wirkung auf die Progression des Phänotyps in Bezug auf die motorische Koordination ausüben. Möglicherweise ist die Inhibierung der Progression der Motorkoordination einfacher, als die Stabilisierung des gesamten Phänotyps. Dies lässt sich dadurch begründen, dass D3 einen positiven Effekt auf die Motorkoordination bewirkt, während nur D3D3 auch in der Lage war die Progression des gesamten Phänotyps zu stabilisieren. D3D3 wurde konzipiert, um die Affinität und somit die Effizienz von D3 zu erhöhen. Anhand dieser Daten lässt sich somit schlussfolgern, dass D3D3 eine erhöhte Effizienz gegenüber D3 auf den sensomotorischen Phänotyp der homozygoten TBA2.1 aufweist. .

Die Analyse der Wildtyp-Behandlung ergab in der primären Untersuchung und im beschleunigten Rotarod keine signifikanten Unterschiede im Vorher-Nachher-Vergleich. Allerdings war das Gewicht der Placebo- und der D3D3-behandelten, wildtypischen TBA2.1 im Vorher-Nachher-Vergleich signifikant erhöht. Da auch die Kontrollgruppe (Placebo) und die Tiere insgesamt im Laufe des Alters an Gewicht zunehmen, deutet dies auf einen behandlungsunabhängigen Effekt in Bezug auf das Gewicht. Daher ist dieser Effekt zu vernachlässigen. Lediglich eine Gewichtsabnahme wäre ein bedenkliches Kriterium für die Wirkung von D3D3 gewesen, das in dieser Studie aber nicht gemessen wurde. Somit lässt sich aus den Ergebnissen der Wildtyp-Behandlung mit D3 und D3D3 schlussfolgern, dass die nicht-signifikanten Unterschiede in der primären Untersuchung und in dem beschleunigten Rotarod im Vorher-Nachher-Vergleich eine spezifische Wirkung von D3 und D3D3 auf den pEA β (3-42)-induzierten Phänotyp in den homozygoten TBA2.1 bestätigen.

Nach der Behandlung wurden die Gehirne der homozygoten TBA2.1 mit 6E10 gegen Gesamt-A β gefärbt und quantifiziert. Im Vergleich der drei Gruppen Placebo, D3 und D3D3 ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der Partikelfläche und in der Partikelanzahl der A β -Aggregate detektieren. Zusätzlich zu der Quantifizierung der Partikel im Gehirn wurden ebenfalls die unlösliche und die DEA-lösliche Fraktion von pEA β (3-42) analysiert. Die unlösliche Fraktion repräsentiert die Aggregate von pEA β (3-42), die im Vergleich der drei Gruppen keinen Unterschied aufwies, welches das Ergebnis der A β -gefärbten Fläche auf Basis der Immunfluoreszenz unterstützt. Die DEA-lösliche Fraktion stellt

membran-assoziiertes pEA β (3-42) dar. Die Analyse ergab eine um 265 % signifikant erhöhte DEA-lösliche Fraktion von pEA β (3-42) durch die Behandlung mit D3D3. Die Behandlung mit D3 ergab keinen signifikanten Unterschied zur Placebogruppe. In bisherigen Studien ist gezeigt, dass D3 die A β -Oligomere in amorphe Aggregate umwandelt und somit die Fibrillenbildung von A β inhibiert. Dadurch wird das Gleichgewichts zwischen den Monomeren, Oligomeren und Fibrillen zu nicht-amyloidogenen Aggregaten verschoben (Funke, van Groen *et al.* 2010). Anhand dessen, dass D3D3 ein Tandemderivat von D3 darstellt, wäre es denkbar, dass D3D3 ähnliche Eigenschaften wie D3 aufweist. Möglicherweise resultierte die erhöhte Konzentration von pEA β (3-42) in der DEA-löslichen Fraktion nach Behandlung mit D3D3 ebenfalls aufgrund einer Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung nicht amyloidogener Aggregate. Damit wäre es möglich, dass D3D3 die Oligomere von pEA β (3-42) in amorphe Aggregate umwandelt, wie es für D3 nachgewiesen ist. Die Tatsache, dass die Ablagerungen von pEA β (3-42) keine Unterschiede aufwiesen, könnte an der Größendifferenz der beiden gemessenen Fraktionen liegen. In der DEA-löslichen Fraktion wurden nach Behandlung von D3D3 $2,31 \pm 0,2$ ng/ml pEA β (3-42) und in der unlöslichen Fraktion wurden $20,49 \pm 4,17$ ng/ml pEA β (3-42) gemessen. Aufgrund der Messungenauigkeiten der Messwerten der unlöslichen Fraktion wäre es möglich, dass die geringen Unterschiede, wie sie in der DEA-löslichen Fraktion gemessen worden sind, in der unlöslichen Fraktion nicht detektierbar waren. Dadurch ist es möglich, dass die Behandlung mit D3D3 eine Verschiebung des Gleichgewichtes der Monomere, der Oligomere und der Fibrillen hin zu amorphen Aggregaten verlagert.

Zusammenfassend lässt sich darstellen, dass D3 und D3D3 offensichtlich potentielle Wirkstoffkandidaten gegenüber den Oligomeren von pEA β (3-42) bzw. A β darstellen.

Die Behandlung mit D3 und D3D3 bewirkt eine Inhibition der Progression der Motorkoordination. Aber die Behandlung mit D3D3 stabilisierte hingegen die Progression des gesamten Phänotyps. Außerdem zeigt sich eine potentielle Umwandlung toxischer pEA β (3-42)-Oligomere nach Behandlung mit D3D3, die in einer Verschiebung des Gleichgewichts von pEA β (3-42) und somit in einer

erhöhten DEA-löslichen Fraktion resultiert. Dadurch wird deutlich, dass D3D3 eine erhöhte Wirksamkeit im Vergleich zu D3 aufweist und das Konzept einer gesteigerten Effizienz durch eine erhöhte Avidität damit bestätigt ist.

6. Zusammenfassung

Alzheimer-Demenz ist eine progressive, neurodegenerative Erkrankung, für die bislang keine ursächliche Therapie existiert. Ein potentieller Wirkstoffkandidat, der *in vivo* die Kognition verbessert, die Plaques reduziert und *in vitro* die toxischen Oligomere des β -Amyloid-Proteins ($A\beta$) in amorphe Aggregate umwandelt, ist das D-enantiomere Peptid D3. Pyroglutamat-modifiziertes $A\beta(3-42)$ (pEA $\beta(3-42)$) weist eine verstärkte Kinetik der Oligomerisierung der Monomere auf und besitzt dadurch eine erhöhte zytotoxische Wirkung im Vergleich zu $A\beta(1-42)$. Daher war es das Ziel dieser Arbeit, die Effizienz von D3 und dessen Tandemderivat (D3D3) auf den pEA $\beta(3-42)$ -induzierten Phänotyp in dem TBA2.1-Mausmodell zu evaluieren. Die Charakterisierung und Validierung des Phänotyps zeigte in homozygoten TBA2.1 ab einem Alter von zwei Monaten einen durch pEA $\beta(3-42)$ -induzierten progressiven sensomotorischen Phänotyp. Dieser äußerte sich durch makroskopische Abnormalitäten, eine beeinträchtigte Motorkoordination, eine verminderte Greifstärke und durch eine mögliche Basalganglien-assoziierte Bewegungsstörung. Ablagerungen von pEA $\beta(3-42)$ in den sensomotorischen Hirnarealen bestätigten diesen Zusammenhang. In den heterozygoten TBA2.1 zeigte sich hingegen erst ab dem Alter von 21 Monaten ein geringer sensomotorischer Phänotyp. Dies verdeutlicht eine Ausprägung des Phänotyps in Abhängigkeit der pEA $\beta(3-42)$ -Konzentration.

Die intraperitoneale Behandlung der homozygoten TBA2.1 über vier Wochen mit D3 oder D3D3 verhinderte die weitere Progression der motorischen Koordination. D3D3 bewirkte zusätzlich eine Stabilisierung des gesamten sensomotorischen Phänotyps sowie eine Erhöhung der zerebralen, Diethanolamin-löslichen pEA $\beta(3-42)$ -Konzentration. Diese erhöhte pEA $\beta(3-42)$ -Konzentration resultiert möglicherweise durch die Umwandlung der Oligomere von pEA $\beta(3-42)$ und somit zu einer Verschiebung des Gleichgewichts hin zu amorphen Aggregaten. Die Ergebnisse der Behandlung der wildtypischen TBA2.1 bestätigen die Spezifität von D3 und D3D3 gegenüber den Oligomeren von pEA $\beta(3-42)$. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass D3 und D3D3 offensichtlich potentielle Wirkstoffkandidaten in der Modulation von $A\beta$ darstellen. D3D3 weist aber eine

noch größere Effizienz auf als D3, wodurch das Konzept der erhöhten Affinität durch eine erhöhte Avidität bestätigt wird.

7. Summary

Alzheimer's disease is a progressive, neurodegenerative disorder. However, until now there is no curative treatment available. A very potent therapeutically active substance is the D-enantiomeric peptide D3, which increases cognition and reduces the plaque load *in vivo*. Additionally, *in vitro* studies show that it was able to reduce oligomers containing the amyloid β peptide ($A\beta$). Pyroglutamate modified $A\beta(3-42)$ (pEA $\beta(3-42)$) leads to increased oligomerisation and therefore increased cytotoxicity compared to $A\beta(1-42)$. Therefore, the aim of this thesis is the analysis of the therapeutic effect of D3 and its tandem derivative (D3D3) in on pEA $\beta(3-42)$ induced phenotype in the TBA2.1 mouse model.

Validation and characterisation of the phenotype demonstrated in homozygous TBA2.1 mice a pEA $\beta(3-42)$ induced progressive sensorimotor phenotype starting from two months of age, showing macroscopic abnormalities, impaired motor coordination, reduced grip strength and an impaired movement which is possibly related to basal ganglia. Deposits of cerebellar pEA $\beta(3-42)$ in sensorimotor areas of the brain confirmed the connection. Heterozygous mice demonstrated from 21 months of age a minor phenotype showing abnormalities in gait, posture and reflexes. This confirmed a pEA $\beta(3-42)$ concentration depended phenotype.

Next, homozygous mice were treated over four weeks with D3 or D3D3. Results showed that both peptides were able to prevent deterioration of the motor balance. Moreover, treatment with D3D3 was able to stabilise the overall phenotype and to increase the concentration of diethanolamine soluble pEA $\beta(3-42)$. This occurred possibly due to conversion of pEA $\beta(3-42)$ oligomers and due to a changed equilibrium of aggregates into amorphous aggregates. Treatment of wildtype TBA2.1 demonstrated no effects indicating specificities of D3 and D3D3 to pEA $\beta(3-42)$ oligomers. To conclude, both D3 and D3D3 are obviously potent therapeutic substances against pEA $\beta(3-42)$ oligomers. D3D3 seems to be more efficient than D3 confirming the concept of increased affinity due to an increased avidity.

II Literaturverzeichnis

Aaij, C. and P. Borst (1972). "The gel electrophoresis of DNA." Biochim Biophys Acta **269**(2): 192-200.

Aisen, P. S., J. Cummings and L. S. Schneider (2012). "Symptomatic and nonamyloid/tau based pharmacologic treatment for Alzheimer disease." Cold Spring Harb Perspect Med **2**(3): a006395.

Albert, M. S. (2011). "Changes in cognition." Neurobiol Aging **32 Suppl 1**: S58-63.

Alexandru, A., W. Jagla, S. Graubner, A. Becker, C. Bäuscher, S. Kohlmann, R. Sedlmeier, K. Raber, H. Cynis, R. Rönicke, K. Reymann, E. Petrasch-Parwez, M. Hartlage-Rübsamen, A. Waniek, S. Rossner, S. Schilling, A. Osmand, H.-U. Demuth and S. von Hörsten (2011). "Selective hippocampal neurodegeneration in transgenic mice expressing small amounts of truncated A β is induced by pyroglutamate-A β formation." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **31**(36): 12790-12801.

Alty, J. E. and P. A. Kempster (2011). "A practical guide to the differential diagnosis of tremor." Postgrad Med J **87**(1031): 623-629.

Anand, R., K. D. Gill and A. A. Mahdi (2014). "Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future." Neuropharmacology **76 Pt A**: 27-50.

Auld, D. S., T. J. Kornecook, S. Bastianetto and R. Quirion (2002). "Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies." Prog Neurobiol **68**(3): 209-245.

Balin, B. J. and A. P. Hudson (2014). "Etiology and pathogenesis of late-onset Alzheimer's disease." Curr Allergy Asthma Rep **14**(3): 417.

Bartzokis, G. (2004). "Age-related myelin breakdown: a developmental model of cognitive decline and Alzheimer's disease." Neurobiol Aging **25**(1): 5-18; author reply 49-62.

Bateman, R. J., C. Xiong, T. L. Benzinger, A. M. Fagan, A. Goate, N. C. Fox, D. S. Marcus, N. J. Cairns, X. Xie, T. M. Blazey, D. M. Holtzman, A. Santacruz, V. Buckles, A. Oliver, K. Moulder, P. S. Aisen, B. Ghetti, W. E. Klunk, E. McDade, R. N. Martins, C. L. Masters, R. Mayeux, J. M. Ringman, M. N. Rossor, P. R. Schofield, R. A. Sperling, S. Salloway and J. C. Morris (2012). "Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease." N Engl J Med **367**(9): 795-804.

Bayer, T. A. and O. Wirths (2014). "Focusing the amyloid cascade hypothesis on N-truncated Abeta peptides as drug targets against Alzheimer's disease." Acta Neuropathol **127**(6): 787-801.

Bekris, L. M., C. E. Yu, T. D. Bird and D. W. Tsuang (2010). "Genetics of Alzheimer disease." J Geriatr Psychiatry Neurol **23**(4): 213-227.

Bisio, A., M. Casteran, Y. Ballay, P. Manckoundia, F. Mourey and T. Pozzo (2012). "Motor resonance mechanisms are preserved in Alzheimer's disease patients." Neuroscience **222**: 58-68.

Blennow, K., M. J. de Leon and H. Zetterberg (2006). "Alzheimer's disease." Lancet **368**(9533): 387-403.

Bloom, G. S. (2014). "Amyloid-beta and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis." JAMA Neurol **71**(4): 505-508.

Bohlen, M., A. Cameron, P. Metten, J. C. Crabbe and D. Wahlsten (2009). "Calibration of rotational acceleration for the rotarod test of rodent motor coordination." J Neurosci Methods **178**(1): 10-14.

Braak, H., K. Del Tredici, C. Schultz and E. Braak (2000). "Vulnerability of select neuronal types to Alzheimer's disease." Ann N Y Acad Sci **924**: 53-61.

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.

Brookmeyer, R., E. Johnson, K. Ziegler-Graham and H. M. Arrighi (2007). "Forecasting the global burden of Alzheimer's disease." Alzheimers Dement **3**(3): 186-191.

Buchman, A. S., R. S. Wilson, P. A. Boyle, J. L. Bienias and D. A. Bennett (2007). "Grip strength and the risk of incident Alzheimer's disease." Neuroepidemiology **29**(1-2): 66-73.

Budson, A. E. and P. R. Solomon (2012). "New criteria for Alzheimer disease and mild cognitive impairment: implications for the practicing clinician." Neurologist **18**(6): 356-363.

Cao, J., Z. M. Wen, S. H. Deng, X. Zhou, Q. L. Chen, W. T. Liao, S. H. Jiang, J. A. Jia, Z. T. Qi, S. H. Sun and W. Pan (2012). "Phage-based molecular directed evolution yields multiple tandem human IgA affibodies with intramolecular binding avidity." J Biotechnol **158**(3): 120-127.

Cho, H., J. H. Kim, C. Kim, B. S. Ye, H. J. Kim, C. W. Yoon, Y. Noh, G. H. Kim, Y. J. Kim, J. H. Kim, C. H. Kim, S. J. Kang, J. Chin, S. T. Kim, K. H. Lee, D. L. Na, J. K. Seong and S. W. Seo (2014). "Shape changes of the basal ganglia and thalamus in Alzheimer's disease: a three-year longitudinal study." J Alzheimers Dis **40**(2): 285-295.

Clayeyen, S., M. Cochet, R. Donneger, A. Dumuis, J. Bockaert and P. Giannoni (2012). "Alzheimer culprits: cellular crossroads and interplay." Cell Signal **24**(9): 1831-1840.

Clarfield, A. M. (2003). "The decreasing prevalence of reversible dementias: an updated meta-analysis." Arch Intern Med **163**(18): 2219-2229.

Clark, R. A., M. Shoaib, K. N. Hewitt, S. C. Stanford and S. T. Bate (2012). "A comparison of InVivoStat with other statistical software packages for analysis of data generated from animal experiments." J Psychopharmacol **26**(8): 1136-1142.

Craik, D. J., D. P. Fairlie, S. Liras and D. Price (2013). "The future of peptide-based drugs." Chem Biol Drug Des **81**(1): 136-147.

Cynis, H., S. Schilling, M. Bodnar, T. Hoffmann, U. Heiser, T. C. Saido and H. U. Demuth (2006). "Inhibition of glutaminyl cyclase alters pyroglutamate formation in mammalian cells." Biochim Biophys Acta **1764**(10): 1618-1625.

Dawkins, E. and D. H. Small (2014). "Insights into the physiological function of the beta-amyloid precursor protein: beyond Alzheimer's disease." J Neurochem **129**(5): 756-769.

Desai, A. K. C. P. (2009). "Tau-based Therapies for Alzheimer's Disease: Wave of the Future?" Primary Psychiatry **16**(7): 40-46.

Dintzis, H. M., D. E. Symer, R. Z. Dintzis, L. E. Zawadzke and J. M. Berg (1993). "A comparison of the immunogenicity of a pair of enantiomeric proteins." Proteins **16**(3): 306-308.

Eckert, A., C. A. Marques, U. Keil, K. Schussel and W. E. Muller (2003). "Increased apoptotic cell death in sporadic and genetic Alzheimer's disease." Ann N Y Acad Sci **1010**: 604-609.

Engvall, E. (2010). "The ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay." Clin Chem **56**(2): 319-320.

Engvall, E. and P. Perlmann (1971). "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G." Immunochemistry **8**(9): 871-874.

Finder, V. H. and R. Glockshuber (2007). "Amyloid-beta aggregation." Neurodegener Dis **4**(1): 13-27.

Fjell, A. M., L. McEvoy, D. Holland, A. M. Dale and K. B. Walhovd (2014). "What is normal in normal aging? Effects of aging, amyloid and Alzheimer's disease on the cerebral cortex and the hippocampus." Prog Neurobiol **117**: 20-40.

Fotuhi, M., V. Hachinski and P. J. Whitehouse (2009). "Changing perspectives regarding late-life dementia." Nat Rev Neurol **5**(12): 649-658.

Fox, N. C., S. Cousens, R. Scahill, R. J. Harvey and M. N. Rossor (2000). "Using serial registered brain magnetic resonance imaging to measure disease progression in Alzheimer disease: power calculations and estimates of sample size to detect treatment effects." Arch Neurol **57**(3): 339-344.

Funke, S., T. van Groen, I. Kadish, D. Bartnik, L. Nagel-Steger, O. Brener, T. Sehl, R. Batra-Safferling, C. Moriscot, G. Schoehn, A. H. 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 Chem Neurosci **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.

Funke, S. A. and D. Willbold (2012). "Peptides for therapy and diagnosis of Alzheimer's disease." Curr Pharm Des **18**(6): 755-767.

Galimberti, D., L. Ghezzi and E. Scarpini (2013). "Immunotherapy against amyloid pathology in Alzheimer's disease." J Neurol Sci **333**(1-2): 50-54.

Giacobini, E. and G. Gold (2013). "Alzheimer disease therapy--moving from amyloid-beta to tau." Nat Rev Neurol **9**(12): 677-686.

Gillette-Guyonnet, S., F. Nourhashemi, S. Andrieu, I. de Glisezinski, P. J. Ousset, D. Riviere, J. L. Albarede and B. Vellas (2000). "Weight loss in Alzheimer disease." Am J Clin Nutr **71**(2): 637S-642S.

Haass, C. and D. J. Selkoe (2007). "Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(2): 101-112.

Hampel, H., D. Prvulovic, S. Teipel, F. Jessen, C. Luckhaus, L. Frolich, M. W. Riepe, R. Dodel, T. Leyhe, L. Bertram, W. Hoffmann and F. Faltraco (2011). "The future of Alzheimer's disease: the next 10 years." Prog Neurobiol **95**(4): 718-728.

Han, S. H. and I. Mook-Jung (2014). "Diverse molecular targets for therapeutic strategies in Alzheimer's disease." J Korean Med Sci **29**(7): 893-902.

Hardy, J. A. and G. A. Higgins (1992). "Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis." Science **256**(5054): 184-185.

Imtiaz, B., A. M. Tolppanen, M. Kivipelto and H. Soininen (2014). "Future directions in Alzheimer's disease from risk factors to prevention." Biochem Pharmacol **88**(4): 661-670.

Inelmen, E. M., G. Sergi, A. Coin, A. Girardi and E. Manzato (2010). "An open-ended question: Alzheimer's disease and involuntary weight loss: which comes first?" Aging Clin Exp Res **22**(3): 192-197.

Iqbal, K. and I. Grundke-Iqbal (2010). "Alzheimer's disease, a multifactorial disorder seeking multitherapies." Alzheimers Dement **6**(5): 420-424.

Izco, M., P. Martinez, A. Corrales, N. Fandos, S. Garcia, D. Insua, M. Montanes, V. Perez-Grijalba, N. Rueda, V. Vidal, C. Martinez-Cue, P. Pesini and M. Sarasa (2014). "Changes in the brain and plasma Abeta peptide levels with age and its relationship with cognitive impairment in the APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease." Neuroscience **263**: 269-279.

Jahn, H. (2013). "Memory loss in Alzheimer's disease." Dialogues Clin Neurosci **15**(4): 445-454.

Jameson, C. W., R. M. Lunn, S. Jeter and A. Sabella (2002). "Report for Carcinogens Background Document for Diethanolamine."

Jawhar, S., O. Wirths and T. A. Bayer (2011). "Pyroglutamate amyloid-beta (Abeta): a hatchet man in Alzheimer disease." J Biol Chem **286**(45): 38825-38832.

Jawhar, S., O. Wirths, S. Schilling, S. Graubner, H. U. Demuth and T. A. Bayer (2011). "Overexpression of glutaminyl cyclase, the enzyme responsible for pyroglutamate A{beta} formation, induces behavioral deficits, and glutaminyl cyclase knock-out rescues the behavioral phenotype in 5XFAD mice." J Biol Chem **286**(6): 4454-4460.

Johnson, D. K., C. H. Wilkins and J. C. Morris (2006). "Accelerated weight loss may precede diagnosis in Alzheimer disease." Arch Neurol **63**(9): 1312-1317.

Jones, B. J. and D. J. Roberts (1968). "The quantitative measurement of motor inco-ordination in naive mice using an accelerating rotarod." J Pharm Pharmacol **20**(4): 302-304.

Kalia, M. (2003). "Dysphagia and aspiration pneumonia in patients with Alzheimer's disease." Metabolism **52**(10 Suppl 2): 36-38.

Karran, E., M. Mercken and B. De Strooper (2011). "The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics." Nat Rev Drug Discov **10**(9): 698-712.

Kawarabayashi, T., L. H. Younkin, T. C. Saido, M. Shoji, K. H. Ashe and S. G. Younkin (2001). "Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid (beta) protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease." J Neurosci **21**(2): 372-381.

Keller, J. N. (2006). "Age-related neuropathology, cognitive decline, and Alzheimer's disease." Ageing Res Rev **5**(1): 1-13.

Kim, T. K., J. E. Lee, S. K. Park, K. W. Lee, J. S. Seo, J. Y. Im, S. T. Kim, J. Y. Lee, Y. H. Kim, J. K. Lee and P. L. Han (2012). "Analysis of differential plaque depositions in the brains of Tg2576 and Tg-APPswe/PS1dE9 transgenic mouse models of Alzheimer disease." Exp Mol Med **44**(8): 492-502.

Klein, W. L. (2002). "Abeta toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets." Neurochem Int **41**(5): 345-352.

Kluger, A., J. G. Gianutsos, J. Golomb, S. H. Ferris, A. E. George, E. Franssen and B. Reisberg (1997). "Patterns of motor impairment in normal aging, mild cognitive decline, and early Alzheimer's disease." J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci **52B**(1): P28-39.

Klyubin, I., W. K. Cullen, N. W. Hu and M. J. Rowan (2012). "Alzheimer's disease Abeta assemblies mediating rapid disruption of synaptic plasticity and memory." Mol Brain **5**: 25.

Kowalik-Jankowska, T., M. Ruta, K. Wisniewska, L. Lankiewicz and M. Dyba (2004). "Products of Cu(II)-catalyzed oxidation in the presence of hydrogen peroxide of the 1-10, 1-16 fragments of human and mouse beta-amyloid peptide." J Inorg Biochem **98**(6): 940-950.

Kumar-Singh, S. (2009). "Hereditary and sporadic forms of abeta-cerebrovascular amyloidosis and relevant transgenic mouse models." Int J Mol Sci **10**(4): 1872-1895.

Kumar, A., A. Singh and Ekavali (2015). "A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update." Pharmacol Rep **67**(2): 195-203.

Kumar, S. and J. Walter (2011). "Phosphorylation of amyloid beta (Abeta) peptides - a trigger for formation of toxic aggregates in Alzheimer's disease." Aging (Albany NY) **3**(8): 803-812.

LaFerla, F. M., K. N. Green and S. Oddo (2007). "Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease." Nat Rev Neurosci **8**(7): 499-509.

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., N. R. Relkin and E. R. Siemers (2014). "Amyloid-ss-directed immunotherapy for Alzheimer's disease." J Intern Med **275**(3): 284-295.

Leal, S. L. and M. A. Yassa (2013). "Perturbations of neural circuitry in aging, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease." Ageing Res Rev **12**(3): 823-831.

Lee, P. Y., J. Costumbrado, C. Y. Hsu and Y. H. Kim (2012). "Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments." J Vis Exp(62).

Leissring, M. A., A. Lu, M. M. Condrón, D. B. Teplow, R. L. Stein, W. Farris and D. J. Selkoe (2003). "Kinetics of amyloid beta-protein degradation determined by novel fluorescence- and fluorescence polarization-based assays." J Biol Chem **278**(39): 37314-37320.

Li, C., A. Ebrahimi and H. Schluesener (2013). "Drug pipeline in neurodegeneration based on transgenic mice models of Alzheimer's disease." Ageing Res Rev **12**(1): 116-140.

Lien, S. and H. B. Lowman (2003). "Therapeutic peptides." Trends Biotechnol **21**(12): 556-562.

Lue, L. F., Y. M. Kuo, A. E. Roher, L. Brachova, Y. Shen, L. Sue, T. Beach, J. H. Kurth, R. E. Rydel and J. Rogers (1999). "Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease." Am J Pathol **155**(3): 853-862.

MacDuffie, K. E., A. S. Atkins, K. E. Flegal, C. M. Clark and P. A. Reuter-Lorenz (2012). "Memory distortion in Alzheimer's disease: deficient monitoring of short- and long-term memory." Neuropsychology **26**(4): 509-516.

Meredith, G. E. and U. J. Kang (2006). "Behavioral models of Parkinson's disease in rodents: a new look at an old problem." Mov Disord **21**(10): 1595-1606.

Morris, G. P., I. A. Clark and B. Vissel (2014). "Inconsistencies and controversies surrounding the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease." Acta Neuropathol Commun **2**: 135.

Morris, J. K., R. A. Honea, E. D. Vidoni, R. H. Swerdlow and J. M. Burns (2014). "Is Alzheimer's disease a systemic disease?" Biochim Biophys Acta **1842**(9): 1340-1349.

Mucke, L. (2009). "Neuroscience: Alzheimer's disease." Nature **461**(7266): 895-897.

Muller, U. C. and H. Zheng (2012). "Physiological functions of APP family proteins." Cold Spring Harb Perspect Med **2**(2): a006288.

Nadkarni, N. K., E. Mawji, W. E. McIlroy and S. E. Black (2009). "Spatial and temporal gait parameters in Alzheimer's disease and aging." Gait Posture **30**(4): 452-454.

Nussbaum, J. M., S. Schilling, H. Cynis, A. Silva, E. Swanson, T. Wangsanut, K. Tayler, B. Wiltgen, A. Hatami, R. Ronicke, K. Reymann, B. Hutter-Paier, A. Alexandru, W. Jagla, S. Graubner, C. G. Glabe, H. U. Demuth and G. S. Bloom (2012). "Prion-like behaviour and tau-dependent cytotoxicity of pyroglutamylated amyloid-beta." Nature **485**(7400): 651-655.

O'Brien, R. J. and P. C. Wong (2011). "Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease." Annu Rev Neurosci **34**: 185-204.

Ogawa, N., Y. Hirose, S. Ohara, T. Ono and Y. Watanabe (1985). "A simple quantitative bradykinesia test in MPTP-treated mice." Res Commun Chem Pathol Pharmacol **50**(3): 435-441.

Pettersson, A. F., E. Olsson and L. O. Wahlund (2005). "Motor function in subjects with mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease." Dement Geriatr Cogn Disord **19**(5-6): 299-304.

Piaceri, I., B. Nacmias and S. Sorbi (2013). "Genetics of familial and sporadic Alzheimer's disease." Front Biosci (Elite Ed) **5**: 167-177.

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.

Rajendran, L. and W. Annaert (2012). "Membrane trafficking pathways in Alzheimer's disease." Traffic **13**(6): 759-770.

Reitz, C. and R. Mayeux (2014). "Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers." Biochem Pharmacol **88**(4): 640-651.

Riddle, D. R., W. E. Sonntag and R. J. Lichtenwalner (2003). "Microvascular plasticity in aging." Ageing Res Rev **2**(2): 149-168.

Ridge, P. G., M. T. Ebbert and J. S. Kauwe (2013). "Genetics of Alzheimer's disease." Biomed Res Int **2013**: 254954.

Riedel, W. J. (2014). "Preventing cognitive decline in preclinical Alzheimer's disease." Curr Opin Pharmacol **14**: 18-22.

Roberts, R. and D. S. Knopman (2013). "Classification and epidemiology of MCI." Clin Geriatr Med **29**(4): 753-772.

Rogers, D. C., E. M. Fisher, S. D. Brown, J. Peters, A. J. Hunter and J. E. Martin (1997). "Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment." Mamm Genome **8**(10): 711-713.

Rosenblum, W. I. (2014). "Why Alzheimer trials fail: removing soluble oligomeric beta amyloid is essential, inconsistent, and difficult." Neurobiol Aging **35**(5): 969-974.

Rudnick, S. I. and G. P. Adams (2009). "Affinity and avidity in antibody-based tumor targeting." Cancer Biother Radiopharm **24**(2): 155-161.

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., T. Iwatsubo, D. M. Mann, H. Shimada, Y. Ihara and S. Kawashima (1995). "Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species, A beta N3(pE), in senile plaques." Neuron **14**(2): 457-466.

Salomone, S., F. Caraci, G. M. Leggio, J. Fedotova and F. Drago (2012). "New pharmacological strategies for treatment of Alzheimer's disease: focus on disease modifying drugs." Br J Clin Pharmacol **73**(4): 504-517.

Sathya, M., P. Premkumar, C. Karthick, P. Moorthi, K. S. Jayachandran and M. Anusuyadevi (2012). "BACE1 in Alzheimer's disease." Clin Chim Acta **414**: 171-178.

Savage, M. J., S. P. Trusko, D. S. Howland, L. R. Pinsky, S. Mistretta, A. G. Reaume, B. D. Greenberg, R. Siman and R. W. Scott (1998). "Turnover of amyloid beta-protein in mouse brain and acute reduction of its level by phorbol ester." J Neurosci **18**(5): 1743-1752.

Scarmeas, N., G. M. Hadjigeorgiou, A. Papadimitriou, B. Dubois, M. Sarazin, J. Brandt, M. Albert, K. Marder, K. Bell, L. S. Honig, D. Wegesin and Y. Stern (2004). "Motor signs during the course of Alzheimer disease." Neurology **63**(6): 975-982.

Schilling, S., T. Appl, T. Hoffmann, H. Cynis, K. Schulz, W. Jagla, D. Friedrich, M. Wermann, M. Buchholz, U. Heiser, S. von Horsten and H. U. Demuth (2008). "Inhibition of glutaminyl cyclase prevents pGlu-Abeta formation after intracortical/hippocampal microinjection in vivo/in situ." J Neurochem **106**(3): 1225-1236.

Schilling, S., T. Hoffmann, S. Manhart, M. Hoffmann and H. U. Demuth (2004). "Glutaminyl cyclases unfold glutamyl cyclase activity under mild acid conditions." FEBS Lett **563**(1-3): 191-196.

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.

Schlenzig, D., R. Ronicke, H. Cynis, H. H. Ludwig, E. Scheel, K. Reymann, T. Saido, G. Hause, S. Schilling and H. U. Demuth (2012). "N-Terminal pyroglutamate formation of Abeta38 and Abeta40 enforces oligomer formation and potency to disrupt hippocampal long-term potentiation." J Neurochem **121**(5): 774-784.

Schumacher, T. N., L. M. Mayr, D. L. Minor, Jr., M. A. Milhollen, M. W. Burgess and P. S. Kim (1996). "Identification of D-peptide ligands through mirror-image phage display." Science **271**(5257): 1854-1857.

Serrano-Pozo, A., M. L. Mielke, A. Muzitansky, T. Gomez-Isla, J. H. Growdon, B. J. Bacskai, R. A. Betensky, M. P. Frosch and B. T. Hyman (2012). "Stable size distribution of amyloid plaques over the course of Alzheimer disease." J Neuropathol Exp Neurol **71**(8): 694-701.

Shiotsuki, H., K. Yoshimi, Y. Shimo, M. Funayama, Y. Takamatsu, K. Ikeda, R. Takahashi, S. Kitazawa and N. Hattori (2010). "A rotarod test for evaluation of motor skill learning." J Neurosci Methods **189**(2): 180-185.

Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson and D. C. Klenk (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." Anal Biochem **150**(1): 76-85.

Soto, C., M. S. Kindy, M. Baumann and B. Frangione (1996). "Inhibition of Alzheimer's amyloidosis by peptides that prevent beta-sheet conformation." Biochem Biophys Res Commun **226**(3): 672-680.

Sperling, R. and K. Johnson (2013). "Biomarkers of Alzheimer disease: current and future applications to diagnostic criteria." Continuum (Minneapolis Minn) **19**(2 Dementia): 325-338.

Sun, N., S. A. Funke and D. Willbold (2012). "A survey of peptides with effective therapeutic potential in Alzheimer's disease rodent models or in human clinical studies." Mini Rev Med Chem **12**(5): 388-398.

Sütterlin, S., I. Hoßmann and R. Klingholz (2011). Demenz-Report: wie sich die Regionen in Deutschland, Österreich und der Schweiz auf die Alterung der Gesellschaft vorbereiten können: 80.

Sykora, P., M. Misiak, Y. Wang, S. Ghosh, G. S. Leandro, D. Liu, J. Tian, B. A. Baptiste, W. N. Cong, B. M. Brennerman, E. Fang, K. G. Becker, R. J. Hamilton, S. Chigurupati, Y. Zhang, J. M. Egan, D. L. Croteau, D. M. Wilson, 3rd, M. P. Mattson and V. A. Bohr (2015). "DNA polymerase beta deficiency leads to

neurodegeneration and exacerbates Alzheimer disease phenotypes." Nucleic Acids Res **43**(2): 943-959.

Tamura, B. K., K. H. Masaki and P. Blanchette (2007). "Weight loss in patients with Alzheimer's disease." J Nutr Elder **26**(3-4): 21-38.

Thies, W. and L. Bleiler (2013). "2013 Alzheimer's disease facts and figures." Alzheimers Dement **9**(2): 208-245.

Ullman-Cullere, M. H. and C. J. Foltz (1999). "Body condition scoring: a rapid and accurate method for assessing health status in mice." Lab Anim Sci **49**(3): 319-323.

van Groen, T., I. Kadish, S. A. Funke, D. Bartnik and D. Willbold (2013). "Treatment with D3 removes amyloid deposits, reduces inflammation, and improves cognition in aged AbetaPP/PS1 double transgenic mice." J Alzheimers Dis **34**(3): 609-620.

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.

Wahlsten, D., P. Metten, T. J. Phillips, S. L. Boehm, 2nd, S. Burkhart-Kasch, J. Dorow, S. Doerksen, C. Downing, J. Fogarty, K. Rodd-Henricks, R. Hen, C. S. McKinnon, C. M. Merrill, C. Nolte, M. Schalomon, J. P. Schlumbohm, J. R. Sibert, C. D. Wenger, B. C. Dudek and J. C. Crabbe (2003). "Different data from different labs: lessons from studies of gene-environment interaction." J Neurobiol **54**(1): 283-311.

Walsh, D. M., I. Klyubin, J. V. Fadeeva, M. J. Rowan and D. J. Selkoe (2002). "Amyloid-beta oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition." Biochem Soc Trans **30**(4): 552-557.

Wiesehan, K. and D. Willbold (2003). "Mirror-image phage display: aiming at the mirror." Chembiochem **4**(9): 811-815.

Wimo, A., L. Jonsson, A. Gustavsson, D. McDaid, K. Ersek, J. Georges, L. Gulacsi, K. Karpati, P. Kenigsberg and H. Valtonen (2011). "The economic impact of dementia in Europe in 2008-cost estimates from the Eurocode project." Int J Geriatr Psychiatry **26**(8): 825-832.

Wirths, O., H. Breyhan, H. Cynis, S. Schilling, H. U. Demuth and T. A. Bayer (2009). "Intraneuronal pyroglutamate-Abeta 3-42 triggers neurodegeneration and lethal neurological deficits in a transgenic mouse model." Acta Neuropathol **118**(4): 487-496.

Wittnam, J. L., E. Portelius, H. Zetterberg, M. K. Gustavsson, S. Schilling, B. Koch, H. U. Demuth, K. Blennow, O. Wirths and T. A. Bayer (2012). "Pyroglutamate amyloid beta (A β) aggravates behavioral deficits in transgenic amyloid mouse model for Alzheimer disease." J Biol Chem **287**(11): 8154-8162.

Woo, H. N., S. H. Baik, J. S. Park, A. R. Gwon, S. Yang, Y. K. Yun and D. G. Jo (2011). "Secretases as therapeutic targets for Alzheimer's disease." Biochem Biophys Res Commun **404**(1): 10-15.

Yamaguchi, H., Y. Nakazato, S. Hirai, M. Shoji and Y. Harigaya (1989). "Electron micrograph of diffuse plaques. Initial stage of senile plaque formation in the Alzheimer brain." Am J Pathol **135**(4): 593-597.

Yan, R. and R. Vassar (2014). "Targeting the beta secretase BACE1 for Alzheimer's disease therapy." Lancet Neurol **13**(3): 319-329.

Zhang, H., Q. Ma, Y. W. Zhang and H. Xu (2012). "Proteolytic processing of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein." J Neurochem **120 Suppl 1**: 9-21.

Zhang, Y. W., R. Thompson, H. Zhang and H. Xu (2011). "APP processing in Alzheimer's disease." Mol Brain **4**: 3.

Zheng, H. and E. H. Koo (2006). "The amyloid precursor protein: beyond amyloid." Mol Neurodegener **1**: 5.

Zhou, Z. D., C. H. Chan, Q. H. Ma, X. H. Xu, Z. C. Xiao and E. K. Tan (2011). "The roles of amyloid precursor protein (APP) in neurogenesis: Implications to pathogenesis and therapy of Alzheimer disease." Cell Adh Migr **5**(4): 280-292.

III Abkürzungsverzeichnis

Alle weiteren Einheiten entsprechen dem internationalen Einheitensystem.

AD	Alzheimer-Demenz
APP	Amyloid-Vorläufer-Protein (engl. amyloid precursor protein)
β-Amyloid-Protein	Aβ
BSA	Rinderserumalbumin (engl. bovine serum albumin)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CSF	Zerebrospinalflüssigkeit (engl. cerebrospinal fluid)
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser (engl. double-distilled water)
D-enantiomere Peptide	D-Peptide
DEA	Diethanolamin
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (engl. Ethylenediaminetetraacetic acid)
ELISA	Enzym-gekoppelter Immunabsorptionstest (engl. enzyme-linked immunosorbent assay)
engl.	englisch
et. al.	und andere (lat. et. alii)
HET	heterozygote TBA2.1-Mäuse
HOM	homozygote TBA2.1-Mäuse
L-enantiomere Peptide	L-Peptide
MCI	leichte kognitive Beeinträchtigung (engl. mild cognitive impairment)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
N-Terminus, N-terminal	Amino-Terminus, amino-terminal
NFTs	neurofibrilläre Bündel (engl. neurofibrillary tangles)
n.s.	nicht signifikant
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat

III Abkürzungsverzeichnis

PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. phosphate buffered saline)
pEA β (3-42)	Pyroglutamat-modifiziertes A β (3-42)
PFA	Paraformaldehyd
SHIRPA	SmithKline Beecham, Harwell, Imperial College, Royal London Hospital, Phänotypbestimmung, engl. SmithKline Beecham, Harwell, Imperial College, Royal London Hospital, phenotype assessment
TBA2.1	TBA2.1-Mäuse
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris gepufferte Salzlösung (engl. Tris buffered saline)
TBS-T	Tris gepufferte Salzlösung mit Triton X-100 (engl. Tris buffered saline with Triton X-100)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV-Licht	ultraviolettes Licht
WT	Wildtypische TBA2.1-Mäuse
upm	Umdrehungen pro Minute

IV Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prozentuale Darstellung der Demenz-Krankheiten	1
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Pathologie der AD.	5
Abbildung 3: Amyloid-Hypothese.....	7
Abbildung 4: Proteolytische Spaltung von APP zu A β	9
Abbildung 5: Bildung des Pyroglutamats aus Glutamat oder Glutamin.....	11
Abbildung 6: Transgenkonstrukt des TBA2.1-Mausmodells.	13
Abbildung 7: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Fragmente zur Bestimmung des Genotyps in den TBA2.1 Mäusen.....	41
Abbildung 8: Primäre Untersuchung und Analyse des Körpergewichts der TBA2.1 in einer Panelstudie.	53
Abbildung 9: Primäre Untersuchung der TBA2.1 in einer Trendstudie.....	54
Abbildung 10: Analyse der Körpergewichte der TBA2.1 in einer Trendstudie.....	55
Abbildung 11: Motorisches Lernverhaltens der TBA2.1 in einer Panelstudie.....	56
Abbildung 12: Durchschnittliche, motorischen Koordination der TBA2.1 in einer Panelstudie.	57
Abbildung 13: Motorisches Lernverhalten der TBA2.1 im Alter von zwei bis fünf Monaten in einer Trendstudie.	58
Abbildung 14: Motorisches Lernverhalten der heterozygoten TBA2.1 im Alter von 18 bis 24 Monaten.	59
Abbildung 15: Motorische Koordination der TBA2.1 in einer Trendstudie.....	60
Abbildung 16: Greifstärke der TBA2.1 im Alter von fünf und 18 bis 24 Monaten.	61
Abbildung 17: Analyse des modifizierter Stabtest von wildtypischen, heterozygoten und homozygoten TBA2.1.....	62
Abbildung 18: Immunfluoreszenz von A β -gefärbten wildtypischen und homozygoten TBA2.1	63
Abbildung 19: Quantifizierung von Hirnschnitten homozygoter TBA2.1.....	64
Abbildung 20: Biochemische Quantifizierung von pEA β (3-42) in der DEA- löslichen und unlöslichen Fraktion.	65
Abbildung 21: Primäre Untersuchung von Placebo-, D3- und D3D3-behandelten TBA2.1.....	67

Abbildung 22: Körpergewichte vor und nach der Behandlung mit Placebo, D3 und D3D3.....	68
Abbildung 23: Motorische Koordination vor und nach der Behandlung mit Placebo, D3 und D3D3.....	69
Abbildung 24: A β -Ablagerungen nach der Behandlung mit Placebo, D3 und D3D3.....	70
Abbildung 25: Biochemische Quantifizierung der pEA β (3-42)-Konzentration nach der Behandlung mit Placebo, D3 und D3D3.....	71
Abbildung 26: Vergleich der Latenzzeit auf dem Rotarod von männlichen und weiblichen TBA2.1 in der Panelstudie.....	76
Abbildung 27: Korrelation des SHIRPA-Scores und der Latenzzeit in der Panelstudie.....	80
Abbildung 28: Korrelation der SHIRPA-Scores und der Latenzzeit in der Trendstudie.....	81

VI Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Material für die Tierhaltung.....	20
Tabelle 2: Verwendete Verhaltensapparaturen und Zubehör.....	21
Tabelle 3: Verwendete Laborgeräte.....	21
Tabelle 4: Labormaterialien.....	25
Tabelle 5: Chemikalien.....	26
Tabelle 6: Puffer und Lösungen.....	29
Tabelle 7: Kits.....	30
Tabelle 8: Oligonukleotide.....	31
Tabelle 9: D-enantiomeren Peptide.....	32
Tabelle 10: Antikörper.....	32
Tabelle 11: Software und Datenbanken.....	33
Tabelle 12: Übersicht der Versuche.....	36
Tabelle 13: Reaktionsansatz der Polymerase-Kettenreaktion.....	39
Tabelle 14: Temperaturschema der Polymerase-Kettenreaktion.....	40

VII Anhang

1. Eidestattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und Zitate kenntlich gemacht habe.

Ferner erkläre ich, dass ich in keinem anderen Dissertationsverfahren mit oder ohne Erfolg versucht habe, diese Dissertation einzureichen.

Teile der Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit wurden als Manuskript eingereicht oder sind dazu in Vorbereitung.

Düsseldorf,

2. Ein-Buchstaben-Aminosäure-Code

Ein-Bustaben-Aminosäure-Code	Aminosäure
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

VIII Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Dieter Willbold für die Möglichkeit im Institut der Strukturbiochemie der Forschungszentrum Jülich GmbH meine Doktorarbeit in dem spannenden Feld der Alzheimer-Demenz durchzuführen. Prof. Dr. Karl-Josef Langen danke ich für die Übernahme des Zweitgutachters sowie für die Möglichkeit in den Laborteilen des Instituts für bildgebende Physik der Forschungszentrum Jülich GmbH arbeiten zu dürfen. Ein ebenso großes Dankeschön möchte ich Dr. Antje Willuweit für die Betreuung meiner Arbeit und ihre Unterstützung aussprechen. Dr. Janine Kutzsche und Dr. Dagmar Jürgens danke ich für ihr Engagement und ihre stetige Hilfsbereitschaft. Außerdem gebührt mein Dank allen Mitarbeitern der zentralen Tierhaltung der Forschungszentrum Jülich GmbH für die hingebungsvolle Fürsorge der TBA2.1-Mäuse.

Des Weiteren möchte ich mich bei den folgenden Menschen für ihre Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken: Christina Dammers, Leonie Hofmann, Kateryna Kravchenko, Maren Thomaier, Stephan Rudolph, Prof. Dr. Susanne Funke, Christina Oslender, Renate Janssen, Nicole Niemitz, Daniela Schumacher, Michael Schöneck, Markus Tusche, Carina Stegmayr, Stephan Weber, Alexandra Boeske, Christine Schlosser, Kerstin Teichmann, Elke Butzküven, Verena Graf, Sarah Schemmert, Julia Post und Jennifer Cohnen. Das Arbeiten war immer sehr angenehm mit euch. Vielen Dank dafür!

Zum Schluss danke ich von ganzem Herzen meinen Freunden und meiner Familie für ihre großartige Unterstützung während der gesamten Zeit.