



Institut für Biologische Informationsverarbeitung
Institut 2: Biologische Strukturforschung

***Identifizierung und Charakterisierung eines
spezifischen Liganden für das Alzheimer
Amyloid- β -Peptid ($A\beta$)***

Katja Wiesehan

***Identifizierung und Charakterisierung eines
spezifischen Liganden für das Alzheimer
Amyloid- β -Peptid ($A\beta$)***

Katja Wiesehan

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 4024

ISSN 0944-2952

Institut für Biologische Informationsverarbeitung

Institut 2: Biologische Strukturforschung Jül-4024

D703 (Diss., Bayreuth, Univ., 2003)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek

D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

☎ 02461/61-5220 · Telefax: 02461/61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Zielsetzung	1
2. Literaturübersicht	2
2.1. Die Alzheimersche Demenz (AD)	2
2.1.1. Übersicht zur Alzheimerschen Demenz	2
2.1.2. Amyloidosen	3
2.1.3. Amyloid- β -Peptid (A β)	3
2.1.4. Alzheimer-Plaques	7
2.1.5. Amyloid-Kaskaden-Hypothese	8
2.1.6. A β -Toxizität	11
2.1.7. Diagnose der Alzheimerschen Demenz	12
2.1.8. Therapieansätze bei der Alzheimerschen Demenz	13
2.2. Evolutive Biotechnologie	16
2.2.1. Warum „evolutive“ Biotechnologie?	16
2.2.2. <i>In-vitro</i> -Selektion	16
2.2.3. Phagen-Display	18
2.2.4. Spiegelbild-Selektion	19
2.3. Bakteriophage M13	22
2.3.1. Morphologie, Genomstruktur und Lebenszyklus	22
2.3.2. M13 als Vektor für Phagen-Display	23
3. Material	25
3.1. Bakterienstämme	25
3.2. Phagen-Display-Peptid-Bibliothek	25
3.3. Oligonukleotide	26
3.4. Eukaryotische Zellen	26
3.5. Peptide	26
3.6. Gewebeschnitte	27
3.7. Nährmedien, Puffer, Lösungen	28
3.7.1. Nährmedien	28
3.7.2. Puffer	29

3.7.3. Lösungen	29
3.8. Biochemikalien und Chemikalien.....	30
3.9. Antikörper und Enzyme.....	30
3.10. Sonstige Materialien	31
3.11. Software	31
4. Methoden.....	32
4.1. Fern-UV-Circulardichroismus-Spektroskopie.....	32
4.2. NMR-Spektroskopie	33
4.2.1. Probenvorbereitung	33
4.2.2. Allgemeine Meßbedingungen	33
4.3. UV/VIS-Spektroskopie.....	33
4.3.1. Absorptionsmessung.....	33
4.3.2. Bestimmung der Bakteriendichte	34
4.3.3. Proteinkonzentrationsbestimmung	34
4.4. Elektronenmikroskopie.....	35
4.5. Selektionen.....	35
4.5.1. Selektion 1	35
4.5.2. Selektion 2	36
4.5.3. Selektion 3	36
4.5.4. Kontrollen.....	37
4.5.5. Amplifizierung der Phagen.....	37
4.5.6. PEG-Fällung von Phagen	38
4.5.7. Bestimmung des Phagentiters.....	38
4.5.8. Statische Auswertung der Selektionsergebnisse	39
4.6. DNA-Isolierung über Anionenaustauschchromatographie.....	40
4.7. DNA-Sequenzierung.....	40
4.8. Fluoreszenzspektroskopische Messungen	41
4.9. Entparaffinierung von Gewebeschnitten	42
4.10. Färbung von A β -Ablagerungen mit Fluo-D-Pep1 und Cy3-markiertem Anti-A β ₁₋₁₆ -Antikörpersystem	42
4.10.1. Färbung von A β -Ablagerungen in Blutgefäßen.....	42
4.10.2. Färbung von A β -Ablagerungen in Form von Plaques	43

4.10.3. Durchführung von Kontrollen	43
4.11. Färbung von verschiedenen Amyloid-Ablagerungen mit Fluo-D-Pep1 und Kongo-Rot	44
4.11.1. Behandlung der Gewebeschnitte vor der Färbung mit dem Fluo-D- Pep1	44
4.11.2. Färbung mit Fluo-D-Pep1.....	44
4.11.3. Färbung mit Kongo Rot.....	44
4.12. Mikroskopie	45
4.13. Zellkulturen.....	45
4.13.1. Beschichtung von Kulturgefäßen mit dem Adhäsionsfaktor Collagen A	45
4.13.2. Kultivierung von eukaryotischen Zellen	46
4.13.3. Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer	46
4.14. Vorbereitung der Peptid-Lösungen für die Cytotoxizitätstests.....	46
4.14.1. Untersuchung der Cytotoxizität der biotinylierten Enantiomere von A β ₁₋₄₂	46
4.14.2. Untersuchung der Cytotoxizität von A β ₁₋₄₂ in Abhängigkeit von der Konzentration	47
4.14.3. Untersuchung des Einfluss von D-Pep1 auf die Cytotoxizität einer 1 μ M A β ₁₋₄₂ - Lösung.....	47
4.14.4. Untersuchung der Cytotoxizität des D-Pep1	48
4.14.5. Untersuchung der Cytotoxizität von fibrillärem A β ₁₋₄₂ in Abhängigkeit von der A β -Konzentration.....	48
4.14.6. Untersuchung des Einfluss von D-Pep1 auf die Cytotoxizität von fibrillärem A β ₁₋₄₂	48
4.15. Durchführung des Cytotoxizitätstests.....	49
4.16. Berechnung der MTT-Reduktion.....	49
5. Experimente und Ergebnisse.....	50
5.1. Physikalische Eigenschaften von Biotinyl-L-A β ₁₋₄₂ und Biotinyl-D-A β ₁₋₄₂	50
5.1.1. NMR-Messungen	51
5.1.2. CD-Messungen	52
5.1.3. Elektronenmikroskopie.....	53
5.2. Einfluss der beiden biotinylierten A β ₁₋₄₂ -Enantiomere auf die Lebensfähigkeit von eukaryotischen Zellen	54
5.3. Ergebnisse der Selektionen	56

5.3.1. Selektion 1	57
5.3.2. Selektion 2	61
5.3.3. Selektion 3	64
5.3.4. Übersicht der vier selektierten, dominierenden Peptide.....	68
5.4. Fibrillenbildung in Dimethylsulfoxid (DMSO).....	71
5.5. Untersuchung der Bindung zwischen dem D-Enantiomer eines selektierten Peptids und synthetischem L-A β ₁₋₄₂	72
5.5.1. Fluoreszenz-Spektroskopie-Titrations-Experimente	72
5.5.2. Abschätzung der Dissoziations-Gleichgewichts-Konstanten (K_D)	73
5.6. Histologische Färbungen mit dem selektierten D-Peptid	76
5.6.1. Prinzip der Färbungen	76
5.6.2. Histologische Färbungen an Gewebeschnitten einer Alzheimer-Patientin – Färbung von A β -Plaques	76
5.6.3. Histologische Färbungen an Gewebeschnitten einer Alzheimer-Patientin – Färbung von A β -Ablagerungen in Blutgefäßen	81
5.6.4. Histologische Färbungen an Gewebeschnitten eines Nicht-Alzheimer-Patienten ..	82
5.7. Histologische Färbungen verschiedener Amyloidose-Fälle	83
5.7.1. Prinzip der Färbungen	83
5.7.2. Histologische Färbungen an Gewebeschnitten: Alzheimersche Demenz	83
5.7.3. Histologische Färbungen an Gewebeschnitten: AA-Amyloidose	85
5.7.4. Histologische Färbungen an Gewebeschnitten : AL κ -Amyloidose	88
5.7.5. Histologische Färbungen an Gewebeschnitten : AL λ -Amyloidose	89
5.8. Einfluss des selektierten D-Peptids auf die cytotoxische Wirkung von A β ₁₋₄₂	90
5.8.1. Einfluss des selektierten D-Pep1 auf die cytotoxische Wirkung von A β ₁₋₄₂ – Zugabe D-Pep1 vor A β -Fibrillenbildung	90
5.8.2. Einfluss von D-Pep1 auf die <i>in-vitro</i> -Cytotoxizität von fibrillärem A β ₁₋₄₂	93
6. Diskussion.....	96
6.1. Aus einer Peptid-Bibliothek wurden mit D-A β ₁₋₄₂ als Target Peptide selektiert.....	97
6.1.1. In Selektion 1 wurden verschiedene Peptide selektiert	97
6.1.2. In der Selektion 1 gegen L-A β ₁₋₄₂ wurde keine dominierende Aminosäure- sequenz selektiert.....	97
6.1.3. Während der Selektion lag A β u.a. in Form von Fibrillen vor.....	98

6.2. D-Pep1 bindet an synthetisches L-A β ₁₋₄₂	99
6.3. D-Pep1 bindet spezifisch an natürlich vorkommendes A β	101
6.3.1. D-Pep1 markiert Alzheimer-Plaques.....	101
6.3.2. D-Pep1 markiert keine anderen Amyloid-Ablagerungen.....	101
6.3.3. D-Pep1 markiert A β -Ablagerungen in Blutgefäßen.....	102
6.3.4. Je nach Vorbehandlung der Gewebeschnitte wurden unterschiedliche Strukturen im Gewebe angefärbt.....	102
6.3.5. Teilweise wurden unterschiedliche Bereiche der A β -Ablagerungen gefärbt.....	105
6.3.6. Diagnose mit D-Pep1?.....	105
6.4. D-Pep1 hat Einfluss auf die Cytotoxizität von A β	107
6.4.1. Einfluss von D-Pep1 ist abhängig vom Zeitpunkt der Zugabe bzw. der Konzentration an D-Pep1	107
6.4.2. Interpretation der Ergebnisse der Cytotoxizitätstests anhand eines kinetischen Modells zur <i>in-vitro</i> -A β -Fibrillenbildung.....	108
6.4.3. Interpretation der Ergebnisse der Cytotoxizitätstests anhand eines erweiterten kinetischen Modells zur <i>in-vitro</i> -A β -Fibrillenbildung.....	111
6.4.4. Vermutungen, an welche A β -Form D-Pep1 bindet.....	113
6.4.5. Therapie mit D-Pep1?.....	114
6.5. D- und L-A β unterschieden sich nicht in ihrem Einfluss die Lebensfähigkeit von PC12-Zellen	115
6.6. Durch andere Selektionsbedingungen wurden andere Peptide selektiert	117
6.7. Ausblick	119
7. Zusammenfassung	121
8. Summary	123
9. Abkürzungsverzeichnis	125
10. Literaturverzeichnis	128
11. Danksagung	143
12. Lebenslauf	144
13. Erklärung	145

1. Einleitung und Zielsetzung

Die Alzheimersche Demenz ist eine progressive, neurodegenerative Demenzerkrankung, deren Hauptcharakteristika neurofibrilläre Degenerationen von Neuronen und extrazelluläre Ablagerungen des Amyloid- β -Peptids ($A\beta$) in Form von Plaques sind. Der Amyloid-Kaskaden-Hypothese zufolge ist die fortschreitende Polymerisierung von $A\beta$ in Form von Fibrillen und Ablagerung der $A\beta$ -Fibrillen das Schlüsselereignis in der Pathogenese der Alzheimerschen Demenz und die Ursache für die Symptome der Krankheit. Basierend auf dieser Hypothese ist $A\beta$ ein viel versprechendes Ziel von Diagnose- und Therapieverfahren. Liganden zum $A\beta$ könnten als Detektionsmarker in bildgebenden Diagnoseverfahren eingesetzt werden. Wird durch die Bindung des Liganden an $A\beta$ die Aggregation des Peptids verhindert, wäre ein Einsatz des Liganden bei der Überprüfung der Amyloid-Kaskaden-Hypothese oder gar in der Therapieentwicklung denkbar.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten Peptide identifiziert werden, die an $A\beta$ binden. Für einen eventuellen Einsatz eines solchen Peptids *in vivo* ist es wichtig, dass das verwendete Peptid möglichst Protease resistent ist, eine geringe oder keine Immunantwort hervorruft und eventuell permeabel für die Blut-Hirn-Schranke ist. Ein Peptid aus D-Aminosäuren (D-Peptid) könnte diese Kriterien erfüllen. Als Methode der Wahl zur Identifizierung eines D-Peptids als $A\beta$ -Ligand wurde das Spiegelbild-Phagen-Display-Verfahren mit einer 12mer Peptid-Bibliothek ausgewählt. Das Ergebnis einer erfolgreich durchgeführten Spiegelbild-Phagen-Display-Selektion gegen ein Peptid als Target ist ein D-Peptid, welches an das natürlich vorkommende L-Enantiomer des $A\beta$ bindet. Ziel dieser Arbeit war die Ausarbeitung des Spiegelbild-Phagen-Display-Verfahrens und deren Durchführung. Weiterhin sollte nach erfolgreicher Selektion das resultierende D-Peptid auf seine Bindung an $A\beta$ untersucht werden. Dies sollte durch Fluoreszenz-Spektroskopie-Titrations-Experimente und durch *in-vitro*-Markierung von Plaques in Gehirngewebeschnitten von Alzheimer-Patienten durch das selektierte D-Peptid erfolgen. Darüber hinaus sollte der Effekt des D-Peptids auf die Cytotoxizität von $A\beta$ untersucht werden.

2. Literaturübersicht

2.1. Die Alzheimersche Demenz (AD)

2.1.1. Übersicht zur Alzheimerschen Demenz

Deutschlandweit gibt es derzeit etwa 900000 Demenzkranke. Etwa zwei Drittel der Demenzkranken sind von der Alzheimerschen Demenz betroffen (Bickel, 1999). AD ist eine der am meisten verbreiteten Formen von altersabhängigen neurodegenerativen Erkrankungen. Demenzerkrankungen sind durch die Abnahme der intellektuellen Leistungsfähigkeit und die Beeinträchtigung der persönlichen Aktivitäten des täglichen Lebens gekennzeichnet. Beeinträchtigt sind vor allem Gedächtnis, Sprache, Orientierungs- und Urteilsvermögen der betroffenen Personen. Für die USA veranschlagte Schätzungen ergaben jährliche Gesamtkosten für die Krankenbetreuung von Alzheimer-Patienten von 67,3 Milliarden US-Dollar (Bickel, 1999). Die AD wird unterteilt in frühauftretende (early-onset) und spätauf tretende (late-onset) familiäre Formen (FAD) und eine sporadische Form. Der Großteil aller Alzheimer-Fälle gehört zur sporadischen Form (Bauer, 1994). Als „sporadisch“ werden solche Alzheimer-Fälle bezeichnet, bei denen in der Familie keine weiteren Alzheimer-Erkrankungen vorhanden waren oder sind. Nur bei 6 bis 7 % aller Fälle von AD findet man eine familiäre Häufung der Erkrankung, wobei die Vererbung durch einen autosomal-dominanten Vererbungsmodus erfolgt (Bauer, 1994).

Benannt wurde die Alzheimersche Demenz nach Aloys Alzheimer, einem der Pioniere in der Erforschung von Demenz-Erkrankungen. Er grenzte als erster diese Demenzform von den gefäßbedingten Demenzen ab und beschrieb das Auftreten von extrazellulären Ablagerungen in Form von Plaques und intrazelluläre Fibrillen in kortikalen Nervenzellen in der Hirnrinde einer Demenz-Patientin (Alzheimer, 1907; Alzheimer *et al.*, 1995). So genannte neuritische Plaques (siehe Kapitel 2.1.4.) und neurofibrilläre Proteinfilamente, welche bei histopathologischen Untersuchungen von Gehirngewebeprobe n von Alzheimer-Patienten gefunden werden, gelten heute als die Hauptcharakteristika der Krankheit. Die Neurobiologie von Alzheimer-Patienten ist u.a. gekennzeichnet durch neurodegenerative Effekte wie Abnahme der Synapsendichte, neurofibrilläre Degeneration von Nervenzellen, chronisch-

entzündliche Prozesse und Verringerung der Acetylcholintransferase-Aktivität (Bauer, 1994; Selkoe, 1999). Die genauen Ursachen der auftretenden Krankheitssymptome und die Pathogenese der AD sind zum heutigen Zeitpunkt noch nicht vollständig aufgeklärt.

2.1.2. Amyloidosen

Unter dem Begriff Amyloidosen sind Proteinspeicherkrankheiten zusammengefasst, die durch Fehlfaltung bestimmter Proteine verursacht werden. Es kommt zur Ablagerung von normalerweise löslichen Proteinen. Diese Amyloid-Ablagerungen bestehen aus Proteinen in fibrillärer Form, welche als gemeinsames Strukturmotiv eine β -Faltblatt-Konformation aufweisen (Guijarro *et al.*, 1998). Die Amyloid-Fibrillen bestehen aus proteolytischen Fragmenten von normalen oder mutierten Genprodukten. Die bekannten Amyloid-Proteine weisen keine Übereinstimmungen bezüglich der Aminosäuresequenz oder in der Struktur ihrer löslichen Form auf (Guijarro *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu sind die Amyloid-Fibrillen sehr einheitlich. Sie sind lang, gerade, unverzweigt und haben einen Durchmesser von 7 bis 12 nm (Guijarro *et al.*, 1998). Bis jetzt sind über 20 Proteine bekannt, die solche Aggregate bilden und sich in distinkten Geweben ablagern. Die Aggregate haben gemeinsame Eigenschaften, u.a. Kongo-rot-Bindung, grüne Doppelbrechung von polarisiertem Licht und ein charakteristisches Röntgenbeugungsmuster (Serpell, 2000).

Es gibt zahlreiche Krankheiten mit verschiedenen Etiologien, welche durch die Ablagerung von Amyloid-Peptiden gekennzeichnet sind. Zu den bekanntesten Amyloidosen zählen die Alzheimersche Demenz und transmissible spongiforme Enzephalopathie, wozu auch Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) beim Rind und die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit beim Menschen gehören.

2.1.3. Amyloid- β -Peptid (A β)

Ein neuropathologisches Merkmal der AD sind extrazelluläre Ablagerungen in Form von Amyloid-Plaques (siehe Kapitel 2.1.3). Die Amyloid-Plaques bestehen zum Großteil aus dem so genannten Amyloid- β -Peptid (A β) (Masters *et al.*, 1985), welches hauptsächlich in fibrillärer Form auftritt. Neben der Ablagerung als Plaques kann das fibrilläre A β auch als Ablagerungen in Blutgefäßen des Gehirns vorkommen (Glenner *et al.*, 1984; Wong *et al.*, 1985). Diese als kongophile Angiopathie (CAA) bezeichnete Krankheit weist ein ähnliches

klinisches Krankheitsbild auf wie die AD. A β besteht aus 39 bis 43 Aminosäuren, hat Sequenzbereiche mit überwiegendem Anteil an hydrophoben Aminosäuren und entsteht durch proteolytische Spaltung des Amyloid-Vorläuferproteins (Amyloid Precursor Protein, A β PP) (Haass *et al.*, 1992a; Kang *et al.*, 1987; Weidemann *et al.*, 1989). Der C-Terminus von A β ist variabel. Die dominierenden Formen sind A β ₁₋₄₀ und A β ₁₋₄₂. A β wird nanomolaren Konzentrationen im Plasma und in der zerebrospinalen Flüssigkeit von gesunden und an Alzheimer-erkrankten Patienten gefunden und konstitutiv in Zellkultur produziert (Haass *et al.*, 1992b; Seubert *et al.*, 1992).

A β PP ist ein transmembranes Glycoprotein, welches auf dem Chromosom 21 kodiert ist. Es kommt in den Längen von 695, 751 und 770 Aminosäuren vor (Selkoe, 1999). Die A β -Domäne beginnt im extrazellulären Raum und endet in der Membran. A β PP wird durch eine noch nicht identifizierte α -Sekretase gespalten (Haass, 1999) (siehe Abbildung 2-1). Sie spaltet inmitten der A β -Domäne. Eine Bildung eines vollständigen A β ₁₋₄₀ bzw. 42 ist somit nicht mehr möglich. Es kommt zur Sezernierung der N-terminalen Domäne des A β PP (lösliches A β PP = A β PPs) und die Bildung eines ca. 10 kDa großen C-terminalen Fragments (Weidemann *et al.*, 1989). Bisherige Untersuchungen ergaben verschiedene Funktionen des A β PPs. Es ist bekannt, dass A β PPs eine autokrine Funktion hat und die Zellproliferation stimuliert (Saitoh *et al.*, 1989). Weiterhin fördert es in Zellkultur die Adhäsion von Zellen an ihre Substrate (Schubert *et al.*, 1989), schützt Neuronen gegen oxidative Schäden (Goodman und Mattson, 1994), interferiert mit G-Protein-gekoppelten, intrazellulären Signalprozessen (Nishimoto *et al.*, 1993) und fördert die MAP-Kinaseaktivität (Greenberg *et al.*, 1994).

An der Bildung von A β sind die so genannten β - und γ -Sekretasen beteiligt. Die initiale Spaltung von A β PP am N-terminalen Ende der A β -Domäne wird durch die β -Sekretase katalysiert. Diese wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen als membrangebundene Aspartat-Protease identifiziert (Hussain *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2000; Sinha *et al.*, 1999; Vassar *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 1999). Sie wird als BACE (beta-site A β PP cleaving enzyme) bezeichnet. Nach der Spaltung durch eine γ -Sekretase wird A β in den extrazellulären Raum entlassen. Als mögliche Katalysatoren der γ -Sekretase-Reaktion werden die Preseniline diskutiert. Eine Hypothese ist, dass Preseniline Bestandteile eines membrangebundenen Multi-Enzym-Komplexes sind, welcher für die γ -Sekretase-Aktivität verantwortlich ist (Sommer, 2002).

Studien über den Einfluss eines γ -Sekretase-Inhibitors auf die Bildung von $A\beta_{1-40}$ und $A\beta_{1-42}$ haben ergeben, dass die Produktion von $A\beta_{1-40}$ selektiv inhibiert werden kann, während die Produktion von $A\beta_{1-42}$ kaum beeinflusst wird. Nach Citron *et al.* lässt dies darauf schließen, dass verschiedene Proteasen für die Spaltung von A β PP in $A\beta_{1-40}$ bzw. $A\beta_{1-42}$ verantwortlich sind (Citron *et al.*, 1996).

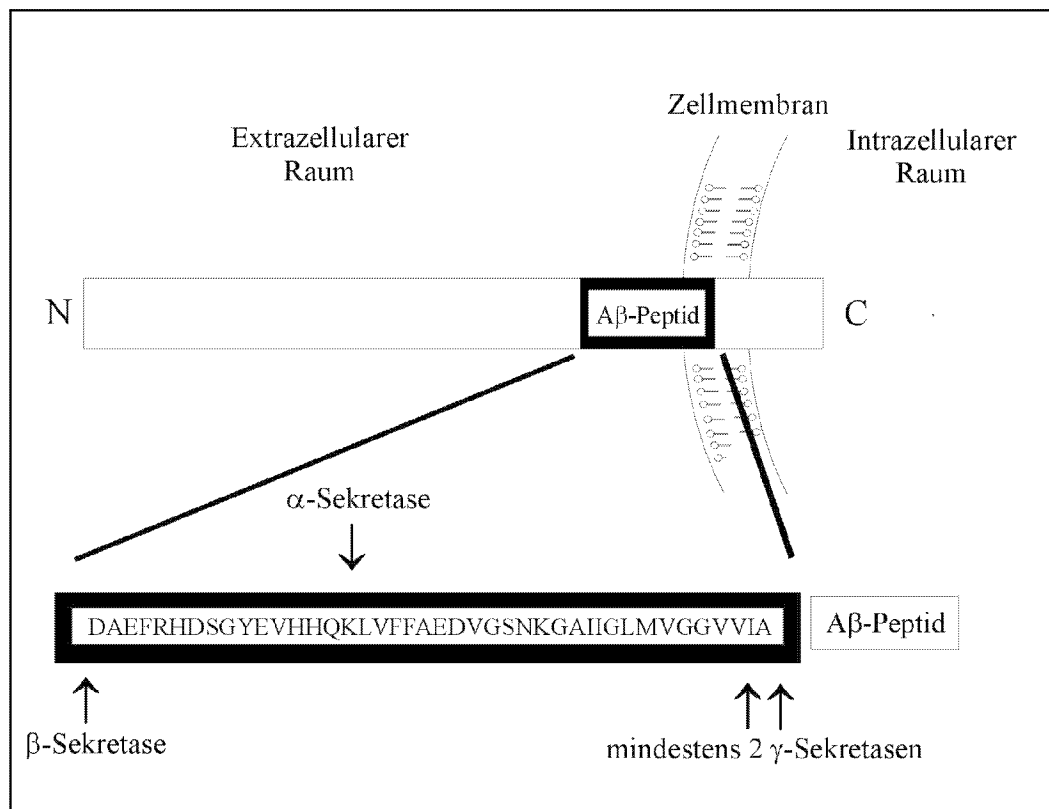


Abbildung 2-1: Schema zur Prozessierung von A β PP (modifiziert nach (Behl, 1999; Lansbury, 1997; Selkoe, 1999))

Das Schema zeigt einen Ausschnitt aus der Prozessierung des A β PP. Berücksichtigt sind die Prozessierungsschritte, die zur Bildung von A β führen. A β_{1-42} ist vergrößert und mit Aminosäuresequenz aufgeführt. Die Schnittstellen der α -, β - und γ -Sekretasen wurden durch Pfeile gekennzeichnet. Die Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code angegeben.

Die Fibrillenbildung von A β ist Gegenstand derzeitiger Forschung und Diskussion. Es gibt verschiedene Erklärungsansätze und Hypothesen, wie die *in-vitro*-Umwandlung des Monomers zur Fibrille erfolgt. Ein Erklärungsversuch ist die Annahme eines nukleationsabhängigen Polymerisationsprozesses, der zeit- und konzentrationsabhängig ist (Jarrett und Lansbury, 1993; Harper und Lansbury, 1997; Lomakin *et al.*, 1997). Die Kinetik solcher Prozesse wird von zwei Parametern beeinflusst, der Nukleationsrate und der Elongationsrate. Stark vereinfacht wird in diesem *in-vitro*-Modell davon ausgegangen, dass

Monomere sich in Lösung zusammenlagern und einen Aggregationskeim bilden. Wenn ein Aggregationskeim eine kritische Größe erreicht, wird aus diesem Aggregationskeim eine Fibrille gebildet. Diese Fibrille wächst durch Anlagerung von weiteren A β -Molekülen zu einer voll ausgebildeten Fibrille, wie sie durch verschiedene Methoden nachgewiesen wurde. Da die A β -Konzentrationen im Körper gering sind, dauert es lange, bis solche Nukleationskeime gebildet werden. Bei Alzheimer-Patienten einer sporadischen Alzheimer-Erkrankung (siehe Kapitel 2.1.1.) tritt die Krankheit meist im höheren Alter auf. Das Alter ist ein Risikofaktor der AD.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen haben gezeigt, dass die Amyloid-Fibrillen gerade, unverzweigte Strukturen mit 7 bis 10 nm Durchmesser und unbestimmter Länge bilden (Serpell, 2000). Nach Serpell (Serpell, 2000) gestaltet sich die Strukturbestimmung der A β -Peptide in löslicher Form aufgrund der geringen Löslichkeit des Peptids in wässriger Umgebung und der hohen Stabilität der entstehenden Fibrillen schwer. Messungen verschiedener Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass A β in organischen Lösungsmitteln neben der unstrukturierten Knäuelstruktur („random-coiled“) eine α -helikale Konformation annimmt (Sticht *et al.*, 1995; Serpell, 2000). In wässrigen Puffern und H₂O liegt das Peptid als β -Faltblatt vor, wobei hier sowohl fibrilläre als auch amorphe Strukturen beobachtet wurden (Serpell, 2000). Neben dem Monomer und den voll ausgebildeten Fibrillen wurden weitere Molekülstrukturen gefunden, die allgemein als Protofilamente oder Protofibrillen bezeichnet werden (Harper *et al.*, 1997; Walsh *et al.*, 1997). Sie weisen einen geringeren Durchmesser und eine geringere Länge als die voll ausgebildeten Fibrillen auf und werden als mögliche Intermediate der Fibrillenbildung diskutiert. Nach Serpell (Serpell, 2000) wird das β -Faltblatt als in den Fibrillen vorkommende Struktur allgemein akzeptiert. Aus mehreren β -Faltblatt-Strukturen werden β -Stränge gebildet, die sich senkrecht zur Fibrillenachse anordnen („cross- β -conformation“) und durch Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind. Dabei sollen sich mehrere Protofilamente zu einer Fibrille zusammenlagern. Bei der Fibrillenbildung scheinen sowohl hydrophobe als auch elektrostatische Wechselwirkungen wichtig zu sein (Serpell, 2000). Der Mechanismus der Fibrillenbildung und die exakte Morphologie der Fibrillen werden zurzeit in verschiedenen Arbeitsgruppen erforscht.

Einigen A β -Sequenzabschnitten wurden Funktionen zugeordnet. Untersuchungen von Giulian *et al.* (Giulian *et al.*, 1998) zufolge ist die H H Q K-Sequenz (Aminosäuren 13 bis 16,

Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code) für die Bindung von Mikroglia-Zellen wichtig. Durch selektive Modifikationen der Aminosäuren am N-Terminus des A β -Peptids sie heraus, dass diese Region für die initiale Interaktion der Mikroglia-Zellen mit Amyloid-Plaques notwendig ist (Giulian *et al.*, 1998). In vorhergehenden Studien wurde gezeigt, dass kultivierte menschliche Mikroglia-Zellen durch Plaques zu einer Sekretion von stark neurotoxischen Aminen stimuliert werden (Giulian *et al.*, 1995). Die hydrophobe A β ₁₆₋₂₀-Region K L V F F (Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code) (Tjernberg *et al.*, 1996) ist anscheinend essentiell für die Selbsterkennung der A β -Monomere bei der Fibrillenbildung. Nach Hilbich *et al.* bildet die Region A β ₁₀₋₄₂ den β -Faltblatt-Kern der Amyloid-Fibrillen. Die Reste A β ₁₋₉ werden nach außen exponiert und sollen in die Interaktion zwischen den Fibrillen involviert sein (Hilbich *et al.*, 1992).

2.1.4. Alzheimer-Plaques

Alzheimer-Plaques sind diffus in die Hirnrinde und verschiedene andere Gehirnregionen eingestreute, extrazelluläre Ablagerungen (siehe Kapitel 2.1.3.), die aus verschiedenen Komponenten bestehen und einen Durchmesser von 5 bis 200 μ m aufweisen. Hauptbestandteil aller Alzheimer-Plaques ist das Peptid A β (siehe Kapitel 2.1.3.). Die Plaques treten vorwiegend im Cortex cerebri (Großhirnrinde), im Hippocampus und im limbischen System des Gehirns auf und werden in geringerer Dichte auch in Gehirnen von Personen gefunden, bei denen die Symptome der Alzheimerschen Demenz nicht auftreten (Bauer, 1994). Bei den Alzheimer-Plaques wird grob zwischen neuritischen Plaques, welche auch als senile Plaques bezeichnet werden, und diffusen Plaques unterschieden. Die diffusen Plaques bestehen aus einer amorphen, nicht fibrillären Form von A β ₁₋₄₂-Ablagerungen und gelten als Vorstufe der anderen Plaques (Bauer, 1994). In den neuritischen Plaques findet man A β in Form von Fibrillen vermischt mit der nicht-fibrillären Form des Peptids. Neben dem A β ₁₋₄₂-Peptid sind hier auch das A β ₁₋₄₀ und andere Fragmente des A β PP (siehe Kapitel 2.1.3.) vertreten (Bauer, 1994; Selkoe, 1999). Zusätzlich treten Mikroglia-Zellen und Astrozyten in variabler Anzahl auf, die bei diffusen Plaques kaum oder gar nicht gefunden werden (Selkoe, 1999). Die neuritischen Plaques kommen wiederum in verschiedenen Formen vor. Die kompakten Plaques bestehen hauptsächlich aus A β -Fibrillen und werden als „Kern ohne Hof“ (Bauer, 1994) bezeichnet. Die Struktur des „Kerns“ ist porös mit charakteristischer

Porengröße (Cruz *et al.*, 1997). Die primitiven Plaques werden als „Höfe ohne Kern“ bezeichnet (Bauer, 1994). Die klassischen Plaques sind „Kerne mit Hof“ (Bauer, 1994) und bestehen aus einem Kern mit kompaktem Material und einer Randzone (Corona) mit A β -Amyloidfasern, aktivierten Astrozyten und Gliazellen und degenerativ veränderten Nervenzellfortsätzen (Ablagerungen des τ -Proteins). Diese Randzone entspricht den primitiven Plaques (Bauer, 1994; Wisniewski *et al.*, 1973). In Abbildung 2-2 sind verschiedene Plaqueformen gezeigt.

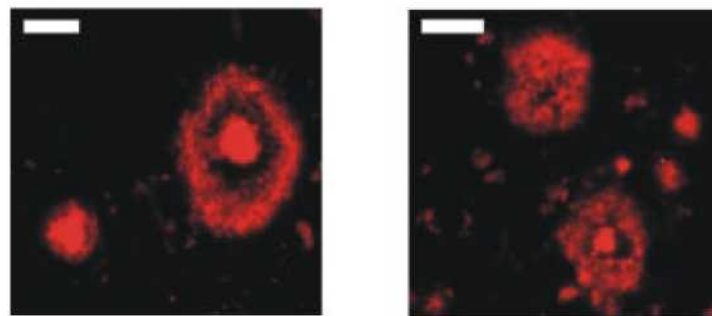


Abbildung 2-2: Verschiedene Plaqueformen gefärbt mit einem Cy3-markiertem A β_{1-16} -Antikörpersystem (Quelle: eigene Arbeiten). Die Länge des Balkens entspricht 20 μ m.

2.1.5. Amyloid-Kaskaden-Hypothese

Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese weist A β eine zentrale Rolle in der Pathogenese der AD zu. In dieser Hypothese werden die Aggregation des A β und die Ablagerung der Aggregate in Form von Plaques (siehe Kapitel 2.1.4.) als Auslöser der Krankheitssymptome bei Alzheimer-Patienten postuliert. Nach Dennis Selkoe musste der Begriff „Amyloid-Kaskaden-Hypothese“ in „A β -Hypothese“ umgewandelt werden, bis alle toxischen Formen des A β gefunden sind (Selkoe, 2001). Damit soll berücksichtigt werden, dass in Untersuchungen der letzten Jahre auch toxische Effekte für nicht-aggregiertes A β nachgewiesen wurden (Selkoe, 2001).

Hinweise, dass A β eine entscheidende Rolle in der Alzheimer-Pathogenese einnimmt, geben Genanalysen von Personen, die von der familiären Form der Alzheimerschen Demenz (FAD) betroffen sind. Bei solchen Genanalysen von FAD-Patienten wurden Mutationen im Gen des A β PP und in den Genen für die homologen Presenilin-Proteine (PS) Presinilin 1 (*PS1*, Chromosom 14) und Presenilin 2 (*PS2*, Chromosom 1) gefunden. Während die FAD-Mutationen für A β PP und *PS2* relativ selten sind, wurden mehr als 80 verschiedene

Mutationen im *PS1* gefunden (Walter *et al.*, 2001). Missense-Mutationen im *PS1* und *PS2* führen zur frühauftretenden Form von AD (Beginn im Alter von 40 bis 60 Jahren) (Selkoe, 1999). Als Risikofaktor für das Auftreten der AD ist eine genetische Variante des Plasmaproteins Apolipoprotein E (ApoE), das ApoE4, beschrieben (Castano *et al.*, 1995; Holtzman *et al.*, 2000). ApoE ist involviert in den Cholesterol-Transport aus dem Blut in die Zellen. Dem ApoE4 wird ein Einfluss auf die Aggregation von A β zugeschrieben (Selkoe, 1999)(siehe Abbildung 2-3).

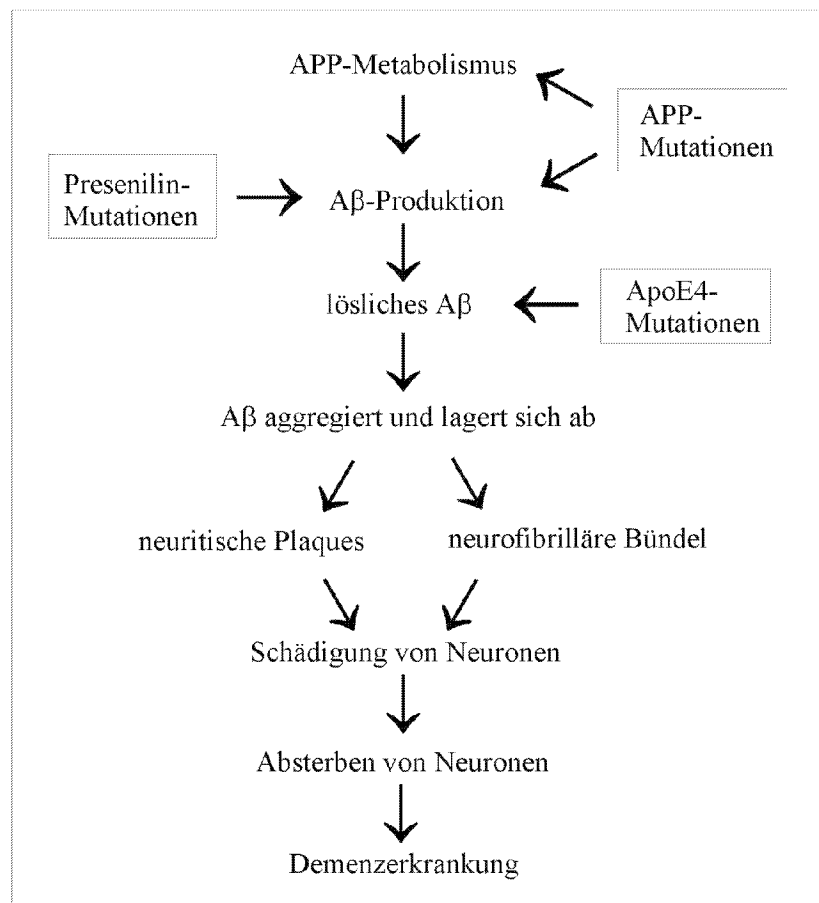


Abbildung 2-3: Schema zur Amyloid-Kaskaden-Hypothese (modifiziert nach (Hardy, 1997) (Behl, 1999))

Veränderungen im *A β PP*-Gen können auf mindestens zwei Wegen zum Alzheimer-Syndrom führen: durch Überexpression von A β PP oder durch Mutationen, die die Bildung von A β oder die A β -Aggregation steigern. Das Gen für das A β PP ist auf dem Chromosom 21 lokalisiert. Bei den bisher im *A β PP*-Gen gefundenen 8 Missense-Mutationen handelt es sich um Substitutionen, die innerhalb oder in der Nachbarschaft der A β -kodierenden Region auftreten. Sie liegen jeweils höchstens 6 Aminosäuren von den Spaltstellen der α -, β - oder γ -

Sekretase entfernt (Haass, 1999). Untersuchungen in Zellkultur und an transgenen Mäusen zeigten, dass die Mutationen durch Steigerung der Häufigkeit der Spaltung durch β - oder γ -Sekretase zur chronischen Erhöhung der $A\beta_{1-42}$ -Konzentration führten (Selkoe, 1999). Eine Überexpression von A β PP findet man bei Personen mit dem Down-Syndrom. Das Down-Syndrom ist durch eine Trisomie des Chromosoms 21 charakterisiert, auf dem das A β PP kodiert ist. Bei einem Großteil der betroffenen Personen kommt es bereits in frühen Jahren (40. bis 50. Lebensjahr) zur Entwicklung der für die AD typischen Symptome (Hyman, 1992). Plaques in Gehirnen von Down-Patienten enthalten A β (Masters *et al.*, 1985).

Ein direkter Zusammenhang zwischen den PS-Mutationen und der Bildung von A β wird durch die Tatsache gestützt, dass Gehirne von FAD-Patienten mit PS-Mutationen eine erhöhte Anzahl von Amyloid-Plaques enthalten (Lemere *et al.*, 1996). Außerdem weisen neuronale Zellen von „knock-out“-Mäusen, denen beide PS1-Allele fehlen ($PS1^{-/-}$), eine wesentlich geringere Bildung von A β auf (De Strooper *et al.*, 1998). Derzeitig ist noch nicht geklärt, ob Preseniline γ -Sekretasen bzw. Bestandteile eines γ -Sekretase-Komplexes sind oder ob sie den Transport der γ -Sekretase und A β PP zueinander regulieren (Janus *et al.*, 2000a; Selkoe, 1999).

Games *et al.* (Games *et al.*, 1995) ist es gelungen, transgene Mäuse zu entwickeln, die große Mengen an humanen, mutierten (V717F) A β PP exprimieren. Diese Mäuse wiesen für Alzheimer-typische Merkmale wie *in-vivo*-A β -Ablagerungen, induzierte entzündliche Reaktionen mit aktivierten Mikroglia-Zellen und eine Reduktion der Synapsendichte auf. Hsiao *et al.* (Hsiao *et al.*, 1996) entwickelten ein Mausmodell mit einer Überexpression an mutiertem, humanen A β PP (K670N, M671L) und beobachteten eine Progression der neurologischen Symptome. Eine Bildung von neurofibrillären Bündeln („neurofibrillary tangles“) und ein Verlust von Neuronen konnte von beiden nicht nachgewiesen werden. Soto *et al.* (Soto *et al.*, 1998) führten intrazerebrale Injektionen von nicht-aggregiertem A β an Ratten durch. Am Ort der Injektion kam es zu einer Bildung von plaque-ähnlichen Ablagerungen. Es wurden zerebrale Schäden wie die Verkleinerung von Neuronen und die Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia-Zellen beobachtet. Derartige Symptome werden ebenfalls bei Alzheimer-Patienten beobachtet (Soto *et al.*, 1998). Neben den extrazellulären Ablagerungen des A β treten bei Alzheimer-Patienten intrazelluläre Ablagerungen des τ -

Proteins auf, die als gepaarte helikale Filamente („paired-helical filaments“, PHF) sichtbar werden. Unter normalen Bedingungen ist das τ -Protein Teil des Cytoskeletts. In den neurofibrillären Bündeln kommt das τ -Protein in hyperphosphorylierter Form vor. Untersuchungen von Götz *et al.* (Götz *et al.*, 2001) mit τ -transgenen Mäusen demonstrieren einen Einfluss von A β auf die Bildung der τ -Proteinablagerungen. Sie injizierten fibrilläres A β_{1-42} in die Hippocampi der τ -transgenen Mäuse und beobachteten eine fünffach erhöhte Bildung von PHFs relativ zu einer Kontrolle ohne A β -Injektion (Götz *et al.*, 2001). Dies ist ein weiterer Punkt, der für die zentrale Rolle des A β in der Alzheimer-Pathogenese spricht.

2.1.6. A β -Toxizität

1989 beschrieben Yankner *et al.* zum ersten Mal die *in-vitro* Neurotoxizität eines Fragments des A β PP in neuronalen Zellkulturen (Yankner *et al.*, 1989). Keine bzw. geringe toxische Wirkung hat A β in Form einer unstrukturierten Knäuelkonformation („random coiled“). Erst A β mit einer β -Faltblatt-Konformation besitzt neurotoxische Eigenschaften und führt bei Zugabe von A β zu Zellkulturmedien zu neuronalem Zelltod (Simmons *et al.*, 1994). Lorenzo und Yankner (Lorenzo und Yankner, 1994) haben festgestellt, dass amorphes A β_{1-42} *in vitro* nicht toxisch für Zellen ist. Fibrilläres A β ist toxisch (Lorenzo und Yankner, 1994). Walsh *et al.* (Walsh *et al.*, 1999) untersuchten die *in-vitro*-Cytotoxizität von synthetischem A β_{1-40} in Abhängigkeit vom Grad der Aggregation. Sie unterschieden dabei zwischen A β_{1-40} in Form von so genannten Protofibrillen oder Protofilamenten, mit einem Durchmesser von 4-10 nm und einer Länge bis 200 nm und Fibrillen mit unbestimmter Länge > 200 nm und einem Durchmesser von 8-10 nm. Es zeigte sich, dass unter den gegebenen Versuchsbedingungen sowohl die Protofilamente als auch die Fibrillen zu einer Inhibierung der biologischen Aktivität der *in vitro* verwendeten primären kortikalen Neuronen aus der Ratte führten (Walsh *et al.*, 1999). Laut Lambert *et al.* sind auch kleine, diffuse Oligomere *in-vitro* toxisch (Lambert *et al.*, 1998). Nach Walsh *et al.* müssen bei der Entwicklung von Therapeutika, die auf der Hemmung der Fibrillenbildung basieren, solche A β -Oligomere berücksichtigt werden, da es dabei zu alternativen, ebenfalls toxischen Aggregationsformen von A β kommen kann (Walsh *et al.*, 1999).

Der Mechanismus, der zur neurotoxischen Wirkung von A β führt, ist noch nicht bekannt. Es gibt verschiedene Forschungsansätze. Arispe *et al.* (Arispe *et al.*, 1993b) publizierten, dass A β_{1-40} Kationen-Kanäle bildet, wenn es in synthetische, membran-ähnliche Strukturen eingelagert wird (Arispe *et al.*, 1993a; Arispe *et al.*, 1994; Arispe *et al.*, 1993b). Ein anderer Ansatzpunkt ist ein Mechanismus, der auf der Interaktion von A β mit Membranrezeptorproteinen auf der Oberfläche von Neuronen und anderen Zelltypen (u.a. Astrozyten) basiert. Dies könnte zur Quervernetzung von Zellen oder zur Aktivierung von Apoptosis-Prozessen führen (Pike *et al.*, 1993 Loo, 1993 #1343; Ivins *et al.*, 1999). Auch durch A β induzierter oxidativer Stress wird als mögliche Ursache der Pathogenese in Betracht gezogen (Behl, 1999).

2.1.7. Diagnose der Alzheimerschen Demenz

Die Diagnostik der AD ist mangels spezifischer Marker weitgehend eine Ausschlussdiagnostik (Ihl, 1999). Die AD ist die am häufigsten vorkommende Form von Demenzen. Obwohl sie nur eine von über 70 bekannten Demenzerkrankungen ist, werden zwei Drittel aller Demenz-Fälle als Alzheimer-Fälle eingeordnet. Eine eindeutige Diagnose der Demenz ist schwierig, aber wichtig. Jede Demenz muss anders therapiert werden, was eine frühe und eindeutige Diagnose voraussetzt. Zwischen 10 bis 20 % aller an einem dementiellen Syndrom erkrankten Patienten leiden an einer reversiblen Demenzform. Reversible Demenzsyndrome können Folge z.B. von Einwirkung und Wechselwirkungen von Medikamenten, von Vitamindefiziten (Folsäuremangel-Syndrom) oder einer Nebenschilddrüsenerkrankung sein (Bauer, 1994). Demenzen können auch als Folgeerscheinung anderer Krankheiten z.B. Depressionen, frontotemporale und vaskuläre Demenzen, Parkinson-Krankheit, chronischer subdurale Hematome und HIV-Infektion auftreten (Bauer, 1994; Boss, 2000).

Die Diagnose der AD beruht anfänglich auf Befragungen der Familienangehörigen, psychiatrische Untersuchungen und Tests der kognitiven Leistungen. Es folgt die Labor-diagnostik mit Untersuchung des Blutbildes, der HIV-Serologie, des Folsäurespiegel u.ä.. Die Untersuchungen resultieren in einem Bild vom Verhalten und der körperlichen Verfassung des Patienten. Damit sollen andere Demenzformen ausgeschlossen werden (Ihl, 1999). Zur Zeit werden Verfahren für Liquoruntersuchungen, zur morphologischen und funktionellen Bildgebung wie MRT (Magnetresonanztomographie) und PET (Positronen-Emissions-

Tomographie), und strukturell-bildgebende Verfahren wie Computertomographie (CT) weiterentwickelt, um einen Einsatz dieser Verfahren in die weitere Diagnose zu ermöglichen (Fox *et al.*, 2001; Hampel *et al.*, 1999; Schröder und Pantel, 1999). Eine definitive Diagnose der Alzheimerschen Demenz war bisher erst *post mortem* durch die pathohistologische Untersuchung von Gewebeproben von Alzheimer-Patienten durch das Auffinden von senilen Plaques und/oder neurofibrilläre Degenerationen möglich. Ziel derzeitiger Arbeiten zur Verbesserung der bildgebenden Verfahren ist die Entwicklung neuer Substanzen, die eine *in-vivo*-Markierung von Alzheimer-Plaques ermöglichen. Bei der Entwicklung solcher Marker wurde bisher auf bekannte A β -Liganden wie Kongo-Rot und Thioflavin-T zurückgegriffen (Dezutter *et al.*, 1999; Klunk *et al.*, 2001; Skovronsky *et al.*, 2000). Agdeppa *et al.* entwickelten eine hydrophobe, fluoreszierende Substanz 2-(1-{6-[(2-[^{18}F] Fluoroethyl)(Methyl)amino]-2-Naphthyl}Ethylidene, welche die Blut-Hirn-Schranke überwindet und eine Determinierung von Alzheimer-Plaques und neurofibrillären Bündeln in Gehirnen von lebenden Alzheimer-Patienten ermöglicht (Agdeppa *et al.*, 2001; Shoghi-Jadid *et al.*, 2002). Die Bindung der entwickelten Substanzen basiert auf der Erkennung von Fibrillen und nicht auf der spezifischen Erkennung einzelner Protein-Domänen. Es werden allgemein amyloide Ablagerungen (siehe Kapitel 2.1.2.) angefärbt. Wengenack *et al.* injizierten transgene Mäusen 200 μg ^{125}I -markiertes A β_{1-40} und wiesen eine Markierung von A β -Plaques *in-vivo* nach (Wengenack *et al.*, 2000). Noch wird keine der entwickelten Substanzen zum Routineeinsatz in der Alzheimer-Diagnostik verwendet.

2.1.8. Therapieansätze bei der Alzheimerschen Demenz

Neben der Verbesserung der Diagnose ist die Entwicklung von Therapieansätzen ein weiterer Schwerpunkt der derzeitigen Alzheimer-Forschung. Basierend auf der Amyloid-Kaskaden-Hypothese gibt es nach Lansbury (Lansbury, 1997) und Soto (Soto, 1999) folgende Strategien zur Therapie der Alzheimerschen Demenz:

1. Suppression der A β PP -Expression

Auf die Bedeutung von A β PP in der Alzheimer-Pathogenese wurde in Kapitel 2.1.3. schon eingegangen. Eine Reduktion der A β PP-Genexpression wäre durch Einsatz moderner Techniken der Gentherapie wie z.B. Antisense-Oligonukleotide oder RNA-Interferenz

denkbar. Im Mausmodell mit reduzierter A β PP-Produktion traten verschiedene neurologische Schäden auf, die Hinweise darauf geben, dass A β PP eine wichtige Rolle bei der Funktion des zentralen Nervensystems hat (Muller *et al.*, 1994; Zheng *et al.*, 1995). Dies spricht gegen eine Suppression der A β PP -Expression als Therapieansatz.

2. Hemmung der A β_{1-40} - und/oder der A β_{1-42} - Produktion

Eine Hemmung der Amyloid-Produktion ist durch eine gezielte Hemmung der an der A β PP - Spaltung involvierten Proteasen denkbar. Der Mechanismus der proteolytischen Spaltung des A β PP zu A β_{1-40} bzw. A β_{1-42} ist noch nicht vollständig aufgeklärt (siehe Kapitel 2.1.3.). Ein mögliches Ziel einer therapeutischen Behandlung ist die β -Sekretase, die als Aspartyl-Protease (BACE) identifiziert wurde (siehe Kapitel 2.1.3.). Arbeiten zur gezielten Deletion der BACE in Gehirnen von transgenen Mäusen zeigten, dass „knock-out“ Mäuse eine komplette Hemmung der A β -Produktion und keine eindeutige Pathologie aufwiesen (Cai *et al.*, 2001; Luo *et al.*, 2001). Dies lässt hoffen, dass spezifische BACE-Inhibitoren ein effektiver Weg zur Verringerung der A β -Konzentration im Gehirn ohne Nebeneffekte ist. „Knock-out“ Mäuse mit einer *PS1*^{-/-}-Deletion sind nicht lebensfähig (De Strooper *et al.*, 1998). A β_{1-40} -Produktion kann durch Proteasehemmer selektiv gehemmt werden, die die A β_{1-42} -Produktion nicht oder nur wenig beeinflussen. Diese Entdeckung spricht nach Citron *et al.* dafür, dass es mindestens zwei γ -Sekretasen gibt (Citron *et al.*, 1996). Eine gezielte Hemmung der Proteasefunktionen der γ -Sekretase-Funktion ist noch nicht möglich.

3. Hemmung der A β -Fibrillenbildung

Der Amyloid-Kaskaden-Hypothese zufolge sind A β -Aggregation und zerebrale Amyloid-Ablagerungen in Form von senilen Plaques die ersten Schritte der pathologischen Prozesse der AD. Die Verhinderung der A β -Fibrillenbildung ist ein attraktives Ziel für die Entwicklung von Therapiestrategien. Problematisch könnte hierbei die Bildung oder Stabilisierung alternativer, toxischer A β -Produkte sein (Walsh *et al.*, 1999).

Ein Ansatzpunkt zur Entwicklung von Substanzen zur Hemmung der A β -Fibrillenbildung basiert auf der Selbsterkennungssequenz von A β . Diese hydrophobe Region von A β mit der Aminosäuresequenz K L V F F = A β_{16-20} (alle Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code) ist nach Tjernberg *et al.* (Tjernberg *et al.*, 1996) entscheidend für die Interaktion der A β -Monomere. Auf der Basis der Selbsterkennungssequenz (Tjernberg *et al.*, 1996) wurden von

verschiedenen Arbeitsgruppen L-Peptide gefunden, die die A β -Fibrillenbildung *in vitro* inhibieren (Soto *et al.*, 1996; Tjernberg *et al.*, 1996). Findeis *et al.* (Findeis *et al.*, 1999) und Poduslo *et al.* (Poduslo *et al.*, 1999) entwickelten unabhängig voneinander aus D-Aminosäuren bestehende Peptide (D-Peptide), durch die die Fibrillenbildung *in vitro* inhibiert wird. Durch den Einsatz von D-Peptiden soll erreicht werden, dass das verwendete Peptid möglichst Protease resistent ist und nur eine geringe oder keine Immunantwort hervorruft. Allerdings wird die Fibrillenbildung bei den meisten bisher entwickelten Peptiden erst bei mikro- oder millimolaren Peptid-Konzentrationen gehemmt (Soto, 1999).

4. Blockierung der neurodegenerativen Effekte und Behandlung psychiatrischer Begleitsymptome

Eine medikamentöse Therapie der neurodegenerativen Effekte beruht meist auf einer spezifischen Beeinflussung der Neurotransmittersysteme, einer Verbesserung der Stoffwechselleistungen und Durchblutung und auf antiinflammatorischen Substanzen zur Bekämpfung der Entzündungsherde (Bauer, 1994). Ein Beispiel dafür ist die Beeinflussung der Acetylcholinesterase-Aktivität. Es ist möglich, dass es in Folge der Alzheimer-Erkrankung zu einer Funktionsstörung im Metabolismus des präsynaptischen Neurons und zu einer synaptischen Degeneration kommt (Frölich *et al.*, 1999). Um auftretende cholinerge Defizite auszugleichen, werden verschiedene Cholinesterase-Inhibitoren zur Therapie eingesetzt (Frölich *et al.*, 1999). Psychiatrische Begleit-Symptome werden je nach Fall durch die Gabe von Antidepressiva behandelt. Nicht-medikamentöse Therapieansätze beinhalten Trainings- und Aktivierungsprogramme bezüglich kognitiver Funktionen wie Gedächtnistraining und soziales Kompetenztraining (Bauer, 1994).

Im Zuge neuerer Arbeiten wird ein weiterer Punkt hinzugefügt:

5. Impfung gegen die AD

Schenk *et al.* beschrieben die komplette Rückbildung von Plaques und Vorbeugung gegen Plaques in transgenen Mäusen durch Injektion von A β_{1-42} (Schenk *et al.*, 1999). Ähnliche Studien zeigten einen Übergang von Anti-A β -Antikörpern über die Blut-Hirn-Schranke und eine Reduzierung der Alzheimer-Pathologie in transgenen Mäusen (Bard *et al.*, 2000). In weiterführenden Studien zur A β -Immunisierung wurde eine Verbesserung der Gedächtnisleistungen und von weiteren Verhaltensmustern bei transgenen Mäusen durch die Impfung mit A β beobachtet (Janus *et al.*, 2000b).

2.2. Evolutive Biotechnologie

2.2.1. Warum „evolutive“ Biotechnologie?

Nach der Selektionstheorie nach Darwin sind Variation und Selektion wichtige Voraussetzungen zur Entwicklung der Lebewesen. Diese Theorie beruht u.a. auf den folgenden Überlegungen: (A) Die Lebewesen erzeugen mehr Nachkommen als zur Erhaltung der Art notwendig wären. (B) Die Nachkommen der Lebewesen weisen Unterschiede auf (genetischen Variabilität). Sie variieren in ihrer genetischen Information. Durch Mutations- und Rekombinationsereignisse bleibt die Variation erhalten. (C) Es bleiben nur diejenigen Individuen am Leben und können sich vermehren, die an die herrschenden Umweltbedingungen angepasst sind. Die evolutive Biotechnologie basiert auf ähnlichen Grundsätzen. Hier werden aus einem Pool mit einer großen Anzahl (siehe A) an Variationen (siehe B) eines Moleküls die selektiert, die die Selektionskriterien erfüllen (siehe C).

2.2.2. *In-vitro*-Selektion

Basis einer so genannten *in-vitro*-Selektion ist die Konstruktion eines kombinatorischen Molekülpools, welcher als Bibliothek bezeichnet wird und aus einer großen Anzahl von Variationen eines Moleküls besteht. Bei diesem Molekül kann es sich um Peptide, Oligonukleotide oder andere organische Moleküle handeln (Kenan *et al.*, 1994). Aus einer solchen Molekül-Bibliothek werden durch die Selektionsprozedur über mehrere Selektionsrunden unter definierten Versuchsbedingungen die Variationen selektiert, die aufgrund ihrer speziellen Zusammensetzung und Struktur Interaktionen mit einem ausgewählten Zielmolekül (Target) eingehen können. Es gibt chemisch-synthetische und biologische Bibliotheken. Ein Forschungsbereich, in dem *in-vitro*-Selektionen eingesetzt werden, ist die Suche nach unbekannten Liganden zu einem Target. Anwendung findet dies bei der Entwicklung von klinischen Diagnostika, neuen Pharmazeutika und Reagenzien für Laboratorien. Dabei kommen sowohl chemisch-synthetische als auch biologische Bibliotheken zum Einsatz.

Ein Bereich, in dem verstärkt *in-vitro*-Selektionen mit biologischen Bibliotheken eingesetzt werden, ist die gerichtete Evolution von Proteinen (Kay und Hoess, 1996). Proteine oder Proteindomänen können z.B. auf der Oberfläche von Phagen präsentiert werden. Durch

Einführung einer gezielten Mutation in das kodierende Gen z.B. durch Kassetten-Mutagenese, „Error-prone“-PCR oder DNA-„Shuffling“ (Stemmer, 1994a; Stemmer, 1994b) wird ein Pool aus verschiedenen Proteinvarianten geschaffen. Während der Selektion werden die Proteinvarianten selektiert, die trotz der eingeführten Mutation noch an das Target binden, was Aufschluss über die an der Bindung beteiligten Aminosäuren geben kann. Bisherige Methoden schlossen Untersuchungen zur Proteinstabilität (Sieber *et al.*, 1998; Spada *et al.*, 1998), zu Protein/Protein- bzw. Protein/Nukleotid-Wechselwirkungen (Hoffmann und Willbold, 1997) und zur enzymatischen Aktivität von Proteinen ein (Forrer *et al.*, 1999; Soumillion *et al.*, 1994) ein.

In den letzten Jahren wurden Phagen (siehe Kapitel 2.2.3.), Hefen (Bai und Elledge, 1997) und Bakterien (Agterberg *et al.*, 1987; Charbit *et al.*, 1987) erfolgreich als Träger von biologischen Bibliotheken verwendet. Als Beispiel wird bei der Konstruktion einer Phagen-Display-Bibliothek die Bibliothek in Form einer randomisierten Nukleotidsequenz als Fusion von oberflächenexponierten Proteinen in das Genom des Phagen eingebracht. Bei der Amplifizierung des Phagen wird zum einen die randomisierte Bibliothek repliziert und zum anderen die jeweils kodierte Peptidvariante gemeinsam mit dem Fusionsprotein exprimiert und auf der Phagenoberfläche präsentiert (siehe Kapitel 2.2.3.). Nach der letzten Selektionsrunde wird die DNA isolierter Phagen gereinigt und sequenziert. Die DNA-Sequenz wird in die Aminosäuresequenz übersetzt und die Sequenzen auf Übereinstimmungen (Konsensussequenzen) hin untersucht. Neben den aufgeführten biologischen Systemen wurden auch Polysomen (Mattheakis *et al.*, 1994), DNA- bzw. RNA-bindende Proteine, LacI-Repressoren (Cull *et al.*, 1992) (Gates *et al.*, 1996) oder Ribosomen (Hanes und Pluckthun, 1997) erfolgreich als Träger von biologischen Bibliotheken verwendet. Wichtig bei allen Systemen ist, dass eine physikalische Kopplung zwischen der randomisierten Nukleotidsequenz als Informationsträger und der jeweiligen Protein-/Peptidvariante als Funktionsträger besteht. Nur durch die Kopplung sind eine Amplifizierung der Peptid-Bibliothek und damit eine Selektion über mehrere Selektionsrunden möglich.

Zur Untersuchung von Bindungs- und Strukturfunktionen von Nukleotiden wird häufig auf SELEX-Verfahren (Systematic evolution of ligands by exponential enrichment) zurückgegriffen. Das Prinzip der *in-vitro*-Selektion von Nukleotide basiert auf der Tatsache, dass das Nukleotidmolekül nicht nur Ziel der Funktionsuntersuchung ist, sondern gleichzeitig

die genetische Information für seine *in-vitro*-Replikation birgt (Informationsträger = Funktionsträger). Diese Verfahren ermöglichen z.B. die Untersuchung von DNA- bzw. RNA-Protein-Wechselwirkungen (Oliphant *et al.*, 1989; Oliphant und Struhl, 1987; Tuerk und Gold, 1990).

2.2.3. Phagen-Display

Die Phagen-Display-Technologie beruht auf der Tatsache, dass einige Bakteriophagen eine Insertion von DNA in Strukturgene tolerieren. Als Vektor für Peptid-Bibliotheken werden verschiedene Bakteriophagen wie λ , T4, T7 verwendet. Die ersten Experimente wurden von Smith *et al.* (Smith, 1985) mit dem M13-Phagen durchgeführt, der heute noch häufig verwendet wird.

Die Hauptbestandteile einer Phagen-Display-Selektion sind eine Peptid-Bibliothek, welche als Fusionsprotein zu einem Hüllprotein des Phagen vorliegt, und eine definierte Zielstruktur oder Substrat (Target). Das Target wird an einer Matrix immobilisiert und mit der Phagen-Peptid-Bibliothek inkubiert. Nicht-Target-bindende Phagen werden durch Waschschrte ausgewaschen und Target-bindende Phagen über die Bindung zum Target immobilisiert. Durch geeignete Elutionsbedingungen werden die zurückgebliebenen Phagen von der Matrix eluiert. Die eluierten Phagen werden durch eine Infektion von Bakterien amplifiziert und in der nächsten Selektionsrunde eingesetzt. Nach der letzten Selektionsrunde werden einzelne Phagen isoliert und die DNA-Sequenzen bestimmt. Bei erfolgreicher Durchführung einer Selektion ergibt sich eine Konsensussequenz (siehe Abbildung 2-4).

Ein Vorteil von Phagen-Display-Verfahren ist, dass relativ große Peptid-Bibliotheken für die Selektion von Target-bindenden Peptiden zum Einsatz kommen. Die geringe Größe und die Stabilität der Bibliothek-tragenden Phagen ermöglichen Phagensuspensionen mit hohem Titer (bis 10^{14} Phagen/ml), die bei 4 °C über mehrere Jahre gelagert werden können (Burritt *et al.*, 1996). Aufgrund der Stabilität der Phagen können die Selektionsbedingungen bezüglich der Immobilisierungsmatrix, der Elutionsbedingungen, der Temperatur, des pH-Wertes und weiterer Versuchsparameter der jeweiligen Fragestellung angepasst werden.

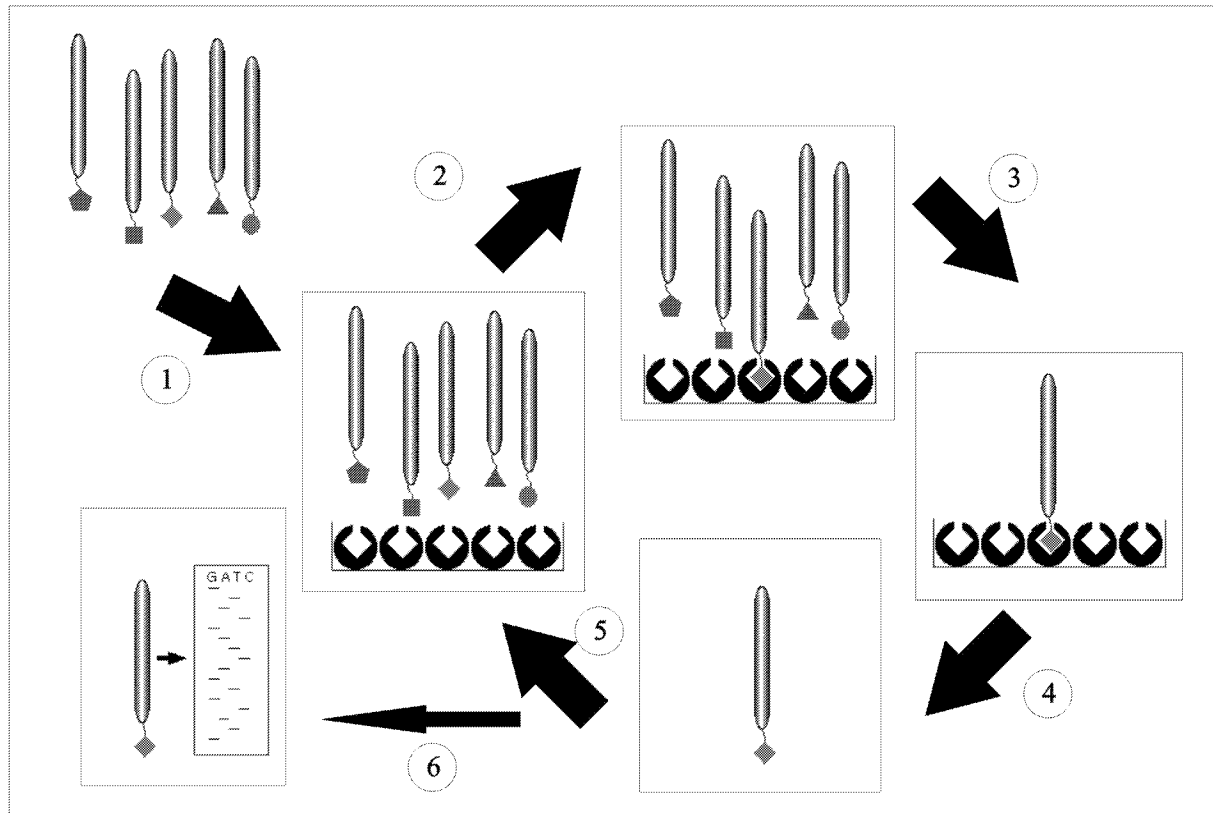


Abbildung 2-4: Schematische Darstellung einer Phagen-Display-Selektion

Eine Bibliothek aus rekombinanten Phagen wird zum immobilisierten Target hinzugefügt (1). Die bindenden Phagen werden über ihre Bindung zum Target ebenfalls immobilisiert (2). Nach einer Inkubationsphase werden die nicht-bindenden Phagen durch mehrere Waschschriffe entfernt (3). Es folgt eine Elution der verbliebenen Phagen durch Senkung des pH-Wertes oder durch Zugabe eines Überschusses eines bekannten Liganden zum Target (4). Die Amplifizierung der eluierten Phagen erfolgt in *E. coli*. Ein Aliquot der Suspension aus amplifizierten Phagen wird in der nächsten Runde der Selektion eingesetzt (5). Nach mindestens zweimaliger Wiederholung der Prozedur werden vereinzelte Phagen amplifiziert. Die DNA der einzelnen Phagen wird isoliert und sequenziert (6) (modifiziert nach (Kay *et al.*, 1998)).

2.2.4. Spiegelbild-Selektion

Spiegelbild-Phagen-Display ist eine Weiterentwicklung des herkömmlichen Phagen-Display und beruht auf der Chiralität von Molekülen. Chirale Moleküle verhalten sich wie Bild und Spiegelbild zueinander und können nicht zur räumlichen Deckung gebracht werden. Die beiden Varianten des Moleküls werden als Enantiomere bezeichnet. Die Enantiomere unterscheiden sich nur in der räumlichen Anordnung ihrer chemischen Gruppen voneinander. Sie haben die gleiche Summenformel und weisen, bis auf die optische Aktivität, die gleichen physikalischen Eigenschaften auf. Die Methodik des Spiegelbild-Phagen-Display wurde 1996 von Schuhmacher *et al.* (Schumacher *et al.*, 1996) entwickelt. Die einzelnen Schritte sind wie bei einem herkömmlichen Phagen Display-System. Der einzige Unterschied ist, dass nicht die

natürlich vorkommende Form des Zielmoleküls eingesetzt wird, sondern das Enantiomer (Spiegelbild) dazu. Bei einer Selektion gegen ein Peptid als Zielmolekül wird nicht die natürliche L-Form verwendet, sondern das D-Enantiomer. Das Ergebnis einer erfolgreichen Selektion ist ein L-Peptid, an das D-Target bindet (siehe Abbildung 2-5). Das Prinzip des Spiegelbild-Phagen-Display beruht auf der Voraussetzung, dass die Bindung zwischen L-Peptid und D-Target das Spiegelbild zur Bindung zwischen dem D-Enantiomer des selektierten L-Peptids (D-Peptid) zum natürlichen L-Target ist.

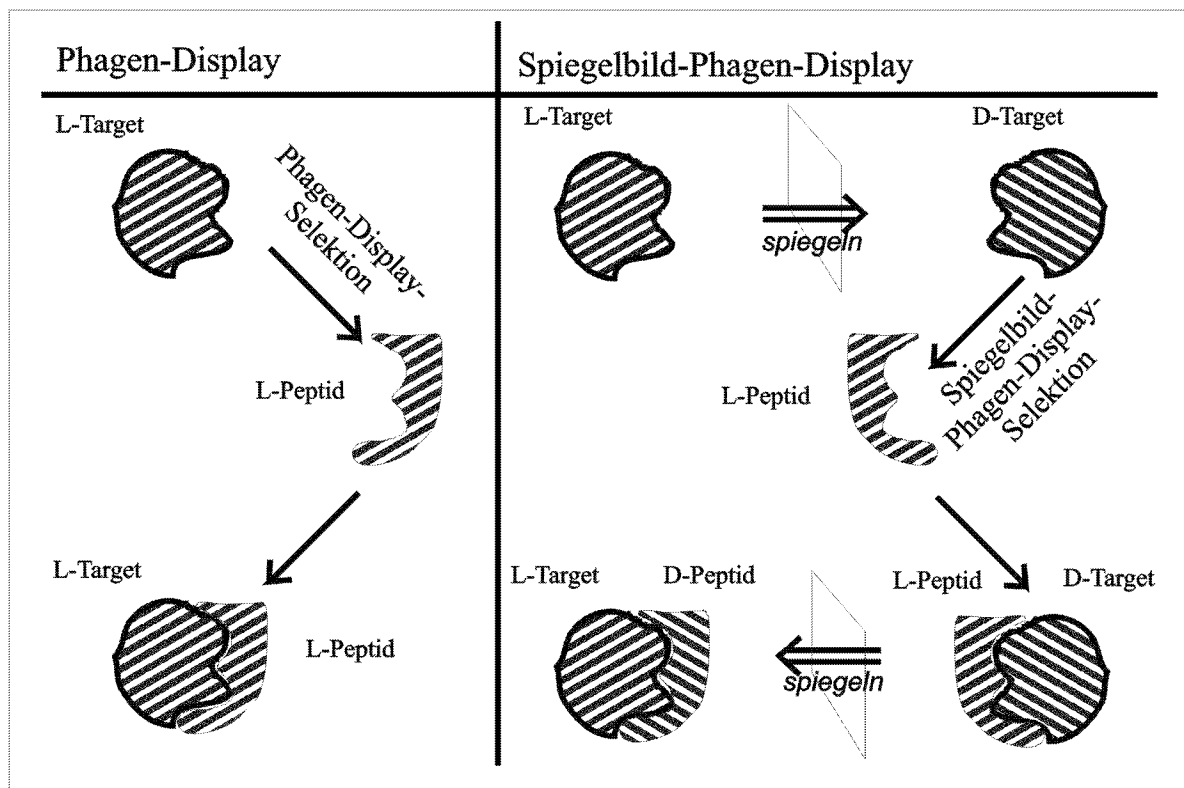


Abbildung 2-5: Schematische Darstellung Phagen-Display und Spiegelbild-Phagen-Display

Bei Spiegelbild-Phagen-Display-Selektionen mit Peptiden wird statt der natürlich vorkommenden L-Form des Peptids (L-Target), das D-Enantiomer (D-Target) eingesetzt. Ergebnis einer erfolgreichen Spiegelbild-Phagen-Display-Selektion ist die Konsensussequenz eines L-Peptids, das an das D-Target bindet. Der Grundgedanke einer Spiegelbild-Phagen-Display-Selektion ist, dass die Bindung zwischen D-Target und L-Peptid das Spiegelbild zur Bindung zwischen L-Target und D-Peptid ist.

Das Verfahren wurde erfolgreich mit verschiedenen Molekülen als Target durchgeführt. Schumacher *et al.* (Schumacher *et al.*, 1996) suchten nach Liganden zur Src homology 3 Domäne (SH3). Sie selektierten ein D-Peptid, für das über NMR-Experimente eine spezifische Bindung zum L-Target nachgewiesen wurde. Eckert *et al.* (Eckert *et al.*, 1999) benutzten die Methode für die Suche nach Substanzen, die die HIV-Infektion inhibieren.

Dafür wählten sie das HIV-1 gp41 Protein als Target aus. Es ist essentiell für die Fusion von viraler und zellulärer Membran. Sie selektierten 10mer D-Peptide mit einer Konsensussequenz, die in 4 Positionen konservierte Reste aufweist. Über Röntgenstruktur-Kristallographie und NMR-Experimente wurde nachgewiesen, dass die konservierten Reste mit dem gp41 interagieren. Weiterhin wurde über Zell/Zell-Fusions-Assays und HIV-Infektions-Assays die Hemmung der Membranfusion mit Hilfe ausgewählter D-Peptide in mikromolaren Konzentrationen nachgewiesen (Eckert *et al.*, 1999). Kozlov *et al.* führten Spiegelbild-Phagen-Display-Selektionen gegen spezifische Zelloberflächen-Kohlenhydrate als Target durch (Kozlov *et al.*, 2001).

Durch die Anwendung von Spiegelbild-Phagen-Display-Verfahren werden die Vorteile des herkömmlichen Phagen-Display-Verfahrens (siehe Kapitel 2.2.3.) mit den Vorteilen eines D-Peptids kombiniert. Nach Schumacher *et al.* sind Vorteile eines D-Peptids, dass es eine reduzierte Proteasesensitivität aufweist und anscheinend weniger immunogen als das jeweilige L-Enantiomer ist (Schumacher *et al.*, 1996).

Neben dem oben aufgeführten Spiegelbild-Phagen-Display-Verfahren wurden andere Spiegelbild-Selektionsverfahren erfolgreich angewandt. Auf der Suche nach L-RNA-Molekülen, die an Peptide mit Arginin-reichen Motiven (ARM) binden, wendeten Nolte *et al.* (Nolte *et al.*, 1996) ein Spiegelbild-Selektions-Verfahren mit D-RNA gegen D-Arginin als Target an. Sie fanden eine 38mer L-RNA, die an die basische Region eines HIV-Tat-Peptids bindet. Klusmann *et al.* führten Spiegelbild-Selektionen gegen L-Adenosin durch und selektierten eine 58mer L-RNA, die an D-Adenosin bindet (Klusmann *et al.*, 1996).

2.3. Bakteriophage M13

2.3.1. Morphologie, Genomstruktur und Lebenszyklus

Der M13-Phage gehört zu den filamentösen Phagen. Der Phage ist ein flexibles Filament von 900 nm Länge und 6 bis 10 nm Durchmesser. Die filamentösen Phagen infizieren ausschließlich gram-negative Bakterien. Die so genannten Ff-Phagen (F-Pilus und filamentös), zu denen der M13 gehört, benutzen die F-Pili von *E. coli* als Rezeptor zur Adsorption an die Wirtszelle. Sie infizieren nur F-oder F-ähnliche Plasmide tragende Bakterien (F^+ , Hfr) und werden als „*male-spezifisch*“ bezeichnet. Das Genom mit 10 Genen ist ca. 6400 Nukleotide lang und besteht aus einem einzelsträngigen, ringförmigen DNA-Molekül.

Neben den fünf Hüllproteinen gibt es fünf weitere Proteine, die bei der Replikation der Virus-DNA in der Wirtszelle (gp2, gp10, gp5) und bei der Penetration (gp4, gp1) des Virus beteiligt sind. Die Proteinhülle besteht aus 2700 Kopien des 5,2-kDa-Proteins gp8. Die Enden der Phagenhülle sind unterschiedlich. An einem Ende sind je 5 Kopien der Proteine gp7 (33 Aminosäuren) und gp9 (32 Aminosäuren). Beide Peptide sind notwendig für die Einleitung der Zusammenlagerung der Phagenproteine bei der Verpackung der Phagen-DNA und zur Gewährleistung der Stabilität der Phagen. Am anderen Ende befinden sich je 5 Kopien der Proteine gp6 (113 Aminosäuren) und gp3 (406 Aminosäuren). Die beiden Proteine werden als Adsorptionsproteine bezeichnet, weil sie an der Adsorption des Phagenpartikels an den F-Pilus der Bakterienwirtszelle beteiligt sind.

Trifft der Phage auf die äußere Membran der Bakterienzelle, erfolgt eine Einschleusung der Phagen-DNA in die Zelle. Die Phagenhülle wird abgestreift und assoziiert teilweise mit der Cytoplasmamembran der Wirtszelle. Nach der Penetration wird die einzelsträngige Phagen-DNA (als (+)-Strang bezeichnet) durch Synthese des komplementären (-)-Stranges zur replikativen Form (RFI), die dann nach dem „rolling circle“-Modell repliziert wird. An dieser Replikation der einzelsträngigen Phagen-DNA sind auch wirtseigene Enzyme beteiligt. Es entsteht ein (+)-Strang, der beim Ausschleusen der DNA aus der Zelle mit gp8-Proteinen umhüllt wird. Die gp8-Proteine werden vorher an bestimmten Assemblierungsorten in die Cytoplasmamembran eingelagert (Klaus *et al.*, 1992).

2.3.2. M13 als Vektor für Phagen-Display

Kombinatorischen Peptide werden als Fusionspeptide zusammen mit Haupt- (major, gp8, etwa 2700 Kopien) oder Neben- (minor, gp3, 5 Kopien) Kapsid-Proteinen vom M13-Phagen exprimiert. Die randomisierte DNA wird in die M13-DNA insertiert und die ligierte DNA in *E.coli*-Zellen transformiert. Im Allgemeinen beträgt die Größe einer solchen Peptid-Bibliothek 10^8 bis 10^{10} verschiedene Rekombinanten (Kay *et al.*, 1998).

Bisher wurde meist gp3 als Träger der Peptid-Bibliothek verwendet (Rodi und Makowski, 1999). Das gp3-Protein des M13-Bakteriophagen besteht aus 3 Domänen, die über Glycin-reiche Linker miteinander verbunden sind (Abbildung 2-6).

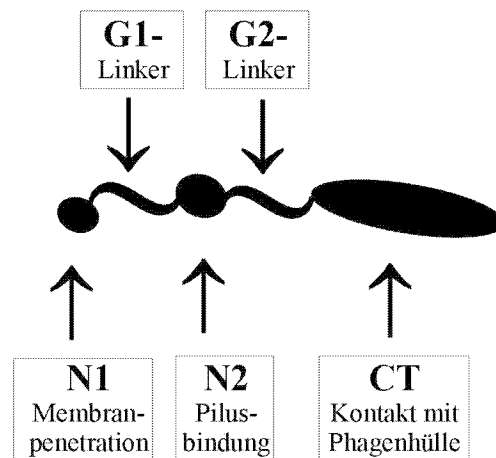


Abbildung 2-6: Schematische Darstellung der Domänen des gp3-Proteins des Bakteriophagen M13

Das derzeitige Modell zur Infektion von *E.coli*-Zellen durch den M13-Bakteriophagen beinhaltet als initialen Schritt die Bindung der N2-Domäne (131 Aminosäuren) an den F-Pilus der Wirtszelle. Nach dieser Bindung kommt es durch bisher unbekannte Mechanismen zur Verkürzung des Pilus wodurch der Phage an die Bakterienhülle gelangt. Nach einer Interaktion zwischen der N1-Domäne (67 Aminosäuren) und dem Wirtsprotein TolA erfolgt der Eintritt der Phagen-DNA in das Wirts-Cytoplasma. Lubkowski *et al.* (Lubkowski *et al.*, 1998) stellten aufgrund von Strukturuntersuchungen mit der N1- und der N2-Domäne die Vermutung auf, dass diese beiden Domänen eine hufeisenförmige Struktur ausbilden, wodurch der N-Terminus der N1-Domäne und der C-Terminus der N2-Domäne nahe beieinander am offenen Ende des Hufeisens liegen. Eine Interaktion mit dem F-Pilus könnte an der Innenseite der Hufeisen-Struktur erfolgen. Bibliotheken, die an den N-Terminus der

N1-Domäne oder den C-Terminus der N2-Domäne inseriert werden, würden nach diesem Modell die Infektion der von Bakterien durch Phagen nicht stören und würden an benachbarten Positionen an der Phagenoberfläche präsentiert werden (Lubkowski *et al.*, 1998)

Eine Klassifizierung der verschiedenen Phagen-Display-Systeme kann basierend auf der Anordnung der insertierten Bibliothek-DNA erfolgen. Zum Typ 3 bzw. Typ 8 gehören solche Vektortypen, bei denen alle Kopien des betreffenden Phagenproteins (gp8 oder gp3) das randomisierte Insert enthalten. Bei der Konstruktion von Vektoren vom Typ 8+8 bzw. 3+3 wird zusätzlich zum wt-Gen für gp8 bzw. gp3 ein rekombinantes Gen für das jeweilige Hüllprotein mit insertierter Bibliothek-DNA in das Phagengenom eingebracht. Vektoren von Typ 8+8 bzw. 3+3 sind dadurch gekennzeichnet, dass das Insert-tragende Gen auf einer Plasmid-DNA lokalisiert ist. Diese Plasmid-DNA wird als Phagmid bezeichnet. Das native Gen wird durch den so genannten Helferphagen beigesteuert. Erst durch Zugabe des Helferphagen ist eine Assemblierung der Phagen möglich. Da in den beiden letztgenannten Fällen sowohl ein wt-Gen als auch ein rekombinantes Gen in einer *E.coli*-Wirtszelle vorkommen, werden sowohl rekombinante als auch wt-Proteine exprimiert und auf der Phagenoberfläche präsentiert. Bei Smith und Petrenko (Smith und Petrenko, 1997) findet sich eine ausführlichere Beschreibung und Anwendungsbeispiele der einzelnen Vektortypen.

3. Material

3.1. Bakterienstämme

Für die Selektionen wurde *E. coli* ER2738 als Wirt für die Bakteriophagen verwendet (siehe Tabelle 3-1). Die Stammhaltung des *E. coli* ER2738 erfolgte entweder auf Agarplatte oder als Glycerinkultur. Hierfür wurden Kulturen in der logarithmischen Wachstumsphase entweder auf Agarplatten ausgestrichen, bei 4 °C gelagert und etwa alle 4 Wochen neu überimpft oder in LB-Medium mit 15% Glycerin (v/v) bei –80 °C aufbewahrt.

Tabelle 3-1: Bakterienstamm, der für die Selektionen eingesetzt wurde

Aufgelistet sind der Name, der Genotyp und die Referenz.

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> ER2738	F', <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ , <i>lacI</i> ^q , $\Delta(lacZ)$ M15zzf::Tn10(Tet ^R), <i>fhuA2</i> , <i>glnV</i> , $\Delta(lac-proAB)$, <i>thi-1</i> , $\Delta(hsdS-mcrB)$ 5	New England Biolabs, Frankfurt

3.2. Phagen-Display-Peptid-Bibliothek

Die verwendete Ph.D.-12mer Phagen-Display-Peptidbibliothek (Ph.D.-12TM Phage Display Peptide Library Kit, New England Biolabs, Frankfurt) basiert auf einer kombinatorischen Bibliothek aus 12 randomisierten Aminosäuren, die an das gp3-Gen N-terminal direkt nach der Signalsequenz des M13-Phagen insertiert ist. (siehe Abbildung 3-1). Die Bibliothek besteht aus $1,9 \times 10^9$ unabhängigen Klonen und ist so amplifiziert und konzentriert, dass in einem Volumen von 10 µl durchschnittlich 55 Kopien einer jeden Sequenz enthalten sind. Die Bibliothek besteht aus einem reduzierten Aminosäurecode (NNK, mit N: beliebige Base, K: G oder T). Im Bakterienstamm zur Konstruktion der Bibliothek erfolgt eine Suppression des Amber-Stop-Kodon TAG durch Q. Die genaue Zusammensetzung der Bibliothek ist im Handbuch der Bibliothek angegeben (New England Biolabs, Frankfurt/Main).

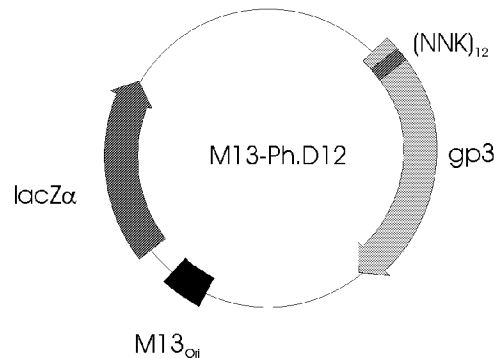


Abbildung 3-1: Genom des M13-Phagen mit insertierter Bibliothek

Eine (NNK)₁₂-Bibliothek (N: beliebige Base, K: G oder T) ist über die Schnittstellen *KpnI* und *EagI* direkt hinter die Signalsequenz von *gp3* am N-Terminus kloniert. Zwischen Bibliothek und *gp3*-Wildtyp-Sequenz befindet sich ein Linker aus 4 Aminosäuren (Gly-Gly-Gly-Ser).

3.3. Oligonukleotide

Als Nukleotidsequenz (siehe Tabelle 3-2) des Primers für die Sequenzierungen wurde eine Region auf den Anticodon-Strang innerhalb der *gp3*-Sequenz gewählt.

Tabelle 3-2: Oligonukleotid, das für die Sequenzierung der Peptidbibliothek (siehe Kapitel 3.2.) eingesetzt wurde

Aufgelistet sind der Name, die Sequenz und die Länge des Nukleotids.

Name	Sequenz	Länge
M13-Seq(-)	5'-cta ccg taa cac tga gtt tcg-3'	21mer

3.4. Eukaryotische Zellen

Die PC12-Zellen wurden von der DSMZ (Braunschweig) geliefert. Die Zelllinie PC12 wurde von Green *et al.* aus dem Nebennierenmarkttumor (Pheochromocytom) einer Ratte isoliert (Greene und Tischler, 1976).

3.5. Peptide

Alle verwendeten Peptide (siehe Tabelle 3-3) wurden von der Firma Jerini Biotools (Berlin) chemisch synthetisiert. Die Aufreinigung der Peptide erfolgte über Reversed-Phase-High Performance Liquid chromatographie (HPLC). Die Überprüfung der Peptide erfolgte über Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie mit einem

Flugzeitmassenspektrometer (MALDI-TOF-MS). Die Aminosäuresequenz und die Chiralität der A β -Peptide (L- und D-Enantiomer) wurden zusätzlich über Kernmagnetische Resonanz Spektroskopie (NMR) und Circular dichroismus-Spektroskopie (CD) überprüft und bestätigt.

Tabelle 3-3: Verwendete Peptide

Aufgelistet sind jeweils der Name, die Aminosäuresequenz und die Modifikation des Peptids.

Name	Aminosäuresequenz	Modifikation
Bio-L-A β ₁₋₄₂	Biotinyl- β A- β A-DAEFRHDSGYEVHHQKL VFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA-Amid, alle Aminosäuren als L-Enantiomer	Biotinyl-Gruppe am N-Terminus
Bio-D-A β ₁₋₄₂	Biotinyl- β A- β A-DAEFRHDSGYEVHHQKL VFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA-Amid, alle Aminosäuren als D-Enantiomer	Biotinyl-Gruppe am N-Terminus
L-A β ₁₋₄₂	DAEFRHDSGYEVHHQKL VFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA, alle Aminosäuren als L-Enantiomer	
D-A β ₁₋₄₂	DAEFRHDSGYEVHHQKL VFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA, alle Aminosäuren als D-Enantiomer	
Fluo-D-Pep1	QSHYRHISPAQV-K-Fluorescein-NH ₂ , alle Aminosäuren als D-Enantiomer	Fluorescein am C-Terminus
D-Pep1	QSHYRHISPAQV alle Aminosäuren als D-Enantiomer	
Kontroll-Peptid	IRTPRRKIIRSR alle Aminosäuren als L-Enantiomer	Fluorescein am C-Terminus

3.6. Gewebeschnitte

Die Gewebeschnitte (siehe Tabelle 3-4) wurden von Prof. Patt (Universität Jena) und Prof. Linke (MPI, München) bezogen. Es handelt sich jeweils um formalin-fixierte (4% gepuffertes Formaldehyd) und paraffin-eingebettete Gewebeschnitte mit einer Dicke von 4 bis 6 μ m. Bei den Gewebeschnitten Jena 1 handelt es sich um Gewebeproben einer Alzheimer-Patientin mit folgenden Daten: weiblich, geboren am 1.4.1922, gestorben am 2.6.1997, akuter

Myokardinfarkt, bekannt arterielle Hypertonie, im Gehirn neben Alzheimer-typischen Veränderungen auch eine kongophile Angiopathie (CAA). Die Gehirn-Gewebeproben von Kontrollfall Jena 2 stammen von einem Patienten mit folgenden Daten: männlich, geboren 1.5.1968, gestorben 21.9.1998, Grundkrankheit: Hirnbasisarterienaneurysma, Operation, in der Folge Pneumokokkenpneumonie und septischer Schock, im Gehirn Zeichen der neuronalen Hypoxie (Angaben nach persönlicher Mitteilung von Prof. Patt, Universität Jena). Eine detailliertere Charakterisierung der Gewebeproben 3 bis 5 ist bei Linke (Linke, 2000) aufgeführt.

Tabelle 3-4: Verwendete Gewebeschnitte

Aufgelistet sind jeweils der Name, das klinische Syndrom, das Organ, aus dem die Probe stammt und die Referenz.

	Klinisches Syndrom	Organ	Referenz
1	Alzheimersche Demenz und CAA	Gehirn	Prof. Patt, Jena
2	Hirnbasisarterienaneurysma	Gehirn	Prof. Patt, Jena
3	AA-Amyloidose, Muckle-Wells Syndrome	Niere	Prof. Linke, München
4	AL κ -Amyloidose, IgG, K multiple Myeloma	Zunge	Prof. Linke, München
5	AL λ -Amyloidose, Kardiomyopathie	Pankreas	Prof. Linke, München

3.7. Nährmedien, Puffer, Lösungen

Falls nicht anders vermerkt, wurde zum Lösen der Substanzen H₂O verwendet. Die Nährmedien wurden nach Sambrook (Sambrook *et al.*, 1989) hergestellt. Für Flüssigmedien und Puffer wurden die nachfolgenden Zusammensetzungen verwendet. Die Sterilisation erfolgte durch Autoklavieren (20 min, 1,2 bar, 121 °C, Autoklav Typ Matachana HST 250, Zirbus, Osterode).

3.7.1. Nährmedien

LB-Medium (Luria Bertani): 10 g Trypton, 5 g Hefe, 10 g NaCl mit H₂O ad 1000 ml

DMEM-Medium: „Dulbecco modified Eagle medium“ (Biochrom, Berlin) mit Acetyl-Alanin-Glutamin mit folgenden Zusätzen: 10 % fetales Kälberserum (Biochrom, Berlin), 5% Pferdeserum (Biochrom,

Berlin) und 10 mg/ml Gentamycin (Biochrom, Berlin). Alle Produkte wurden im sterilen Zustand geliefert und kurz vor Gebrauch zusammengefügt.

TOP-Agar: 10 g Trypton, 5 g Hefe, 10 g NaCl, 1g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, 7 g Agarose mit H_2O ad 1000 ml

LB/IPTG/Tet-Agar-Platten: LB-Medium mit 15g/l Agar, gelagert bei 4 °C im Dunkeln

3.7.2. Puffer

TBS: 25 mM Tris/HCl, 0,9 % NaCl, pH 7,5

TBE (10 fach): 108 g Tris-base, 45 g Borsäure, 40 ml 0,5 M EDTA, pH 8, ad 1000 ml

TBST: TBS mit 0,1% (v/v) Tween-20

Tris-HCl: 10 mM Tris/HCl, pH 10

PBS: 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1,8 mM KH_2PO_4 , pH 7,4

PBS/1mM SDS: PBS mit 1 mM SDS, pH 7,4

Lysispuffer: 99,4 ml DMSO, 0,6 ml Essigsäure (100%), 10 g SDS

Ladepuffer Sequenzierung: 20 mM EDTA, pH 8,0, 6mg/ml BlueDextran in Formamid

3.7.3. Lösungen

Tetracyclin: 20 µg/ml in 50 % Ethanol, steril filtriert (Filter 0,22 µm), gelagert im Dunkeln bei -20°C.

MTT: 5 mg/ml MTT in PBS gelöst, steril filtriert (Filter 0,22 µm)

PEG/NaCl: 20% (w/v) Polyethylenglycol 6000, 2,5 M NaCl

BSA-Lösung: 10 mg/ml BSA in PBS

Biotin-Lösung: Stammlösung von 1 mM in H_2O , vor Gebrauch verdünnen auf 0,1 mM in TBS

Ammoniumacetat/Ethanol: 2 M Ammoniumacetat in 99 % Ethanol

8 M Harnstoff: 8 M Harnstoff in 10 mM Glycin-NaOH, pH 10

2% Uranyl-Acetat-Lösung: 2% Uranyl-Acetat

6 M Guanidiniumhydro-

chlorid: 6 M Guanidiniumhydrochlorid, 25 mM Kaliumphosphat, pH 6,5

<u>Glycin-HCl:</u>	0,2 M Glycin-HCl, pH 2,2
<u>Glycin-NaOH:</u>	10 mM Glycin-NaOH, pH 10
<u>Gel-Mix:</u>	420 g Harnstoff, 102,2 ml Accu-Gel (29:1, Biozym, Hessisch Oldendorf), 439,8 ml H ₂ O, 120 ml 10x TBE-Puffer
<u>APS:</u>	10 % w/v Ammoniumperoxodisulfat

3.8. Biochemikalien und Chemikalien

Applied Biosystems (Langen) Dye Terminator Cycle Sequencing Kit

Biochrom (Berlin):	DMEM, Trypsin/EDTA-Lösung, Gentamycin, fetales Kälberserum, Pferdeserum, Collagen A
Dako (Hamburg):	Fluoreszenz-Mounting-Medium
Gerbü (Gaiberg):	Tween20
Fluka (Neu-Ulm):	Hexafluoroisopropanol (HFIP), Reinheitsgrad $\geq 99,9\%$
Roth (Karlsruhe):	Rotihistol, Ethanol rein und vergällt, Tetramethylethyldiamine (TEMED)
Sigma (Deisenhofen):	„Accustain [®] “, Amyloid stain, Congo Red“, 80% Ethanol mit NaCl gesättigt, 1% Natrium-Hydroxid-Lösung (0,25 mol/l), 0,2 % Congo-Rot-Lösung in 80% Ethanol, MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid) 0,4% Trypanblau, Tetracyclin

Alle anderen hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden in p.a. oder vergleichbarer Qualität von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), und Sigma (München) geliefert.

3.9. Antikörper und Enzyme

Sigma (Deisenhofen)	Sheep Anti-mouse IgG (whole molecule)
Chemicon (Hofheim)	Mouse Anti-Amyloid-Beta 1-16 (monoclonal antibody), Anti-A β ₁₋₁₆

3.10. Sonstige Materialien

Roth (Karlsruhe):	Rotilab-Mikrotiter-Platten,
Sartorius (Göttingen):	Minisart Sterilfilter (0,20 µm),
Roche (Mannheim):	Streptavidin-beschichtete Reaktionsgefäße
Becton Dickinson Labware:	Collagen IV-Beschichtete 96-Well-Mikrotiterplatten
Unbekannt:	Neubauer-Zählkammer, Tiefe 0,1mm, Fläche 0,0025 mm ²
Plano (Wetzlar)	Cu-Grids, beschichtet mit Formvar und Kohle

3.11. Software

Die jeweils für die Auswertung verwendete Software ist bei den einzelnen Methoden aufgeführt. Sonstige Auswertungen wurden mit Sigma-Plot 2000 (SPSS Science Software GmbH, Erkrath) und Corel Draw, Version 9 (Corel, Unterschleissheim) durchgeführt.

4. Methoden

4.1. Fern-UV-Circulardichroismus-Spektroskopie

Die Circulardichroismus-(CD)-Spektren wurden mit einem Jasco J-600 Spektrometer aufgenommen. Die Quarzküvetten (Hellma, Müllheim) hatten eine Schichtdicke von 1 cm. Die Spektren wurden im Wellenbereich von 250 bis 190 nm aufgezeichnet. Die Aufnahmegeschwindigkeit betrug 20 nm/min, die Auflösung 0,2 nm, die Empfindlichkeit des Geräts 50 mdeg und die Bandbreite 1 nm. Für jedes Spektrum wurden 4 Wiederholungen akkumuliert. Alle Proteinspektren wurden um das dazugehörige Lösungsmittelspektrum korrigiert und die mittlere molare Elliptizität je Aminosäure $[\Theta]_{MRW}$ wurde gemäß Gleichung 4-1 berechnet (Schmid, 1989).

$$[\Theta]_{MRW} = \frac{\Theta * 100}{c * d * N} \quad \text{(Gleichung 4-1)}$$

$[\Theta]_{MRW}$: mittlere molare Elliptizität je Aminosäure in $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 / \text{dmol}$

Θ : gemessene Elliptizität in Grad

c : Konzentration des Proteins in mol/l

d : Schichtdicke der Küvette in cm

N : Anzahl der Aminosäuren im Protein

Die Proben für die CD-spektroskopischen Untersuchungen enthielten 41,2 μM bzw. 54,2 μM biotinyliertes L- bzw. D- $\text{A}\beta_{1-42}$ (Bio-L- $\text{A}\beta_{1-42}$ bzw. Bio-D- $\text{A}\beta_{1-42}$) in Hexafluoroisopropanol (HFIP) gelöst. Das Probenvolumen betrug 2,7 ml. Durchgeführt wurden die Messungen von Dr. Enrico Bucci und Dr. Bettina Schmitt.

4.2. NMR-Spektroskopie

4.2.1. Probenvorbereitung

Für die Aufnahme von 2D-NMR-Spektren wurde Bio-L-A β ₁₋₄₂ bzw. Bio-D-A β ₁₋₄₂ in einer Konzentration von 2,2 mM eingesetzt. Das Probenvolumen war 0,5 ml. Für alle Messungen wurde reines, deuteriertes DMSO (DMSO- d₆, Reinheit > 99,8 %) verwendet.

4.2.2. Allgemeine Meßbedingungen

Alle Experimente wurden mit einem Varian Inova 750 MHz-NMR-Spektrometer bei RT durchgeführt. Die Aufnahme der Spektren erfolgte im phasensensitiven Modus mit Quadraturdetektion in allen Zeitdimensionen. Die 2D-Experimente wurden bei 298 K durchgeführt. Folgende Experimente wurden aufgenommen:

- 2 D DQF-COSY
- 2 D TOCSY (80 ms Mischzeit)
- 2 D NOESY (200 ms Mischzeit)

Alle NMR-Spektren wurden mit der VNMR-Software (Varian, Inc.; Version 6.1. B) nach Standardprotokollen prozessiert und mit der XEASY-Software (Bartels *et al.*, 1995) ausgewertet.

Die NMR-Messungen wurden von Dr. Bettina Schmitt durchgeführt.

4.3. UV/VIS-Spektroskopie

4.3.1. Absorptionsmessung

Absorptionsmessungen im UV-VIS-Bereich wurden mit einem UVmini 1240 (Shimadzu, Duisburg) bestimmt. Für Messungen im sichtbaren Bereich wurden Polystyrol-Halbmikroküvetten der Schichtdicke 1 cm (Brand, Wertheim) verwendet. Der gewählte Messbereich lag zwischen 0,1 und 0,8 Absorptionseinheiten. Lösungen mit höheren Werten wurden entsprechend mit dem jeweiligen Referenz-Medium bzw. Puffer verdünnt. Im UV-Bereich wurden die Messungen in Schwarzwand-Quarzküvetten (Hellma, Müllheim) mit einer Schichtdicke von 1 cm durchgeführt.

4.3.2. Bestimmung der Bakteriendichte

Trübungsmessungen von Bakterienkulturen erfolgten bei 600 nm, wobei 1 Absorptionseinheit (OD_{600}) einer Bakteriendichte von etwa 1×10^9 Zellen/ml entspricht. Auch hier lag der gewählte Messbereich zwischen 0,1 und 0,8 Absorptionseinheiten. Lösungen mit höheren Werten wurden entsprechend mit dem Referenz-Medium verdünnt.

4.3.3. Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationen wurden anhand des Lambert-Beer'schen Gesetzes (Gleichung 4-2) ermittelt:

$$c = \frac{A}{\epsilon \cdot d} \quad \text{(Gleichung 4-2)}$$

c	=	Konzentration
A	=	gemessener Absorptionswert
ϵ	=	molarer Extinktionskoeffizient ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
d	=	Breite der Küvette

Die notwendigen Absorptionsmessungen des Fluorescein-markierten D-Peptids (Fluo-D-Pep1) in PBS wurde durch Messung der Absorption bei 492 nm (Anregungsmaximum des Fluorescein, Extinktionskoeffizient Fluorescein $66000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), für alle anderen Proteine bei 280 nm durchgeführt.

Für die Bestimmung der Proteinkonzentrationen von $A\beta_{1-42}$ in HFIP wurde der molare Extinktionskoeffizient bei 280 nm in HFIP ($\epsilon_{280\text{HFIP}}$) bestimmt. Der molare Extinktionskoeffizient in HFIP wurde mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten des entfalteten Proteins in bei 280 nm ($\epsilon_{280\text{GdmHCl}}$) und dem Verhältnis der Absorption des Proteins in HFIP und des entfalteten Protein bei 280 nm ($A_{280\text{HFIP}}$ bzw. $A_{280\text{GdmHCl}}$) bestimmt. Für die Absorptionsmessungen wurde das $A\beta_{1-42}$ aus der gleichen Stammlösung in gleichen Volumenverhältnissen in das jeweilige Lösungsmittel verdünnt. Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel (siehe Gleichung 4-3, modifiziert nach (Gill und von Hippel, 1989)):

$$\epsilon_{280\text{HFIP}} = \frac{A_{280\text{HFIP}} \cdot \epsilon_{280\text{GdmHCl}}}{A_{280\text{GdmHCl}}} \quad \text{(Gleichung 4-3)}$$

$\epsilon_{280\text{GdmHCl}}$ ergibt sich durch Addition tabellierter Werte (Gill und von Hippel, 1989) für jeden Tryptophanrest ($5690 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), Tyrosinrest ($1280 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) und vorhandenen Cysteinrest ($120 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) in der Aminosäuresequenz des Proteins.

4.4. Elektronenmikroskopie

Zur Vorbereitung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen in Kapitel 5.1.3. wurde Bio- $\text{A}\beta_{1-42}$ in einer Konzentration von $350 \mu\text{M}$ in H_2O gelöst und für 5 Tage bei 37°C unter Schütteln bei 200 rpm inkubiert.

Zur Vorbereitung der Aufnahmen für Kapitel 5.4. wurden jeweils 2-mM-Lösungen des biotinyliertem L- $\text{A}\beta_{1-42}$ in HFIP hergestellt und mit DMSO auf eine Konzentration von $250 \mu\text{M}$ weiter verdünnt.

Für die Negativkontrastierung der Proben wurden die Peptid-Fibrillen auf 400-Maschen-Formvar-Grids absorbiert, welche vorher mit einem Kohlenstofffilm beschichtet worden waren. Die Proben wurden für 30 sec mit 2 % Uranyl-Acetat angefärbt. Nach der Trocknung wurden die Proben mit dem Transmissionselektronenmikroskop EM 902 A (Zeiss, Jena) betrachtet. Die Beschleunigungsspannung betrug 80 kV.

4.5. Selektionen

Innerhalb dieser Promotionsarbeit wurden drei Selektionen unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt, wobei die Unterschiede jeweils in der Art der Präparation des biotinylierten $\text{A}\beta_{1-42}$ (Konzentration $\text{A}\beta_{1-42}$, Lösungsbedingungen) und dem Zeitpunkt der Zugabe der Phagen-Bibliothek lagen.

4.5.1. Selektion 1

Zunächst wurden jeweils 2-mM-Lösungen des Bio-D- $\text{A}\beta_{1-42}$ in HFIP hergestellt und mit DMSO auf eine Konzentration von $250 \mu\text{M}$ weiter verdünnt. Zur Herstellung einer Suspension aus Phagen und biotinyliertem D- $\text{A}\beta_{1-42}$ wurden ca. 1×10^{11} Phagen (entspricht $10 \mu\text{l}$ einer 1×10^{13} Phagen/ml-Suspension, New England Biolabs, Frankfurt) in $800 \mu\text{l}$ TBST mit 0,1 % BSA pipettiert und $0,8 \mu\text{l}$ der $250 \mu\text{M}$ $\text{A}\beta_{1-42}$ -Lösung (Endkonzentration $\text{A}\beta_{1-42} =$

250 nM) hinzugefügt. Diese Suspension aus Peptid und Phagen wurde 10 min inkubiert und in ein Streptavidin-beschichtetes Reaktionsgefäß überführt. Nach einer 15 minütigen Inkubation wurde die Flüssigkeit aus dem Reaktionsgefäß entfernt. Es folgte eine Zugabe von 0,1 mM Biotin in TBST und eine Inkubation für 5 min. Abschließend wurden die Reaktionsgefäße 10 x mit TBST gewaschen. Alle Inkubationen erfolgten unter Schütteln (600 rpm) bei Raumtemperatur (RT).

Die Elution erfolgte pH-abhängig. Das Reaktionsgefäß wurde mit 800 µl einer 0,2 M Glycin-HCl-Lösung (pH 2,2) befüllt und 10 min unter Schütteln bei RT inkubiert. Nach Ablauf der 10 min erfolgte eine Zugabe von 200 µl 1 M Tris-HCl (pH 9,1) zur Neutralisierung der Lösung. Bis zur Amplifizierung der Phagen für die nächste Selektionsrunde (siehe Kapitel 4.5.5.) bzw. bis zur Titerbestimmung (siehe Kapitel 4.5.7.) wurden die eluierten Phagen auf Eis gelagert.

4.5.2. Selektion 2

Zunächst wurden jeweils 2-mM-Lösungen des Bio-D-A β_{1-42} in HFIP hergestellt und mit HFIP auf eine Konzentration von 250 µM weiter verdünnt. 800 µl TBST wurden in ein Streptavidin-beschichtetes Reaktionsgefäß pipettiert und 0,8 µl der A β -Lösung hinzugefügt. Nach 15-minütiger Inkubation wurde die Flüssigkeit aus dem Reaktionsgefäß entfernt. Zur Blockierung nicht besetzter Streptavidin-Bindungsstellen wurde 15 min mit einer TBST/0,1% BSA-Lösung inkubiert. Erst dann folgte eine Zugabe von 1×10^{11} Phagen (entspricht 10 µl einer 1×10^{13} Phagen/ml-Suspension, New England Biolabs, Frankfurt/Main) in 800 µl TBST. Nach einer 10-minütigen Inkubation wurde die Flüssigkeit aus dem Reaktionsgefäß entfernt. Es folgte eine Zugabe von 0,1 mM Biotin in TBST und eine Inkubation für 5 min bei RT. Abschließend wurden die Reaktionsgefäße 10 x mit TBST gewaschen. Alle Inkubationen erfolgten unter Schütteln (600 rpm) bei Raumtemperatur. Die Elution erfolgte pH-abhängig wie unter 4.5.1. beschrieben.

4.5.3. Selektion 3

Zu Beginn der Selektion erfolgte eine Präparation der mit Streptavidin-beschichteten Reaktionsgefäße. Eine 20-µM-Bio-D-A β_{1-42} -Lösung in HFIP wurde 1: 10000 in TBS verdünnt. Je 1 ml dieser Flüssigkeit wurden in eines der Reaktionsgefäße pipettiert. Nach

einer 15-minütigen Inkubation (unter Schütteln, 600 rpm, bei Raumtemperatur) wurden die Reaktionsgefäße zweimal mit TBS gewaschen. Es folgte eine Zugabe von 1 ml TBS und eine Lagerung der präparierten Reaktionsgefäße bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C.

Für die eigentliche Selektionsprozedur wurden 1×10^{11} Phagen (entspricht 10 µl einer 1×10^{13} Phagen/ml-Suspension, New England Biolabs, Frankfurt/Main) in 800 µl TBST mit 0,1 % BSA in eines der vorbereiteten Reaktionsgefäße pipettiert. Nach einer 10-minütigen Inkubation (unter Schütteln, 600 rpm, bei Raumtemperatur) wurden die Reaktionsgefäße 10 x mit TBST gewaschen. Die Elution erfolgte pH-abhängig wie unter 4.5.1. beschrieben.

4.5.4. Kontrollen

Begleitend zu jeder Selektion wurden folgende Kontrollen unter gleichen Versuchsbedingungen durchgeführt:

- 1.) Statt Bio-D-A β_{1-42} wurde Bio-L-A β_{1-42} eingesetzt.
- 2.) Gleiche Volumina der Lösungsmittel HFIP und/oder DMSO, ohne Bio-D-A β_{1-42}

Weiterhin wurde eine Testselektion gegen Streptavidin als Zielmolekül durchgeführt. Dafür wurden die Streptavidin-beschichteten Reaktionsgefäße wie bei 2.) vorbereitet. Die Elution erfolgte nicht pH-abhängig, sondern durch 30-minütige Inkubation mit 0,1 mM Biotin in TBS bei Raumtemperatur unter Schütteln.

4.5.5. Amplifizierung der Phagen

Im Abschluss jeder Selektionsrunde wurden die jeweils eluierten Phagen wie folgt amplifiziert:

Von einer Agarplatte wurde eine Kolonie von *E.coli* ER 2738 in 20 ml LB-Medium mit Tetracyclin übertragen und das Medium über Tag bei 37 °C, unter Schütteln bei 200 rpm inkubiert. Aus dieser *E.coli* ER 2738-Übertagkultur wurde eine Bakteriensuspension in 20 ml LB-Medium/Tetracyclin mit einer OD₆₀₀ von 0,1 hergestellt. Zu dieser Bakteriensuspension wurde die Suspension aus eluierten Phagen gegeben und 4,5 Stunden bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die 20-ml- Bakterien/Phagen-Suspension zweimal bei 5000 rpm, 20 min, 4°C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde verworfen und die Phagen durch Zugabe von PEG/NaCl (siehe Kapitel 4.5.6.) gefällt.

Zur Gewinnung von ssM13-DNA wurden ebenfalls Phagen amplifiziert. Dafür wurde aus einer *E.coli* ER 2738-Übertagkultur eine Bakteriensuspension in LB-Medium/Tetracyclin mit einer OD₆₀₀ von 0,1 hergestellt. Diese Bakteriensuspension wurde in Aliquots von 1 ml in eine 96-Deep-Well-Platte vorgelegt. Mit einem sterilen Zahnstocher wurden Phagen aus vereinzelter Plaque in die Aliquots übertragen. Dafür wurden die Plaques von den Agarplatten zur Bestimmung des Phagentiters (siehe Kapitel 4.5.7.) verwendet. Nach einer Inkubation von 4,5 h bei 37 °C, geschüttelt bei 200 rpm, wurde die Bakterien abzentrifugiert (4000 rpm, 4 °C, 30 min) und der Phagenüberstand zur Isolierung der ssM13-DNA verwendet (siehe Kapitel 4.6.).

4.5.6. PEG-Fällung von Phagen

Die Aufkonzentrierung von 20 ml Phagenüberstand (siehe Kapitel 4.5.5.) erfolgte durch Zugabe 7 ml PEG/NaCl-Lösung zu den jeweiligen Überständen mit nachfolgender Lagerung für mind. 1 h auf Eis. Die Phagen wurden durch 60-minütiges Zentrifugieren bei 4 °C mit 5000 rpm präzipitiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde einmal in 1 ml TBS (pH 7,5) gelöst und 5 min bei 10000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß übertragen und 200 µl PEG/NaCl-Lösung hinzugefügt. Nach einer Lagerung auf Eis für mindestens 1 h wurde erneut 20 min bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugiert. Das Phagenpräzipitat wurde anschließend in 100 µl TBS (pH 7,5) resuspendiert und bei 4 °C gelagert.

4.5.7. Bestimmung des Phagentiters

Zur Bestimmung der Phagenpartikelanzahl vor und nach jeder Selektionsrunde wurden die *plaque-forming-units* (*pfu's*) bestimmt. Hierfür wurde in Mikrotiterplatten 90 µl LB-Medium vorgelegt und jeweils 10 µl der Suspension aus eluierten Phagen (Output-Titer nach der Selektionsrunde) bzw. PEG-präzipitierter Phagen (Input-Titer, vor der Selektionsrunde) übertragen und eine Verdünnungsreihe in LB-Medium bis 10⁻¹³ angelegt. Anschließend wurden 100 µl *E. coli* ER 2738 Zellen (OD₆₀₀ von 0,6) zu den Verdünnungen pipettiert und 10 min bei 37 °C inkubiert.

2 ml TOP-Agar wurden aliquotiert und bei 43 °C im flüssigen Zustand gehalten. Die 200 µl Phagen-/Bakterien-Suspension wurden zu den 2 ml TOP-Agar pipettiert und sofort auf LB/IPTG/Tet-Agarplatten aufgebracht. Nachdem der TOP-Agar sich verfestigt hatte, wurden

die Agarplatten über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die resultierenden blauen Plaques im Bakterienrasen wurden ausgezählt und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors der jeweilige Phagentiter bestimmt. Die Agarplatten wurden bei 4 °C gelagert und dienten später zur Anzucht von Phagen zur Gewinnung von DNA für die Sequenzierung (siehe Kapitel 4.7.).

4.5.8. Statische Auswertung der Selektionsergebnisse

Um einen Überblick über die Präferenzen für einzelne Aminosäuren während der durchgeführten Selektionen zu erhalten, wurden Anreicherungsfaktoren für die einzelnen Aminosäuren nach folgender Formel (siehe Gleichung 4-4) errechnet:

$$\text{Anreicherungsfaktor} = \frac{\text{prozentuale Häufigkeit der Aminosäure nach Selektion}}{\text{prozentuale Häufigkeit der Aminosäure vor Selektion}}$$

(Gleichung 4-4)

Die jeweilige prozentuale Häufigkeit der Aminosäuren vor Selektion wurde vom Hersteller der verwendeten Ph.D.-12-Bibliothek (New England Biolabs, Frankfurt/Main) angegeben (siehe Tabelle 4-1).

Tabelle 4-1: Überblick über die prozentuale Häufigkeit der Aminosäuren vor Selektion in der verwendeten Ph.D.-12--Bibliothek

Aufgelistet sind die Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code (aa) und deren Häufigkeit (%) in der Ph.D.-12 Bibliothek. Angaben laut Hersteller (New England Biolabs, Frankfurt/Main)

aa	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
%	6	0,5	2,8	3,1	3,3	2,6	6,3	3,4	2,8	9,3	2,6	4,6	12,2	3,1	4,7	10	11,1	3,9	2,2	3,6

Nach der letzten Selektionsrunde wurden einzelne Phagen-Klone amplifiziert, deren DNA isoliert und sequenziert. Die erhaltenen DNA-Sequenzen wurden in die entsprechende Aminosäuresequenz übersetzt. Diese Aminosäuresequenzen wurden für die Ermittlung der prozentualen Häufigkeit der einzelnen Aminosäuren nach Selektion verwendet. Die Berechnung der Häufigkeiten erfolgte mit folgender Formel (siehe Gleichung 4-5):

$$\text{prozentuale Häufigkeit nach Selektion} = \frac{\text{ausgezählte Anzahl der einzelnen Aminosäuren}}{\text{Gesamtzahl aller detektierten Aminosäuren}}$$

(Gleichung 4-5)

Die ausgezählte Anzahl der Aminosäure gibt an, wie oft die jeweilige Aminosäure detektiert wurde. Alle selektierten Peptide wurden berücksichtigt. Die parallel ausgeführten Selektionen gegen Bio-D-A β_{1-42} bzw. Bio-L-A β_{1-42} wurden unabhängig voneinander ausgewertet. Die Gesamtzahl aller detektierten Aminosäuren ist die Summe der ausgezählten einzelnen Aminosäuren.

Der Anreicherungsfaktor für die einzelnen Aminosäuren gibt das Verhältnis zwischen der prozentualen Häufigkeit der jeweiligen Aminosäure nach der Selektion zur prozentualen Häufigkeit der einzelnen Aminosäuren vor der Selektion an. Ein Faktor von 1 sagt aus, dass sich die prozentuale Häufigkeit der jeweiligen Aminosäure während der Selektion nicht verändert hat.

4.6. DNA-Isolierung über Anionenaustauschchromatographie

Zur Präparation von Phagen-Einzelstrang-DNA (ssDNA) für Sequenzierreaktionen (20 μ g-Maßstab) wurden kommerziell erhältliche Kits (QIAprep 96 M13, Qiagen, Hilden) verwendet. Es wurde nach dem Protokoll der Hersteller vorgegangen und die DNA mit 100 μ l 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 eluiert.

4.7. DNA-Sequenzierung

Für die Sequenzierung der ssM13-DNA wurde die Einzelstrang-DNA (ssDNA) wie in Kapitel 4.6. beschrieben gewonnen. Für die Sequenzierreaktion wurden 400 ng der ssDNA in 6 μ l H₂O mit 4 μ l Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems, Warrington, UK) und 1 μ l Sequenzierprimer M13-Seq(-) (5 pmol/ μ l) gemischt und einer PCR unter folgenden Bedingungen unterzogen: Nach 5 sec Denaturierung bei 95 °C begannen 30 Zyklen mit jeweils 30 sec Denaturierung bei 95 °C, 10 sec Primer-Annealing bei 55 °C und 4 min Primer-Verlängerung bei 60 °C.

Anschließend wurden die Kettenabbruchprodukte mit Ethanol präzipitiert, indem die wässrige DNA-Lösung mit 2,5 Volumen vorgekühlter 2 M Ammoniumacetat/Ethanol-Lösung vermischt wurde. Gefällt wurde für mindestens 1 h bei RT. Die DNA wurde dann durch Zentrifugation (4300 rpm, 1 h, 4 °C) präzipitiert. Zur Entfernung von überschüssigem Salz

wurde das DNA-Pellet zweimal mit kaltem 70 %igem Ethanol gewaschen und über 20 min an der Luft getrocknet. Die trockene DNA wurde in 3 µl Ladepuffer aufgenommen. 2 µl der Probe wurden einer denaturierenden Harnstoff-PAGE in einem ABI Prism 377 DNA Sequencer (PE Applied Biosystems, Warrington, UK) unterzogen. Dabei kamen 4%ige Gele mit der Zusammensetzung 40 ml Gel-Mix mit 15 µl TEMED und 160 µl APS zum Einsatz. Die Auswertung der Sequenzierungen erfolgte mit ABI Prism Sequencing Analysis 3.4.1. (Applied Biosystems, Langen) und den Programmen des Wisconsin Packages, Version 9 (Genetic Computer Group Inv., Wisconsin, USA).

4.8. Fluoreszenzspektroskopische Messungen

Die Bindung zwischen dem selektierten D-Peptid (D-Pep1) und dem Bio-L-A β ₁₋₄₂ wurde zunächst durch fluoreszenzspektroskopische Messungen untersucht. D-Pep wurde chemisch synthetisiert und am C-Terminus mit einem Fluorescein markiert (Fluo-D-Pep1). Die Versuche wurden bei 298 K an einem SLM Aminco Fourier Transform Spektrofluorometer 48000 MHF (SLM Instruments Inc., USA) in einer Standardfluoreszenzzelle aus SUPRASIL Quarzglas (10x10 mm, Hellma, Deutschland) durchgeführt. Das Fluo-D-Pep1 wurde in einer Konzentration von 0,8 µM in PBS mit 1 mM SDS, pH 7,4, mit einem Volumen von 2 ml vorgelegt und Bio-L-A β ₁₋₄₂ in HFIP in steigender Konzentration hinzutitriert. In vorherigen Versuchen wurden TBST und PBS als Lösungsmittel verwendet. Es kam während der Titration zu einer Aggregation des Bio-L-A β ₁₋₄₂ und damit zu einer Streuung des Fluoreszenzlichts. Erst durch den Einsatz von 0,8 µM in PBS mit 1 mM SDS, pH 7,4, wurden reproduzierbare Messwerte erreicht.

Für die Messungen wurden Bio-L-A β -Lösungen in HFIP in Konzentrationen von 1 mM und 0,2 mM hergestellt. Die Messung erfolgte unter Rühren bei einer Anregungswellenlänge von 495 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm. Für einen Messpunkt wurden 589 Datenpunkte in einer Minute aufgenommen und gemittelt. Für jeden Messpunkt wurde eine Nullpunktkorrektur durchgeführt.

Der mögliche Einfluss des Lösungsmittels HFIP auf die Fluoreszenz des Fluo-D-Pep1 wurde durch Kontrollmessungen überprüft. Statt der Bio-L-A β ₁₋₄₂-Lösungen in HFIP wurde reines HFIP in gleichen Volumina in die Messzelle pipettiert. Die ermittelten Messpunkte dieser Kontrolle wurden von den Messpunkten der Titration mit Bio-L-A β ₁₋₄₂ in HFIP subtrahiert.

Weiterhin wurde der Einfluss von steigenden Konzentrationen an Bio-L-A β ₁₋₄₂ in HFIP auf das Fluoreszenzsignal von Fluorescein ohne D-Pep1 untersucht. Dafür wurde Fluorescein statt des Fluo-D-Pep1 in gleicher Konzentration in den Versuch eingesetzt. Als Kontrolle, dass durch die Versuchsanordnung nicht unspezifisch das Fluoreszenzsignal jedes Fluorescein-markierten 12mer Peptids beeinflusst wird, wurde der Versuch in gleicher Form nur mit einem willkürlich ausgewählten 12mer-L-Peptid (Kontroll-Peptid, siehe Tabelle 3-3) durchgeführt. Jede Messung wurde mindestens einmal wiederholt.

4.9. Entparaffinierung von Gewebeschnitten

Die verwendeten Gewebeschnitte wurden im formalin-fixiertem und paraffin-eingebetteten Zustand geliefert. Zur Entfernung des Paraffins aus den Geweben, wurden Objektträger mit den Gewebeschnitten zunächst nacheinander für je zweimal für 3 min in frisches Rotihistol, 100% Ethanol und 95% Ethanol und abschließend für 5 min in PBS getaucht.

4.10. Färbung von A β -Ablagerungen mit Fluo-D-Pep1 und Cy3-markiertem Anti-A β ₁₋₁₆-Antikörpersystem

4.10.1. Färbung von A β -Ablagerungen in Blutgefäßen

Die entparaffinierten Gewebeschnitte wurden vorsichtig mit PBS gespült und 20 min mit 10 mg/ml BSA in PBS bei Raumtemperatur inkubiert. Der Antikörper Anti-A β ₁₋₁₆ wurde 1:50 und das Fluo-D-Pep1 auf 5 μ M Endkonzentration gemeinsam in 10mg/ml BSA verdünnt und für 1 h bei RT auf das Gewebe gegeben. Es folgten zwei Bäder für 5 min in PBS und eine Inkubation mit dem zweiten Cy3-markierten Antikörper für 1 h. Abschließend wurde dreimal mit PBS gewaschen, mit Dako-Fluorescent-mounting Medium eingedeckt und mikroskopiert (siehe Kapitel 4.12.). Das Antikörpersystem bestehend aus Anti-A β ₁₋₁₆-Antikörper (Maus-Anti-Amyloid-Beta 1-16, monoklonaler Antikörper) und dem Cy3-markierten, sekundären Antikörper (Schaf-Anti-Maus-IgG, ganzes Molekül) wird im Folgenden als Cy3-Anti-A β ₁₋₁₆ bezeichnet.

4.10.2. Färbung der A β -Ablagerungen in Form von Plaques

Die Färbung erfolgte wie in Kapitel 4.10.1 beschrieben. Zusätzlich wurden nach dem Entparaffinieren weitere Schritte durchgeführt. 40 ml Lösung aus NaCl in 80 % Ethanol (Sigma, Deisenhofen) wurden mit 0,4 ml einer 1 % Natrium-Hydroxid-Lösung (0,25 mol/l, Sigma, Deisenhofen) vermischt. Beide Lösungen sind Bestandteil des „Accustain[®], Amyloid stain, Congo Red“-Kit von Sigma, Deisenhofen. In dieser Lösung wurde das Gewebe 20 min inkubiert, anschließend fünfmal für 5 min in PBS gewaschen und mit den unter 4.10.1. beschriebenen Färbeschritten fortgefahren. Alternativ dazu erfolgte statt der Inkubation in der aufgeführten Lösung eine Inkubation der entparaffinierten Gewebeschnitte für 2 min mit konzentrierter Ameisensäure (Roth, Karlsruhe) mit anschließenden Waschschritten fünfmal für 5 min in PBS.

In einem weiteren Färbe-Verfahren wurde zunächst das Gewebe entparaffiniert und mit der alkalischen NaCl-Lösung behandelt. Es folgte eine Färbung der Plaques mit dem Fluo-D-Pep1 und ein Mikroskopieren des Gewebes (siehe Kapitel 4.12.). Nach der folgenden Durchführung von Waschschritten (siehe oben) wurde das Gewebe für 2 min mit Ameisensäure inkubiert, mit dem Cy3-Anti-A β_{1-16} gefärbt und mikroskopiert.

4.10.3. Durchführung von Kontrollen

Als Kontrolle wurde jeweils ein Gewebeschnitt aus einem Nicht-Alzheimer Patienten (Jena 2) auf gleiche Weise wie die Gewebeschnitte des jeweiligen Alzheimer-Patienten behandelt und mikroskopiert (siehe Kapitel 4.10.2. und 4.12.). Weiterhin erfolgten parallel zu den unter 4.10.2. aufgeführten Doppelfärbungen Einzelfärbungen mit dem Fluo-D-Pep1 bzw. dem Cy3-Anti-A β_{1-16} .

4.11. Färbung von verschiedenen Amyloid-Ablagerungen mit Fluo-D-Pep1 und Kongo-Rot

4.11.1. Behandlung der Gewebeschnitte vor der Färbung mit dem Fluo-D- Pep1

Ziel dieser Experimente war die Klärung der Frage, ob das D-Pep1 auch an Amyloid-Ablagerungen anderer Proteinfaltungskrankheiten bindet. Dafür wurden die jeweiligen Gewebeschnitte (siehe Tabelle 3-4) nach dem Entparaffinieren (siehe Kapitel 4.9.) einmal für 5 min in PBS und einmal für 5 min in H₂O gewaschen. Danach wurden 0,4 ml einer 1 % NaOH-Lösung mit 40 ml Lösung aus NaCl in 80 % Ethanol vermischt. Beide Lösungen sind Bestandteil des „Accustain[®], Amyloid stain, Congo Red“-Kit von Sigma, Deisenhofen. Die Lösung wird im Folgenden als alkalische NaCl-Lösung bezeichnet. Die Gewebeschnitte wurden für 20 min in die Lösung getaucht. Es folgten viermal 5 min im PBS-Bad und eine Inkubation mit 10 mg/ml BSA in PBS für 20 min bei RT. Danach wurden die Schnitte zweimal 5 min in PBS und einmal 5 min in H₂O gewaschen. Das Gewebe wurde mit 90% Glycerin in PBS und einem Deckglas eingedeckt und sofort mikroskopiert (siehe Kapitel 4.12.). Dies diente als Kontrolle, dass auftretende Fluoreszenzsignale nicht auf eine Autofluoreszenz im Gewebe zurückzuführen waren.

4.11.2. Färbung mit Fluo-D-Pep1

Von den Gewebeschnitten aus 4.11.1. wurde durch dreimaliges Waschen für 5 min in PBS das 90 % Glycerin in PBS entfernt. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Gewebeschnitte mit 10 mg/ml BSA in PBS für 20 min bei Raumtemperatur und eine Inkubation mit 5 µM Fluo-D-Pep1 in 10 mg/ml BSA in PBS für 1 h bei RT. Nach Ablauf der Färbezeit wurde das Gewebe zweimal für 5 min in PBS und einmal für 5 min in H₂O getaucht, mit 90 % Glycerin in PBS und einem Deckglas eingedeckt und mikroskopiert (siehe Kapitel 4.12.).

4.11.3. Färbung mit Kongo Rot

Für die Färbung der Gewebeschnitte wurde der „Accustain[®], Amyloid stain, Congo Red“ – Kit von Sigma (Deisenhofen) verwendet. Die Gewebeschnitte aus 4.11.2. wurden wiederum

durch dreimal für 5 min in H₂O vom 90 % Glycerin in PBS befreit. Es folgte eine Zugabe 0,4 ml einer 1 % Natrium-Hydroxid-Lösung (0,25 mol/l, Sigma, Deisenhofen) zu 40 ml der 0,2 % Kongo Rot-Lösung in 80 % Ethanol (Sigma, Deisenhofen). Die Flüssigkeit wurde filtriert und die Gewebeschnitte 20 min in die Flüssigkeit getaucht. Abschließend wurden die Schnitte dreimal für 5 min in H₂O gewaschen, mit Dako-Fluoreszenz-Mounting-Medium und einem Deckglas eingedeckt und mikroskopiert (siehe Kapitel 4.12.).

4.12. Mikroskopie

Die Betrachtung der präparierten Gewebeschnitte erfolgte mit einem Axiovert 135-Mikroskop (Zeiss, Jena), welches mit einer HBO 50 Lichtquelle ausgestattet war. Die Dokumentation erfolgte mit der 3 CCD Color Video Camera AVT Horn MC-3254 (Sony, Köln) und dem KS 300 Imaging System, Release 3.0 (Zeiss, Jena). Die verwendeten Filtersets waren das Fluoreszenz-Filterset 10 von Zeiss, Jena (Anregung 450 bis 490 nm, Beamsplitter 510, Emission 515 bis 565 nm) zur Detektion von Fluorescein und das Fluoreszenz-Filterset 14 von Zeiss, Jena (Anregung 510 bis 560 nm, Beamsplitter 580, Emission 590 nm) zur Detektion von des Farbstoffs Cy3 und der Kongo Rot-Färbungen.

4.13. Zellkulturen

4.13.1. Beschichtung von Kulturgefäßen mit dem Adhäsionsfaktor Collagen A

Für das adherente Wachstum der PC12-Zellen war eine Beschichtung der Gewebekulturschalen mit Collagen A notwendig. Zur Collagen-Lösung wurde mit gleichem Volumen PBS hinzugefügt, pro 75 cm² Bodenfläche 5 ml der Collagen/PBS-Lösung in das Kulturgefäß pipettiert und 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abgesaugt, die Bodenfläche des Kulturgefäßes zweimal mit PBS gewaschen und das Kulturgefäß sofort verwendet.

4.13.2. Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Die Inkubation der PC12-Zellen erfolgte bei 37°C und 7,5 % (v/v) CO₂-Atmosphäre (CB150, WTB Binder, Tuttlingen) in DMEM mit Zusätzen. Ein Wechsel des Kulturmediums wurde alle 48 bis 60 Stunden durchgeführt. Alle 4 bis 6 Tage wurden die Zellen in neue Gewebekulturschalen umgesetzt. Dafür wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellschicht zweimal vorsichtig mit PBS gewaschen. 10 ml Trypsin/EDTA-Lösung wurden zu 90 ml sterilem H₂O gegeben und vermischt. Durch Zugabe von 10 ml dieser Trypsin/EDTA-Lösung wurden die Zellen vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst und durch mehrmaliges Aufziehen der entstandenen Zellsuspension mit einer Pipette vereinzelt. Es folgte eine Zentrifugation der Zellsuspension für 3 min bei 4 °C bei 1000 x g. Der Überstand wurde abgesaugt und das entstandene Zellpellet vorsichtig in 1 ml DMEM mit Zusätzen resuspendiert. 200 µl dieser Zellsuspension wurden in 25 ml neues Medium überführt.

4.13.3. Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer

Für die Bestimmung der Zellzahl wurde die Zellsuspension aus 4.13.2. 1:10 mit DMEM und noch mal 1:2 mit Trypanblau (siehe Kapitel 3.6.) verdünnt. Durch das Trypanblau ist eine Unterscheidung zwischen toten Zellen und lebenden Zellen möglich, da sich Trypanblau nur in tote Zellen einlagert. Diese erscheinen nach der Färbung blau, während lebende Zellen farblos blieben. Nach der Auszählung der lebenden Zellen wurde unter Berücksichtigung der definierten Volumina innerhalb der Abgrenzungen einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl pro Milliliter DMEM bestimmt.

4.14. Vorbereitung der Peptid-Lösungen für die Cytotoxizitätstests

4.14.1. Untersuchung der Cytotoxizität der biotinylierten Enantiomere von Aβ₁₋₄₂

Zur Vorbereitung wurde Bio-D- Aβ₁₋₄₂ bzw. Bio-L- Aβ₁₋₄₂ in einer Konzentration von 350 µM in H₂O gelöst und für 5 Tage bei 37°C unter Schütteln bei 200 rpm inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde eine Verdünnungsreihe in H₂O mit den Verdünnungen 350 µM, 70 µM, 35 µM, 7 µM, 3,5 µM, 350 nM, 35 nM, 3,5 nM hergestellt. 20 µl dieser Lösungen wurde jeweils zu 80 µl Zellen/Medium pipettiert (siehe Kapitel 4.15.). Durch den

Einsatz in den Test wurden die jeweiligen Proben wiederum 1:5 verdünnt, was zu den jeweiligen Endkonzentrationen an Biotinyl-A β_{1-42} im Test von 70 μM , 14 μM , 7 μM , 1,4 μM , 700 nM, 70 nM, 7 nM und 700 pM führte.

4.14.2. Untersuchung der Cytotoxizität von A β_{1-42} in Abhängigkeit von der Konzentration

Nach modifizierter Vorlage von Pallitto *et al.* (Pallitto und Murphy, 2001) wurde lyophilisiertes L-A β_{1-42} (unbiotinyliert) in einer Konzentration von 1 mM in gefiltertem (Filter 0,22 μM) 8 M Harnstoff, in 10 mM Glycin-NaOH pH 10, gelöst. Der Test wurde mit Endkonzentrationen an A β_{1-42} im Well von 20 μM , 10 μM , 1 μM , 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM durchgeführt. Für die Endkonzentrationen von 20 μM , 10 μM bzw. 1 μM wurde die 1-mM-A $\beta_{(1-42)}$ -Lösung 1:10, 1:20 bzw. 1:200 in PBS verdünnt. Für die kleineren Verdünnungsstufen wurden A β_{1-42} -Lösungen in 8 M Harnstoff von 100 μM , 10 μM , 1 μM , 100 nM hergestellt. Diese wurden im Anschluss jeweils 1:200 in PBS verdünnt und für 24 h bei 25 °C auf einem Schüttler (600 rpm) inkubiert. 20 μl dieser Lösungen wurde jeweils zu 80 μl Zellen/Medium pipettiert (siehe 4.15.).

4.14.2. Untersuchung des Einfluss von D-Pep1 auf die Cytotoxizität einer 1 μM A β_{1-42} -Lösung

Lyophilisiertes L-A β_{1-42} (unbiotinyliert) wurde in einer Konzentration von 1 mM in gefiltertem (Filter 0,22 μM) 8 M Harnstoff-Lösung gelöst. Der Test wurde mit einer Endkonzentration an A β_{1-42} im Well von 1 μM durchgeführt.

Zunächst wurde eine 5 mM-D-Pep1-Lösung in PBS und dann Verdünnungen von 2,5 mM, 500 μM , 250 μM , 50 μM , 5 μM und 1 μM in PBS hergestellt. 1 μl der 1-mM-A $\beta_{(1-42)}$ -Lösung wurde zu 199 μl der jeweiligen D-Pep1-Lösung hinzugefügt und für 24 h bei 25 °C auf einem Schüttler (600 rpm) inkubiert. 20 μl dieser Lösungen wurde jeweils zu 80 μl Zellen/Medium pipettiert (siehe Kapitel 4.15.). Durch diesen Versuchsaufbau wurden Endkonzentrationen an D-Pep1 im Well von 1 mM, 500 μM , 100 μM , 50 μM , 10 μM , 1 μM , 0,2 μM und 0 μM erreicht. Die Konzentration an Harnstoff betrug in jedem Ansatz 8 μM .

4.14.3. Untersuchung der Cytotoxizität des D-Pep1

Zunächst wurde eine 5-mM-D-Pep1-Lösung in PBS und dann Verdünnungen von 2,5 mM, 500 μ M, 250 μ M, 50 μ M, 5 μ M und 1 μ M in PBS hergestellt. 1 μ l der 8 M Harnstoff-Lösung wurde zu 199 μ l der jeweiligen D-Pep1-Lösung addiert und für 24 h bei 25 °C auf einem Schüttler (600 rpm) inkubiert. 20 μ l dieser Lösungen wurde jeweils zu 80 μ l Zellen/Medium pipettiert (siehe Kapitel 4.15.). Durch diesen Versuchsaufbau wurden Endkonzentrationen an D-Pep1 im Well von 1 mM, 500 μ M, 100 μ M, 50 μ M, 10 μ M, 1 μ M und 0,2 μ M erreicht.

4.14.5. Untersuchung der Cytotoxizität von fibrillärem A β ₁₋₄₂ in Abhängigkeit von der A β -Konzentration

Zur Vorbereitung wurde A β ₁₋₄₂ (unbiotinyliert) in einer Konzentration von 350 μ M in H₂O gelöst und für 5 Tage bei 37°C unter Schütteln bei 200 rpm inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden Verdünnungen in H₂O mit den Verdünnungen 350 μ M, 70 μ M, 35 μ M, 7 μ M, 3,5 μ M, 350 nM und 35 nM hergestellt. 20 μ l dieser Lösungen wurde jeweils zu 80 μ l Zellen/Medium pipettiert (siehe Kapitel 4.15.). Durch den Einsatz in den Test wurden die jeweiligen Proben wiederum 1:5 verdünnt, was zu den jeweiligen Endkonzentrationen an A β ₁₋₄₂ im Test von 70 μ M, 14 μ M, 7 μ M, 1,4 μ M, 700 nM, 70 nM, 7 nM und 700 pM führte.

4.14.6. Untersuchung des Einfluss von D-Pep1 auf die Cytotoxizität von fibrillärem A β ₁₋₄₂

Die 350- μ M-L-A β -Lösung aus 4.14.5. wurde mit H₂O auf eine Konzentration von 100 μ M bzw. 10 μ M verdünnt. Dann wurden eine 5-mM-D-Pep1-Lösung in H₂O und Verdünnungen von 2,5 mM, 1mM, 500 μ M, 100 μ M, 20 μ M und 10 μ M bzw. 2 mM, 1 mM, 500 μ M, 250 μ M, 100 μ M, 10 μ M und 2 μ M in H₂O hergestellt. Die jeweilige Lösung wurde 1:1 mit der 100 μ M bzw. 10 μ M A β -Lösung verdünnt. Jeweils 20 μ l dieser Lösungen wurden zu 80 μ l Zellen/Medium pipettiert (siehe Kapitel 4.15.). Durch diesen Versuchsaufbau wurden Endkonzentrationen an D-Pep1 von 500 μ M, 250 μ M, 100 μ M, 50 μ M 10 μ M, 2 μ M und 1 μ M bzw. 200 μ M, 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 10 μ M, 1 μ M und 0,2 μ M und an 10 μ M bzw. 1 μ M an A β im Versuchsansatz erreicht. Die A β -Endkonzentrationen im Testansatz lagen bei 1 μ M und 10 μ M.

4.15. Durchführung des Cytotoxizitätstests

Für die Durchführung der Cytotoxizitätstests wurden 2×10^4 Zellen pro Well in 100 µl frischem Medium in Collagen-IV-beschichtete Mikrotiterplatten eingesät und für 24 Stunden bei 37 °C und 7,5 % (v/v) CO₂-Atmosphäre (CB150, WTB Binder, Tuttlingen) inkubiert.

Nach Ablauf der 24 h wurden 20 µl des Mediums entfernt und durch 20 µl der jeweiligen Aβ₁₋₄₂-Lösung (siehe Kapitel 4.14.) ersetzt. Die Anzahl der Parallelen betrug immer 6. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C und 7,5 % (v/v) CO₂-Atmosphäre (CB150, WTB Binder, Tuttlingen) für 24 h.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden jeweils 10 µl MTT-Lösung hinzugefügt und die Zellen für weitere 3 h unter gleichen Bedingungen wie oben inkubiert. Danach wurde die Flüssigkeit entfernt und durch 100 µl Lysispuffer ersetzt. Die Mikrotiterplatte wurde für 30 min langsam geschüttelt. Abschließend erfolgte eine photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 570 nm. Die Referenzwellenlänge betrug 630 nm.

4.16. Berechnung der MTT-Reduktion

Für die Umrechnung der erhaltenen Messwerte wurde für jede Messung ein 100 %- und ein 0 %-Wert bestimmt. Der 100 %-Wert ergab sich durch Zugabe gleicher Anteile an PBS, H₂O bzw. Harnstoff wie beim eigentlichen Test. Für die Bestimmung des 0 %-Wertes wurde für eine komplette Inhibition der Zellfunktionen durch Zugabe 0,2 % Triton X-100 herbeigeführt. Durch die Zugabe von 0,2 % Triton X-100 kommt es zur Zelllyse. Jede Messung wurde in 6 Parallelen durchgeführt und das arithmetische Mittel der erhaltenen Messwerte bestimmt. Die MTT-Reduktion wurde dann relativ zum 0%- und zum 100%-Wert in Prozent bestimmt. Zusätzlich wurde Standardabweichung der Meßwerte zum arithmetischen Mittel bestimmt.

5. Experimente und Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit sollten aus D-Aminosäuren bestehende Peptide (D-Peptide) identifiziert werden, die eine hohe Affinität zum Alzheimer-Amyloid-Peptid (A β) besitzen. D-Peptide weisen nach Schumacher *et al.* eine stark reduzierte Proteasesensitivität und ein herabgesetztes immunogenes Potential auf (Schumacher *et al.*, 1996). Ausgehend von der Amyloid-Kaskaden-Hypothese (siehe Kapitel 2.1.5.) sind Liganden von A β potentielle Grundlagen zur Entwicklung von diagnostischen und therapeutischen Strategien in der Behandlung von Alzheimer-Patienten (siehe Kapitel 2.1.7. und 2.1.8.). Für die Identifizierung der D-Peptide wurde das Spiegelbild-Phagen-Display-Verfahren (siehe Kapitel 2.2.4.) ausgewählt. Das Verfahren wurde bereits erfolgreich bei der Identifizierung von D-Peptiden mit verschiedenen Molekülen als Target durchgeführt (Eckert *et al.*, 1999; Kozlov *et al.*, 2001; Schumacher *et al.*, 1996).

Phagen-Display-Verfahren (siehe Kapitel 2.2.3.) haben den Vorteil, dass sie in kurzer Zeit und mit relativ geringem Aufwand ein Screening von großen Peptid-Bibliotheken ermöglichen (Kay *et al.*, 1998). Für die in dieser Arbeit verwendete kommerzielle Phagen-Bibliothek garantiert der Hersteller eine Variabilität von $\sim 2 \times 10^9$ verschiedenen Varianten an Peptiden. Chemische Peptid-Bibliotheken weisen meist eine geringere Variabilität auf.

Die 12mer Peptid-Bibliothek (Ph.D.-12TM Phage Display Peptide Library Kit, New England Biolabs, Frankfurt) wurde ausgewählt, weil einerseits eine möglichst große Anzahl von Peptiden als Wechselwirkungspartner mit dem Target zur Verfügung stehen sollte, aber andererseits das selektierte Peptid für einen Einsatz als Diagnostikum oder Therapeutikum ein möglichst geringes Molekulargewicht haben sollte, da die Wahrscheinlichkeit der Permeabilität über die Blut-Hirnschranke bei kleineren Peptiden größer ist (Levin, 1980).

5.1. Physikalische Eigenschaften von Biotinyl-L-A β ₁₋₄₂ und Biotinyl-D-A β ₁₋₄₂

Für die Durchführung von Spiegelbild-Phagen-Display-Experimenten ist es entscheidend, dass das verwendete Target-Molekül das exakte Spiegelbild des natürlichen Targets ist (siehe Kapitel 2.2.4.). Für die Experimente im Rahmen der vorliegenden Arbeiten wurden das L- und das D-Enantiomer des Peptids A β ₁₋₄₂ von Jerini (Berlin) chemisch synthetisiert und mit

einem Biotinyl-Rest am N-Terminus versehen. Zur Überprüfung der physikalischen Eigenschaften der beiden biotinylierten $A\beta_{1-42}$ -Enantiomere wurden Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie, Kernresonanzspektroskopie (NMR) und Elektronenmikroskopie genutzt. Im Nachfolgenden sind die einzelnen Untersuchungen dargestellt.

5.1.1. NMR-Messungen

Zur Überprüfung der Aminosäuresequenz von Biotinyl-L- $A\beta_{1-42}$ bzw. von Biotinyl-D- $A\beta_{1-42}$ (Bio-L- $A\beta_{1-42}$ bzw. Bio-D- $A\beta_{1-42}$) wurden NMR-Experimente durchgeführt. Zur Identifizierung aller Protonenresonanzen wurden homonukleare, zweidimensionale NMR-Spektren (COSY, TOCSY, NOESY) beider Enantiomere aufgenommen. Die Spektren des D- und L-Enantiomers von Bio- $A\beta_{1-42}$ stimmten nahezu perfekt überein (siehe Abbildung 5-1).

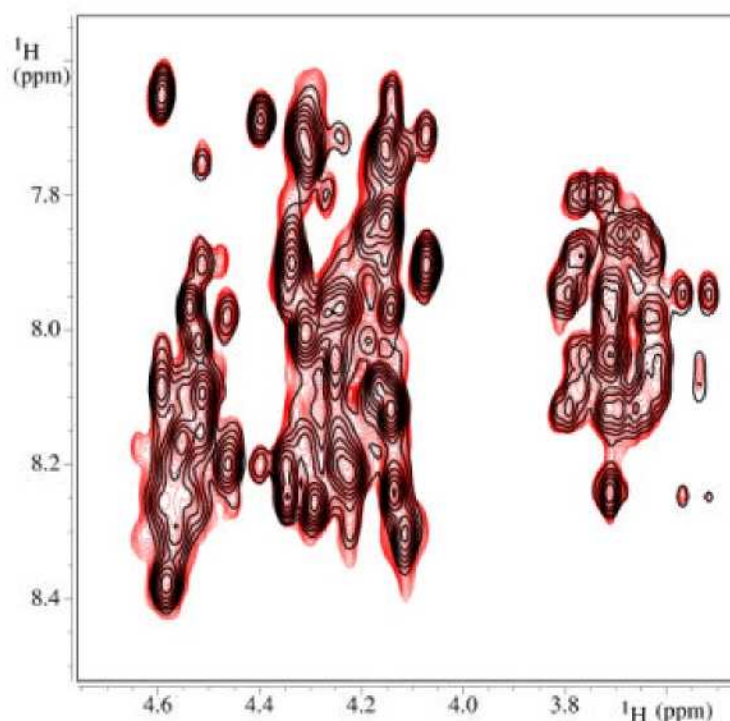


Abbildung 5-1: Überlagerung der HN/H α -Region („Fingerabdruck-Region“) aus 2D 200-ms-NOE-Spektren von D- $A\beta_{1-42}$ (rote Konturlinien) und L- $A\beta_{1-42}$ (schwarze Konturlinien).

Es wurden nur geringfügige Differenzen in den chemischen Verschiebungen einiger Protonen gefunden, die zu Resten am aminoterminalen Ende nahe des Biotinyl-Rests gehören, welcher jeweils in der natürlichen D-Form vorlag. An dieser Position sind die D- und die L-Form von $A\beta_{1-42}$ nicht das exakte Spiegelbild voneinander. Biotin in seiner natürlichen D-Form ist

wichtig für die Bindung an Streptavidin, da nur sie an Streptavidin bindet. Die Resonanzen der Protonensignale von L-A β ₁₋₄₂ wurden zugeordnet und in der BMRB-Datenbank („BioMagResBank“) unter dem Eintrag 5400 hinterlegt.

5.1.2. CD-Messungen

Das CD-Spektrum von Bio-L-A β ₁₋₄₂ in Hexafluoroisopropanol (HFIP) zeigte die für eine α -helikale Struktur typischen Merkmale, wobei die Minima geringfügig in den kurzwelligen Bereich verschoben waren. Rechtshändige α -helikale Peptide liefern CD-Spektren mit negativem Cotton-Effekt (CD-Banden werden als Cotton-Effekt bezeichnet) bei $\lambda=222$ nm und bei $\lambda=207$ nm und einem positiven Cotton-Effekt bei $\lambda=192$ nm. Die gemessenen Minima lagen bei $\lambda=205$ nm und $\lambda=220$ nm und das Maximum bei $\lambda=190$ nm. Aus der Lage der Minima lässt sich abschätzen, dass gemittelt über Zeit und Peptidkette 30 bis 40 % der Aminosäuren in α -helikaler Sekundärstruktur vorlagen. Das Spektrum von Bio-D-A β ₁₋₄₂ war das erwartete Spiegelbild-Spektrum zum Spektrum von Bio-L-A β ₁₋₄₂ (siehe Abbildung 5-2).

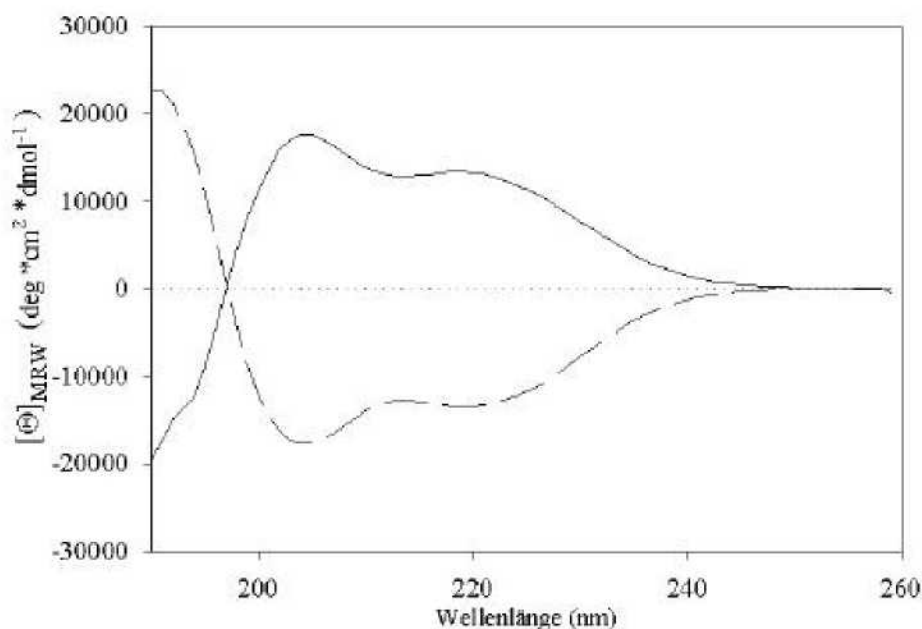


Abbildung 5-2: Fern-UV-CD-Spektren von Bio-L-A β ₁₋₄₂ und Bio-D-A β ₁₋₄₂

Bio-L-A β ₁₋₄₂ (gestrichelte Linie) bzw. Bio-D-A β ₁₋₄₂ (durchgezogene Linie) wurden in Konzentrationen von 41,2 μ M bzw. 54,2 μ M in HFIP gelöst (siehe Kapitel 4.1.). Alle Proteinspektren wurden um das dazugehörige Lösungsmittelspektrum für HFIP korrigiert und die mittlere molare Elliptizität je Aminosäurerest (siehe Kapitel 4.1.) berechnet.

5.1.3. Elektronenmikroskopie

Anhand der Elektronenmikroskopie sollte untersucht werden, ob Bio-L-A β_{1-42} und Bio-D-A β_{1-42} ebenfalls die Eigenschaft von natürlichem L-A β_{1-42} zur Fibrillenbildung aufweisen. Unmittelbar nach dem Lösen von A β wies die Flüssigkeit eine Trübung auf, was auf eine sofortige Aggregation der Peptide schließen lässt. Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen negativ gefärbter Proben wurden sowohl für Bio-L-A β_{1-42} als auch für Bio-D-A β_{1-42} fibrilläre Strukturen beobachtet (siehe Abbildung 5-3). Die Durchmesser der Fibrillen betrugen 6,5 bis 10,5 nm, was mit den Literaturwerten von 7 bis 10 nm (Walsh *et al.*, 1999) übereinstimmt.

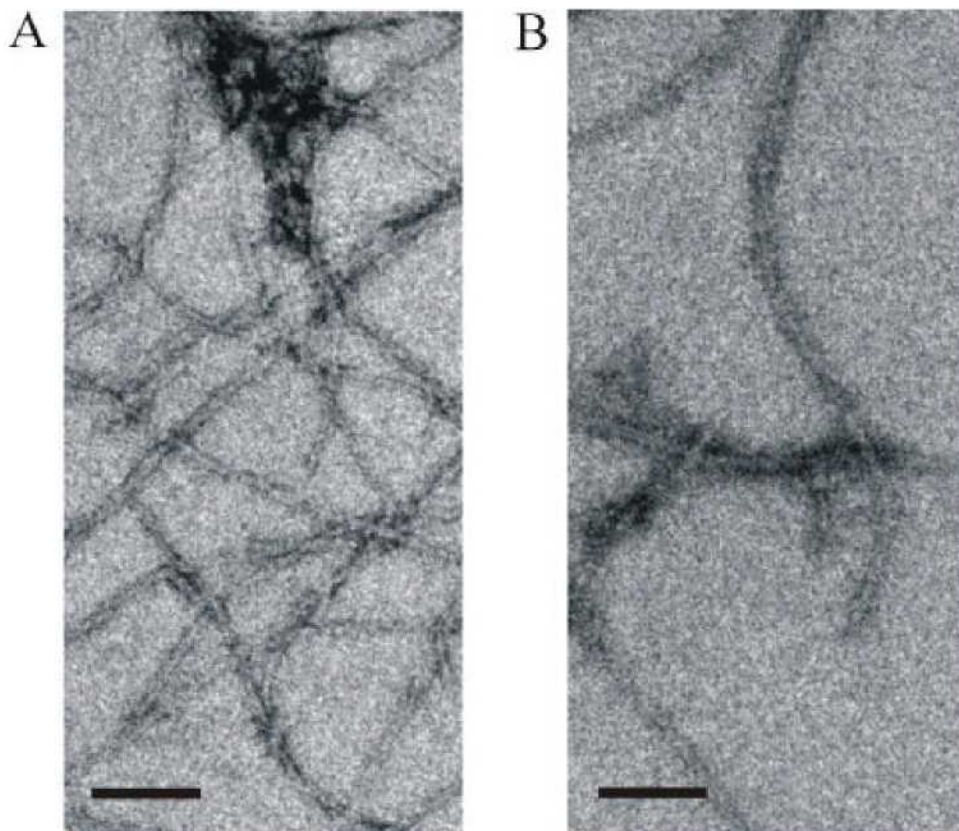


Abbildung 5-3: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Bio-L-A β_{1-42} und Bio-D-A β_{1-42}

Zur Vorbereitung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde Bio-L-A β_{1-42} (A) bzw. Bio-D-A β_{1-42} (B) in einer Konzentration von 350 μ M in H₂O gelöst und für 5 Tage bei 37°C unter Schütteln bei 200 rpm inkubiert. Die Negativkontrastierung erfolgte durch 2 % Uranylacetat. Der Balken gibt einen Maßstab von 100 nm an.

5.2. Einfluss der beiden biotinylierten A β ₁₋₄₂-Enantiomere auf die Lebensfähigkeit von eukaryotischen Zellen

Der Einfluss von Bio-L-A β ₁₋₄₂ bzw. Bio-D-A β ₁₋₄₂ auf die Lebensfähigkeit von eukaryotischen Zellen wurde anhand eines MTT-Tests mit PC12-Zellen als Testorganismus untersucht. Im MTT-Test wird die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen in lebenden Zellen gemessen (Lindl, 2000). Das Messprinzip des MTT-Tests beruht auf der Eigenschaft, dass gelbes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) in die Zellen eindringt und dort durch Dehydrogenasen zu Formazan reduziert wird. Es entstehen dunkelblaue Formazankristalle. Durch eine Lyse der Zellen wird Formazan freigesetzt und im Lysispuffer aus Dimethylsulfoxid (DMSO), Essigsäure und Natriumdodecylsulfat (SDS) (siehe Kapitel 4.15.) gelöst. Die Intensität der Formazanlösung wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm bestimmt. Durch die Zugabe einer cytotoxischen Substanz in den Testansatz wird die Lebensfähigkeit der Zellen verringert, die MTT-Reduktion geht zurück, und es wird weniger Formazan gebildet. Bei einer MTT-Reduktion von 100 % hat die zu prüfende Substanz keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Zellen. Der MTT-Test wird als Standardmethode zur Untersuchung von A β -vermitteltem Zelltod verwendet (Behl *et al.*, 1994; Pallitto und Murphy, 2001; Seilheimer *et al.*, 1997; Shearman *et al.*, 1994).

Durch die Zugabe von Bio-L-A β ₁₋₄₂ bzw. Bio-D-A β ₁₋₄₂ kam es zu einer Abnahme der MTT-Reduktion (siehe Abbildung 5-4). Die Lebensfähigkeit der PC12-Zellen ging zurück.

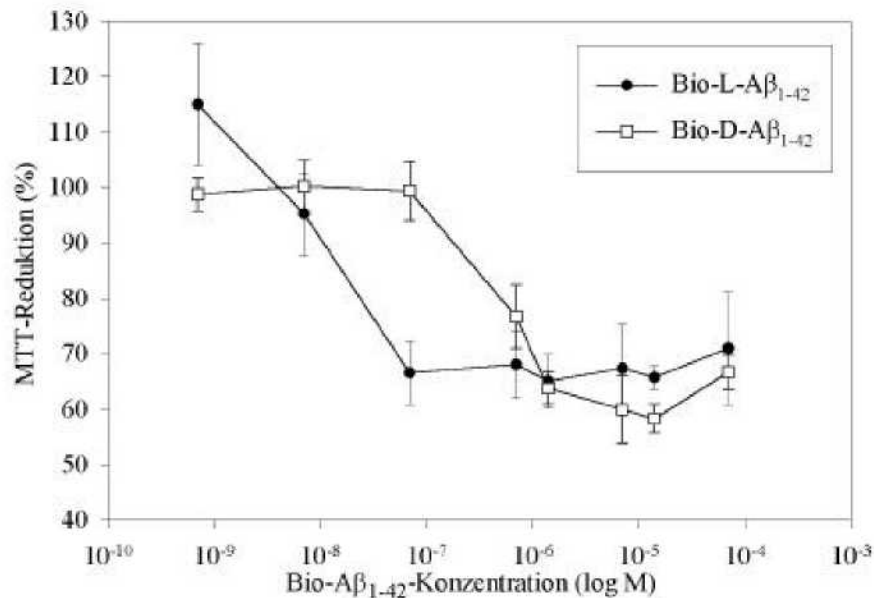


Abbildung 5-4: Dosis-Wirkungs-Kurve des Effekts von Bio-D-Aβ₁₋₄₂ bzw. Bio-L-Aβ₁₋₄₂ auf die Lebensfähigkeit von PC12-Zellen gemessen an der MTT-Reduktion der Zellen

Das jeweilige Bio-Aβ₁₋₄₂ wurde in einer Konzentration von 350 μM in H₂O gelöst und für 5 Tage bei 37°C unter Schütteln bei 200 rpm inkubiert. Der Test wurde wie in Kapitel 4.14.1. und 4.15. beschrieben durchgeführt. Die Berechnung der Prozentwerte der MTT-Reduktion (%) erfolgte anhand parallel gemessener Kontrollwerte (100 % = gleiche Anteile an PBS, ohne Aβ, 0 % = 0,2 % Triton-X). Aufgeführt sind die arithmetischen Mittel von 6 Parallelen für Bio-D-Aβ₁₋₄₂ und für Bio-L-Aβ₁₋₄₂. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen an.

Bei Bio-L- bzw. D-Aβ₁₋₄₂-Konzentrationen im Testansatz von 70 μM, 14 μM, 7 μM bzw. 1,4 μM fiel der Wert für die MTT-Reduktion auf ca. 60 %. Der Wert für die MTT-Reduktion für eine Konzentration von 0,7 nM Bio-L- Aβ₁₋₄₂ war größer 100 %, was durch einen „Ausreißer“-Wert weit über 100 % bedingt war. Bei der Konzentration von 70 nM wichen die Meßwerte für Bio-L-Aβ₁₋₄₂ und Bio-D-Aβ₁₋₄₂ stark voneinander ab. Trotz dieser Abweichung wurde der Versuch nicht wiederholt, weil die eigentliche Fragestellung, ob die beiden verwendeten Aβ₁₋₄₂-Enantiomere cytotoxisch sind, beantwortet wurde. Cribbs *et al.* (Cribbs *et al.*, 1997) führten ebenfalls Cytotoxizitätstests mit D- und L-Aβ durch und fanden ebenfalls eine Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit der eingesetzten Zellen durch beide Aβ-Enantiomere.

5.3. Ergebnisse der Selektionen

Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit wurden drei Spiegelbild-Phagen-Display-Selektionen gegen Bio-D-A β ₁₋₄₂ als Target durchgeführt, die sich jeweils in der Vorbereitung des A β -Targets, der Konzentration des Targets und im Zeitpunkt der Phagenzugabe unterschieden.

Zur Immobilisierung von biotinyliertem A β wurden Streptavidin-beschichtete Reaktionsgefäße verwendet. Die Peptidbibliothek bestand aus $\sim 2 \times 10^9$ voneinander unabhängigen Peptiden (New England Biolabs, Frankfurt/Main). Nach der Bindung der Phagen an das Target wurde eine 0,1 mM Biotin-Lösung für 5 min in das Reaktionsgefäß gefüllt, um Phagen zu eluieren, die an nicht durch das Target besetzte Streptavidin-Bindungsstellen gebunden waren. Durch Waschschrte wurden nicht immobilisierte Phagen aus dem Reaktionsgefäß entfernt. Die immobilisierten Phagen wurden durch eine Senkung des pH-Wertes eluiert. Nach der letzten Selektionsrunde wurden Phagen vereinzelt und amplifiziert. Die Phagen-DNA wurde isoliert und die Bibliothek-kodierende DNA-Region sequenziert. Die erhaltenen DNA-Sequenzen wurden in Aminosäuresequenzen übersetzt und mit den Programmen des Wisconsin Packages, Version 9 (Genetic Computer Group Inc., Wisconsin, USA) auf Konsensussequenzen untersucht.

Parallel zu jeder Spiegelbild-Phagen-Display-Prozedur wurden drei weitere Selektionsverfahren durchgeführt, die aus einer Selektion gegen L-A β ₁₋₄₂ als Target, einer Selektion ohne Target und einer Selektion gegen Streptavidin als Target bestanden. Die Selektion gegen das L-Target wurde unter gleichen Versuchsbedingungen wie die Selektion gegen das D-Target durchgeführt, um zu untersuchen, ob gegen das D-Target und das L-Target unterschiedliche Peptide selektiert werden.

Die Kontroll-Selektion ohne Target wurde ebenfalls unter gleichen Versuchsbedingungen wie die Selektion gegen das D-Target durchgeführt. Dies sollte mögliche Artefakte bedingt durch Versuchsbedingungen (z.B. Selektion gegen Plastikwand des Reaktionsgefäßes oder Selektionsdruck durch Einsatz der Lösungsmittel HFIP und DMSO) aufzeigen, um die in der Spiegelbild-Phagen-Display-Selektion selektierten Peptide auf solche Artefakte untersuchen zu können. Artefakte wurden unter den jeweiligen Versuchsbedingungen nicht beobachtet.

Die Test-Selektion gegen Streptavidin als Target diente zur Kontrolle, ob unter den gewählten Versuchsbedingungen eine erfolgreiche Selektion möglich war. Literaturangaben zufolge müsste die Selektion gegen Streptavidin als Target eine HPQ-Konsensussequenz ergeben (Devlin *et al.*, 1990; Katz, 1995). Für diese Test-Selektion wurden die jeweiligen Lösungsmittel HFIP und DMSO in gleichen Anteilen zum Selektionsansatz hinzugefügt wie in der Selektion gegen das D-Target. Nach der Immobilisierung der Phagen an Streptavidin wurden Waschschrte durchgeführt und mit einer 0,1 mM Biotin-Lösung eluiert. Das HPQ-Motiv wurde unter den angewendeten Versuchsbedingungen selektiert.

5.3.1. Selektion 1

Für die Selektion 1 wurde Bio-D-A β_{1-42} bzw. Bio-L-A β_{1-42} in einer Konzentration von 2 mM in HFIP gelöst und nachfolgend in einer Konzentration von 250 μ M in DMSO verdünnt. Durch den Einsatz der organischen Lösungsmittel sollte die sofortige Aggregation der A β -Moleküle verhindert werden. Die A β -Endkonzentration in TBST war 250 nM. Dann erfolgte eine Zugabe der Phagen-Peptid-Bibliothek. Die Phagen/Bio-D-A β_{1-42} -Suspension wurde in Streptavidin-beschichtete Reaktionsgefäße gefüllt. Dadurch wurden Phagen, die Bio-D-A β_{1-42} -bindende Peptide präsentierten, immobilisiert. Nach insgesamt vier Selektionsrunden wurden vereinzelte Phagen amplifiziert, die DNA isoliert und sequenziert. Abbildung 5-5 zeigt eine Übersicht der abgeleiteten Aminosäuresequenzen im Ein-Buchstaben-Code.

diese Aminosäuresequenz ein Peptid beschreibt, welches mit einer signifikanten Affinität an das D-A β_{1-42} bindet. Das D-Enantiomer dieses selektierten 12mer L-Peptids wurde chemisch synthetisiert und für weitere Experimente eingesetzt.

Bis auf ein Peptid, welches zweimal auftrat, wiesen die weiteren 16 selektierten Peptide wenig Ähnlichkeiten auf. Es zeigte sich keine Konsensussequenz. Auch ein multiples Sequenz-Alignment mit den Programmen des Wisconsin Packages, Version 9 (Genetic Computer Group Inv., Wisconsin, USA) ergab keine Konsensussequenz.

Nach 4 Selektionsrunden mit Bio-L-A β_{1-42} als Target wurde die DNA von 21 Phagen sequenziert. Eine Konsensussequenz wurde nicht gefunden (siehe Abbildung 5-6). Die Aminosäuresequenzen sind heterogen.



Abbildung 5-6: Ergebnis Phagen-Display-Selektion 1 mit einer 12mer Peptid-Bibliothek gegen Bio- L-A β_{1-42} als Target

Bio-L-A β_{1-42} wurde in HFIP gelöst und in DMSO und TBST auf eine Endkonzentration von 250 nM weiter verdünnt. Die Zugabe der Phagen-Peptid-Bibliothek erfolgte vor Immobilisierung der L-A β_{1-42} -Moleküle an Streptavidin-beschichtete Reaktionsgefäße. Nach vier Selektionsrunden wurden die Aminosäuresequenzen von präsentierten Peptiden von 21 Phagen determiniert. Die Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code angegeben. Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen im Ein-Buchstaben-Code. Die Farbeinteilung ist wie folgt: grün = saure Aminosäuren (D, E), dunkelblau = basische Aminosäuren (K, R), gelb = polare, ungeladene Aminosäuren (G, S, T, N, Q, C), blau = aliphatische, hydrophobe Aminosäuren (A, I, L, M, P, V) und rot = aromatische Aminosäuren (F, W, Y, H).

Für beide Selektionen wurde eine Berechnung von Anreicherungsfaktoren für die einzelnen Aminosäuren durchgeführt (siehe Kapitel 4.5.8.). Die berechneten Faktoren sind in Abbildung 5-7 dargestellt. Sämtliche selektierten Peptide wurden berücksichtigt. Der Anreicherungsfaktor für die einzelnen Aminosäuren gibt an, ob sich während der Selektionen für einzelne Aminosäuren Präferenzen ausbildeten. Zur Berechnung wurden die prozentualen Häufigkeiten der Aminosäuren vor und nach Selektion herangezogen. Ein Anreicherungsfaktor von 2 gibt an, dass sich die prozentuale Häufigkeit der Aminosäure während der Selektion verdoppelt hat. Mit dieser Auswertung konnte die Gesamtheit der selektierten Peptide nach Ausbildung von Präferenzen für einzelne Aminosäuren während der Selektion und nach Präferenzen für bestimmte chemische Eigenschaften unter die selektierten Aminosäuren betrachtet werden.

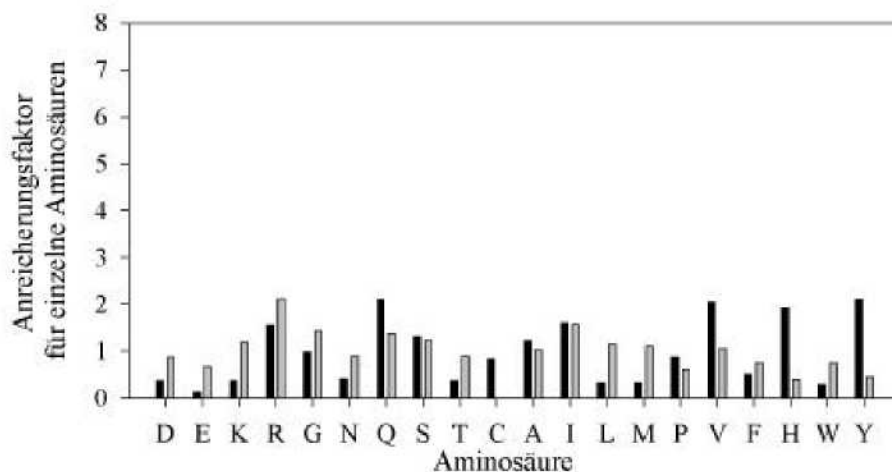


Abbildung 5-7: Anreicherungsfaktoren der einzelnen Aminosäuren - Selektion 1

Angegeben sind die Anreicherungsfaktoren für die einzelnen Aminosäuren der Selektion 1 gegen Bio-D-A β_{1-42} (schwarze Balken, 39 sequenzierte Klone) und gegen Bio-L-A β_{1-42} (graue Balken, 21 sequenzierte Klone). Die Berechnungen der Anreicherungsfaktoren erfolgten wie in Kapitel 4.5.8. beschrieben. Es wurden jeweils saure (D, E), basische (K, R), polare, ungeladene (G, S, T, N, Q, C), aliphatische, hydrophobe (A, I, L, M, V, P) und aromatische (F, H, Y, W) Aminosäuren gruppiert. Die Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code angegeben.

In den selektierten Peptiden aus Selektion 1 gegen Bio-D-A β_{1-42} als Target wurden Anreicherungsfaktoren für die einzelnen Aminosäuren kleiner 2,2 ermittelt. Es zeigte sich ein Anstieg der prozentualen Häufigkeit von Arginin, Glutamin, Serin, Alanin, Isoleucin, Valin, Histidin und Tyrosin. Diese Aminosäuren sind in der dominierenden Aminosäuresequenz (Q S H Y R H I S P A Q V, Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code) vertreten. Die prozentualen Häufigkeiten der anderen Aminosäuren wurden geringer oder blieben gleich.

Obwohl Prolin in der dominierenden Aminosäuresequenz vertreten ist, ist der Anreicherungsfaktor <1 . Dies lässt sich durch den hohen Wert der prozentualen Häufigkeit vor Selektion von 12,2 % erklären, d.h. das Prolin ist schon in der Ausgangsbibliothek überrepräsentiert. Die Häufigkeit der sauren Aminosäuren ging deutlich zurück. Obwohl nicht unter reduzierenden Bedingungen gearbeitet wurde, wurden Cysteine in den selektierten Peptiden gefunden. Cysteine haben das Potential, im oxidierten Zustand Disulfid-Brücken auszubilden. Durch die Ausbildung der Disulfid-Brücken ist eine Bindung des präsentierten Peptids an das Target unwahrscheinlich, weil es durch die Ausbildung der Disulfid-Brücken zur Bindung von 12mer Peptiden untereinander kommen und damit eine Bindung zum Target verhindert werden kann. Deshalb sind Cysteine in selektierten Peptiden meist unterrepräsentiert oder fehlen ganz.

In Selektion 1 gegen Bio-L-A β ₁₋₄₂ als Target wurde für die Aminosäure Arginin ein Anreicherungsfaktor von 2,2 ermittelt. Weiterhin wurden Anreicherungsfaktoren größer 1 bzw. gleich 1 für die Aminosäuren Lysin, Glycin, Glutamin, Serin, Alanin, Isoleucin, Leucin, Methionin und Valin ermittelt. Tendenziell kam es zu einem geringen Rückgang der sauren Aminosäure und einer Zunahme an basischen Aminosäuren. Die Anzahl der aromatischen Aminosäuren wurde geringer. Cysteine kamen in den selektierten Peptiden nicht vor.

5.3.2. Selektion 2

Für diese Selektion wurde Bio-D-A β ₁₋₄₂ bzw. Bio-L-A β ₁₋₄₂ in einer Konzentration von 2 mM in HFIP und nachfolgend in einer Konzentration von 250 μ M in HFIP verdünnt. Die Endkonzentration in TBST war 250 nM. Die Zugabe der Phagen-Peptid-Bibliothek erfolgte nach der Immobilisierung der Bio-A β ₁₋₄₂-Moleküle an die Streptavidin-beschichteten Reaktionsgefäße. Die Sequenzierung der DNA isolierter Phagen erfolgte nach drei Selektionsrunden. Durch die Verwendung von HFIP für die erste Verdünnung und die sofortige Immobilisierung der A β -Moleküle sollte die Aggregation von A β verhindert werden.

Die in Selektion 2 gegen Bio-D-A β ₁₋₄₂ als Target selektierten Peptide sind in Abbildung 5-8 zusammengestellt.



Abbildung 5-8: Ergebnis Spiegelbild-Phagen-Display-Selektion 2 mit einer 12mer Peptid-Bibliothek gegen biotinyliertes D- $\text{A}\beta_{1-42}$ als Target

Bio-D- $\text{A}\beta_{1-42}$ wurde in HFIP gelöst und in HFIP und TBST auf eine Endkonzentration von 250 nM weiter verdünnt. Eine Zugabe der Phagen-Peptid-Bibliothek erfolgte nach Immobilisierung der D- $\text{A}\beta_{1-42}$ -Moleküle an Streptavidin-beschichtete Reaktionsgefäße. Nach drei Selektionsrunden wurden die Aminosäuresequenzen von präsentierten Peptiden von 23 Phagen determiniert. Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen im Ein-Buchstaben-Code. Die Farbeinteilung ist wie folgt: grün = saure Aminosäuren (D, E), dunkelblau = basische Aminosäuren (K, R), gelb = polare, ungeladene Aminosäuren (G, S, T, N, Q, C), blau = aliphatische, hydrophobe Aminosäuren (A, I, L, M, P, V) und rot = aromatische Aminosäuren (F, W, Y, H).

Sieben Sequenzen wiesen Übereinstimmungen der Aminosäuren in den Positionen G X X W X X X X X X V X (Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code, X für variable Aminosäuren). Fünf der 23 Aminosäuresequenzen wiesen eine Übereinstimmung in allen 12 Aminosäuren mit der Sequenz **GISWQQSHHLVA** (Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code) auf.

Abbildung 5-9 zeigt die Ergebnisse der Selektion 2 gegen Bio-L- $\text{A}\beta_{1-42}$ als Target. Es wurden heterogene Sequenzen selektiert. Eine Konsensussequenz ist nicht zu erkennen.



Abbildung 5-9: Ergebnis Phagen-Display-Selektion 2 mit einer 12mer Peptid-Bibliothek gegen biotinyliertes L-A β ₁₋₄₂ als Target

Bio-L-A β ₁₋₄₂ wurde in HFIP gelöst und in HFIP und TBST auf eine Endkonzentration von 250 nM weiter verdünnt. Eine Zugabe der Phagen-Peptid-Bibliothek erfolgte nach Immobilisierung der L-A β ₁₋₄₂-Moleküle an Streptavidin-beschichtete Reaktionsgefäße. Nach 3 Selektionsrunden wurden die Aminosäuresequenzen von präsentierten Peptiden von 15 Phagen determiniert. Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen im Ein-Buchstaben-Code. Die Farbeinteilung ist wie folgt: grün = saure Aminosäuren (D, E), dunkelblau = basische Aminosäuren (K, R), gelb = polare, ungeladene Aminosäuren (G, S, T, N, Q, C), blau = aliphatische, hydrophobe Aminosäuren (A, I, L, M, P, V) und rot = aromatische Aminosäuren (F, W, Y, H).

Die errechneten Anreicherungsfaktoren für die einzelnen Aminosäuren sind in Abbildung 5-10 dargestellt.

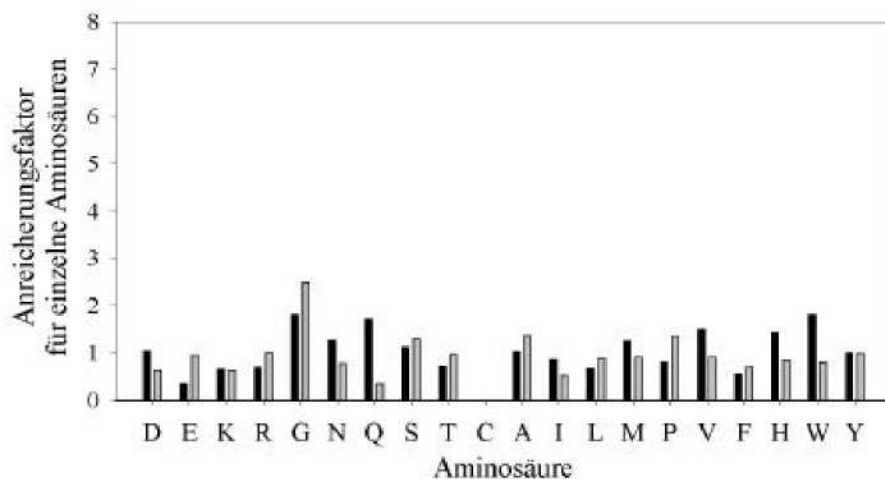


Abbildung 5-10: Anreicherungsfaktoren der einzelnen Aminosäuren - Selektion 2

Angegeben sind die Anreicherungsfaktoren für die einzelnen Aminosäuren der Selektion 2 gegen Bio-D-A β ₁₋₄₂ (schwarze Balken, 23 sequenzierte Klone) und gegen Bio-L-A β ₁₋₄₂ (graue Balken, 15 unabhängige Klone). Die Berechnung der Anreicherungsfaktoren erfolgte wie in Kapitel 4.5.8. beschrieben. Es wurden jeweils saure (D, E), basische (K, R), polare, ungeladene (G, S, T, N, Q, C), aliphatische, hydrophobe (A, I, L, M, V, P) und aromatische (F, H, Y, W) Aminosäuren gruppiert. Die Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code angegeben.

Für die Aminosäuren Asparaginsäure, Glycin, Asparagin, Glutamin, Serin, Alanin, Methionin, Valin, Histidin, Tryptophan und Tyrosin wurden für Selektion 2 gegen Bio-D-A β_{1-42} als Target Anreicherungsfaktoren größer 1 ermittelt. Die Aminosäuren Glycin, Glutamin, Valin, Histidin und Tryptophan sind in der dominierenden Aminosäuresequenz (G I S W Q Q S H H L V A, Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code) enthalten. Bei den Aminosäuren Glutaminsäure, Lysin, Arginin, Threonin, Isoleucin, Leucin, Prolin und Phenylalanin kam es zu einem Rückgang der prozentualen Häufigkeiten. Cysteine wurden in den selektierten Sequenzen nicht gefunden.

In den selektierten Peptiden aus Selektion 2 gegen Bio-L-A β_{1-42} als Target fiel ein Anstieg der prozentualen Häufigkeit von Glycin und ein Fehlen von Cysteinen auf. Die Anreicherungsfaktoren für die Aminosäuren Glutaminsäure, Arginin, Serin, Threonin, Alanin, Prolin und Tyrosin waren größer bzw. gleich 1. Die prozentualen Häufigkeiten der anderen Aminosäuren gingen zurück.

5.3.3. Selektion 3

Die Selektion wurde mit niedrigeren Konzentrationen? A β_{1-42} durchgeführt. Durch die verringerte A β_{1-42} -Konzentration sollte die Wahrscheinlichkeit für Monomere im Selektionsansatz erhöht werden. Zunächst wurde eine 20 μ M A β_{1-42} -Lösung in HFIP hergestellt. Diese wurde auf eine Endkonzentration von 2 nM A β_{1-42} in TBST weiter verdünnt. Es folgte eine Immobilisierung der Bio-A β_{1-42} -Moleküle an die Streptavidin-beschichteten Reaktionsgefäße. Nach sechs Selektionsrunden wurde die DNA vereinzelter Phagen isoliert und in die Aminosäuresequenz übersetzt (siehe Abbildung 5-11).

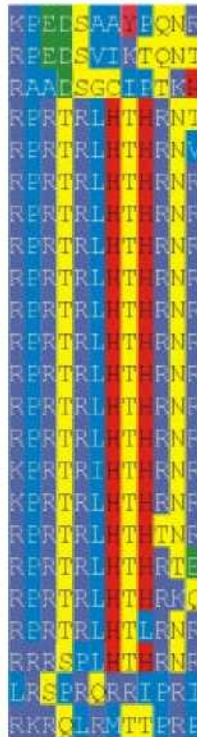


Abbildung 5-11: Ergebnis Spiegelbild-Phagen-Display-Selektion 3 mit einer 12mer Peptid-Bibliothek gegen biotinyliertes D-A β ₁₋₄₂ als Target

D-A β ₁₋₄₂ wurde in HFIP in einer Konzentration von 20 μ M gelöst und mit TBST auf eine Endkonzentration von 2 nM weiter verdünnt. Eine Zugabe der Phagen-Peptid-Bibliothek erfolgte nach Immobilisierung der D-A β ₁₋₄₂-Moleküle an Streptavidin-beschichtete Reaktionsgefäße. Nach 6 Selektionsrunden wurden die Aminosäuresequenzen von präsentierten Peptiden von 23 Phagen determiniert. Die Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code angegeben. Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen im Ein-Buchstaben-Code. Die Farbeinteilung ist wie folgt: grün = saure Aminosäuren (D, E), dunkelblau = basische Aminosäuren (K, R), gelb = polare, ungeladene Aminosäuren (G, S, T, N, Q, C), blau = aliphatische, hydrophobe Aminosäuren (A, I, L, M, P, V) und rot = aromatische Aminosäuren (F, W, Y, H).

Es ergab sich eine dominierende Aminosäuresequenz: **R P R T R L H T H R N R** (siehe Abbildung 5-11, alle Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code). Sie wurde in 9 der 23 sequenzierten Aminosäuresequenzen gefunden. Bemerkenswert ist das Auftreten von Arginin in den Positionen 1, 3, 5, 10 und 12.

Weiterhin stimmen neun der selektierten Peptide mit der dominierenden Aminosäuresequenz in mindestens neun Aminosäuren überein. 18 Aminosäuresequenzen sind untereinander ähnlich:

R/K P/R R T/S R/P L/I H T H/L R/T H/T/K R/T/V/E/Q

(unterstrichen sind die dominierenden Aminosäuren).

Die Selektion gegen Bio-L-A β_{1-42} resultierte ebenfalls in einer dominierenden Aminosäuresequenz, die sich von den selektierten Peptiden aus der Selektion gegen D-A β_{1-42} unterscheidet (Abbildung 5-12). Sie lautet:

L R M M L Q I K R I P R



Abbildung 5-12: Ergebnis Phagen-Display-Selektion 3 mit einer 12mer Peptid-Bibliothek gegen biotinyliertes L-A β_{1-42} als Target

L-A β_{1-42} wurde in HFIP in einer Konzentration von 20 μ M gelöst und mit TBST auf eine Endkonzentration von 2 nM weiter verdünnt. Eine Zugabe der Phagen-Peptid-Bibliothek erfolgte nach Immobilisierung der L-A β_{1-42} -Moleküle an Streptavidin-beschichtete Reaktionsgefäße. Die Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code angegeben. Nach 6 Selektionsrunden wurden die Aminosäuresequenzen von präsentierten Peptiden von 9 Phagen determiniert. Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen im Ein-Buchstaben-Code. Die Farbeinteilung ist wie folgt: grün = saure Aminosäuren (D, E), dunkelblau = basische Aminosäuren (K, R), gelb = polare, ungeladene Aminosäuren (G, S, T, N, Q, C), blau = aliphatische, hydrophobe Aminosäuren (A, I, L, M, P, V) und rot = aromatische Aminosäuren (F, W, Y, H).

Sowohl die selektierten Peptide aus der Selektion gegen das D-Target als auch die selektierten Peptide aus der Selektion gegen das L-Target wiesen untereinander eine hohen Grad an Übereinstimmungen auf. Grund für die Übereinstimmungen kann die Durchführung von 6 Selektionsrunden sein. Mit jeder Selektionsrunde steigt die Anreicherung von Target-bindenden Phagen.

Die berechneten Anreicherungsfaktoren für die einzelnen Aminosäuren für diese Selektionen sind in Abbildung 5-13 zusammengefasst.

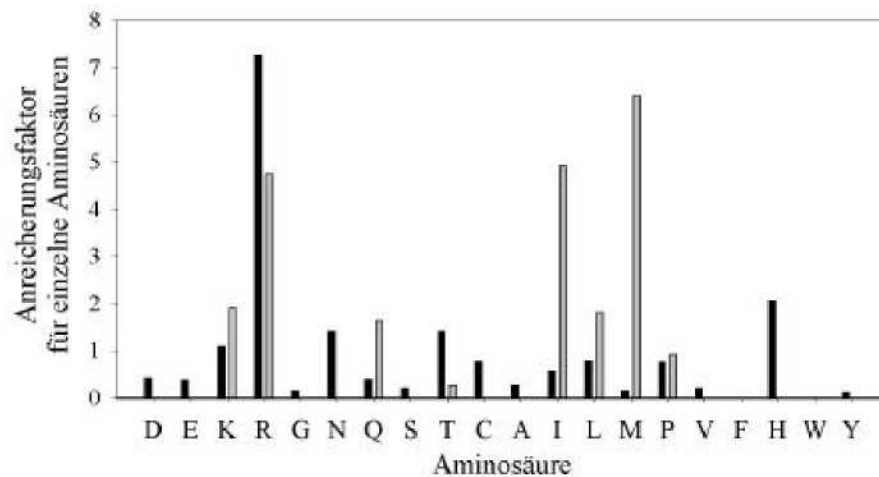


Abbildung 5-13: Anreicherungsfaktoren der einzelnen Aminosäuren - Selektion 3

Angegeben sind die Anreicherungsfaktoren für die einzelnen Aminosäuren der Selektion 3 gegen Bio-D-Aβ₁₋₄₂ (schwarze Balken, 23 sequenzierte Klone) und gegen Bio-L-Aβ₁₋₄₂ (graue Balken, 9 sequenzierte Klone). Alle selektierten Peptide wurden berücksichtigt. Die Berechnung der Anreicherungsfaktoren erfolgte wie in Kapitel 4.5.8. beschrieben. Es wurden jeweils saure (D, E), basische (K, R), polare, ungeladene (G, S, T, N, Q, C), aliphatische, hydrophobe (A, I, L, M, V, P) und aromatische (F, H, Y, W) Aminosäuren gruppiert. Die Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code angegeben.

In den selektierten Peptiden aus der Selektion 3 gegen Bio-D-Aβ₁₋₄₂ war eine Präferenz für Arginin zu erkennen. Dies ist nicht nur durch das fünffache Auftreten von Arginin in der dominierenden Aminosäuresequenz zu erklären. Auch in den anderen Peptiden kam Arginin häufig vor. Bei einigen Peptiden zeigte sich ein Austausch des Arginin in der ersten Position gegen die ebenfalls basische Aminosäure Lysin. Anreicherungsfaktoren größer 1 wurden ebenfalls für die Aminosäuren Asparagin, Threonin und Histidin berechnet. Diese Aminosäuren sind in der dominierenden Aminosäuresequenz enthalten. Die Aminosäuren Prolin und Leucin sind ebenfalls in der dominierenden Aminosäuresequenz enthalten und kommen auch in den anderen selektierten Peptiden vor. Trotz des häufigen Auftretens dieser Aminosäuren wurden Anreicherungsfaktoren kleiner 1 berechnet, weil die prozentualen Häufigkeiten der beiden Aminosäuren vor Selektion bei 9,3 % und 12,2 % betrugen. Sie sind schon in der Ausgangsbibliothek überrepräsentiert. Weiterhin traten sporadisch die Aminosäuren Glutaminsäure, Asparaginsäure, Glycin, Glutamin, Serin, Cystein, Alanin, Isoleucin, Methionin, Valin und Tyrosin auf.

In den selektierten Peptiden aus der Selektion 3 gegen Bio-L-A β ₁₋₄₂ fanden sich nur die Aminosäuren Lysin, Arginin, Glutamin, Threonin, Isoleucin, Leucin, Methionin und Prolin (siehe auch Kapitel 5.3.5.).

5.3.4. Übersicht der vier selektierten, dominierenden Peptide

Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit drei verschiedene Selektionsprozeduren (Selektion 1 bis 3) mit Bio-D-A β ₁₋₄₂ bzw. Bio-L-A β ₁₋₄₂ als Target durchgeführt. Dabei ergaben sich vier verschiedene dominierende Aminosäuresequenzen. Drei Aminosäuresequenzen resultierten aus den Spiegelbild-Phagen-Display-Selektionen (Selektion 1 bis 3) gegen das D-Target. Die D-Enantiomere der selektierten Peptide mit den entsprechenden Aminosäuresequenzen werden im Folgenden als D-Pep1, D-Pep2 bzw. D-Pep3 bezeichnet. Die Nummer steht für die jeweilige Selektion. Das Peptid mit der dominierenden Aminosäuresequenz aus Selektion 3 gegen das L-Target wird im Folgenden als L-Pep3 bezeichnet. Aminosäuren der Peptide aus den einzelnen Selektionen wurden zusammengestellt und nach ihren chemischen Eigenschaften gruppiert (siehe Abbildung 5-14). Zusätzlich wurde die Aminosäureverteilung im Target A β ₁₋₄₂ dargestellt. Dadurch soll ein Vergleich der selektierten Peptide und eine Gegenüberstellung mit dem Target A β ₁₋₄₂ erleichtert werden.

A β ₁₋₄₂ beinhaltet Sequenzbereiche mit hohen Anteilen an hydrophoben Aminosäuren. Neben 16 hydrophoben, aliphatischen Aminosäuren kommen verschiedene aromatische Aminosäuren vor. Vier der sechs sauren Aminosäuren befinden sich im vorderen Sequenzbereich.

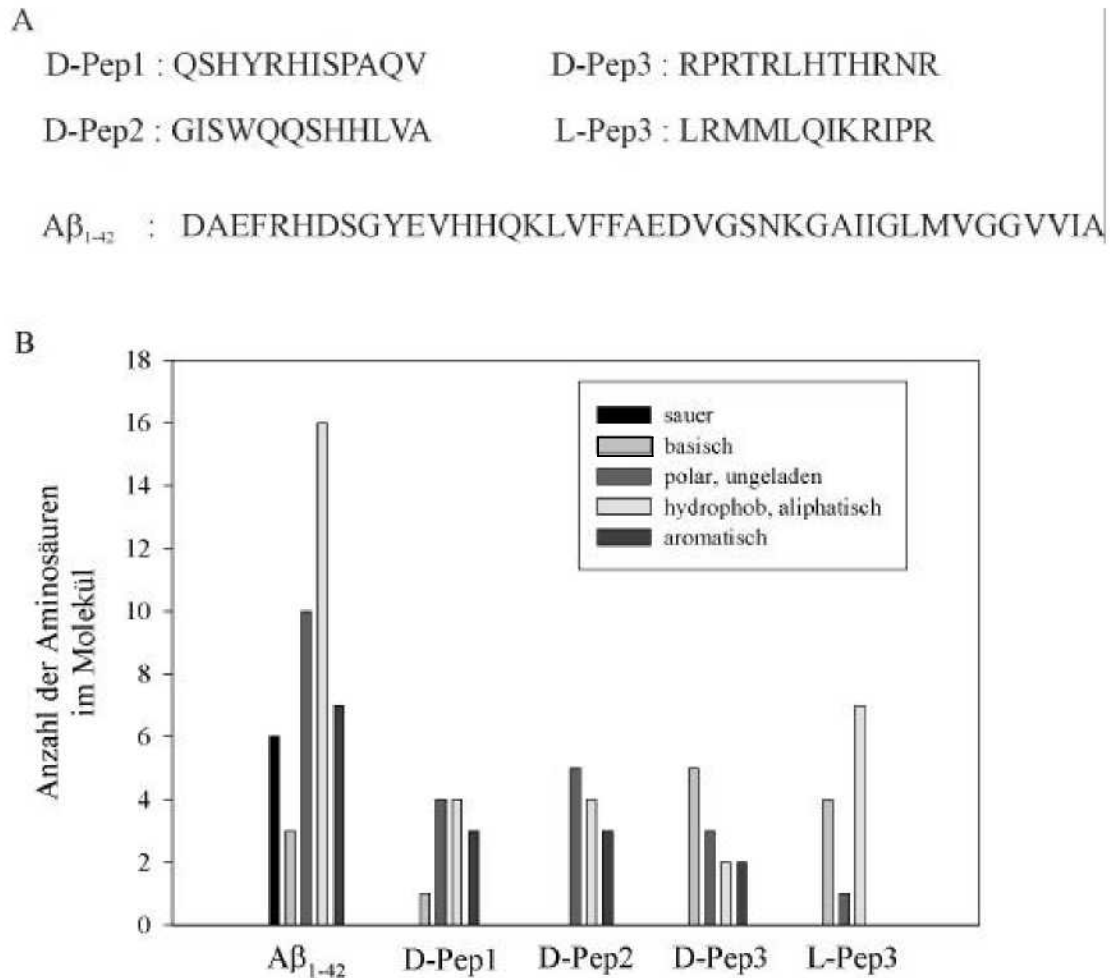


Abbildung 5-14: Aminosäuresequenzen (A) und Übersicht über chemischen Eigenschaften der Aminosäuren (B) in $A\beta_{1-42}$ und den dominierenden Aminosäuresequenzen der verschiedenen Selektionen

Die selektierten Peptide aus Spiegelbild-Phagen-Display-Selektionen sind als D-Pep und die selektierten Peptide aus Phagen-Display-Selektionen als L-Pep aufgeführt. Die Nummer gibt die Selektionsnummer (Selektion 1, 2 oder 3) an. Die Aminosäuren wurden nach ihren chemischen Eigenschaften zusammengefasst. Es wurden jeweils saure (D, E), basische (K, R), polare, ungeladene (G, S, T, N, Q, C), aliphatische, hydrophobe (A, I, L, M, V, P) und aromatische (F, H, Y, W) Aminosäuren zusammengefasst.

Bezogen auf die chemischen Eigenschaften der Aminosäuren sind sich D-Pep1 und D-Pep2 relativ ähnlich. Beide bestehen überwiegend aus polar-ungeladenen, hydrophob-aliphatischen und aromatischen Aminosäuren. Beide Peptide weisen zwei Glutamin-Reste, zwei Histidin-Reste, zwei Serin-Reste, einen Alanin-Rest, einen Isoleucin-Rest, einen Valin-Rest und eine weitere aromatische Aminosäure (Tryptophan bzw. Tyrosin) auf. Diese aromatische Aminosäure ist jeweils auf Position 4 im Peptid (siehe dazu auch Abbildung 5-14).

Die chemischen Eigenschaften der Aminosäuren in D-Pep3 und L-Pep3 unterscheiden sich von denen in D-Pep 1 und D-Pep2. Sie weisen einen hohen Anteil an basischen Aminosäuren

auf. Das L-Pep3 ist das einzige Peptid, welches mehr hydrophobe als hydrophile Aminosäuren beinhaltet. Aromatische Aminosäuren fehlen in diesem Peptid.

Für die Peptide wurden Sekundärstrukturvorhersagen mit PHD-NETWORK (Rost und Sander, 1993) durchgeführt. Sekundärstrukturvorhersagen mit diesem Programm sind nur für Peptide = 17 Aminosäuren möglich. Deshalb wurde die jeweilige Aminosäuresequenz um den Glycin-Linker und die ersten Aminosäuren der gp3-Sequenz des Bakteriophagen M13 erweitert, weil dieser Phage als Vektor für die 12mer-Peptid-Bibliothek verwendet wurde. Das Ergebnis der Sekundärstrukturvorsagen ist in Abbildung 5-15 zusammengefasst.

D-Pep1	Q S <u>H Y R H I</u> S P A Q V
D-Pep2	G I S <u>W Q Q S H H L</u> V A
D-Pep3	R P R <u>T R L</u> H T H R H R

Abbildung 5-15: Aufstellung der dominierende Aminosäuresequenzen aus den drei Selektionen gegen Bio-D- $\text{A}\beta_{1-42}$ und Sekundärstrukturvorhersagen für die selektierten Peptide mit PHD NETWORK (Rost und Sander, 1993)

Für die unterstrichenen Bereiche wurde eine β -Faltblatt-Konformation vorhergesagt.

Alle selektierten D-Peptide weisen in der Sekundärstrukturvorhersage eine Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung eines β -Faltblatts auf. Eine Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung einer α -Helix wurde nicht gefunden. Eine Überprüfung der Sekundärstrukturvorhersagen anhand von CD-Messungen wurde noch nicht durchgeführt, ist aber geplant.

5.4. Fibrillenbildung in Dimethylsulfoxid (DMSO)

Zur Untersuchung, in welcher Form Bio-A β ₁₋₄₂ während der Selektion 1 vorkommt, wurde eine 2,5 mM Bio-L-A β ₁₋₄₂-Lösung in HFIP hergestellt und auf eine Konzentration von 250 μ M in DMSO weiter verdünnt.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten eine Bildung von Fibrillen in DMSO (siehe Abbildung 5-16). Es wurden 2 verschiedene Formen von A β -Fibrillen gefunden. Neben den Fibrillen, wie sie schon unter 5.1.3. nachgewiesen wurden, traten unter diesen Versuchsbedingungen auch kürzere Filamente mit geringerem Durchmesser auf. Solche Filamente wurden bereits u.a. von Harper *et al.* und Walsh *et al.* beschrieben (Harper *et al.*, 1997; Walsh *et al.*, 1997; Walsh *et al.*, 1999). Da D- und L-Enantiomer mit Ausnahme der optischen Aktivität die gleichen physikalischen Eigenschaften aufweisen (siehe Kapitel 5.1.) (Cribbs *et al.*, 1997), wurde dieses Experiment nur mit L-Bio-A β ₁₋₄₂ durchgeführt.

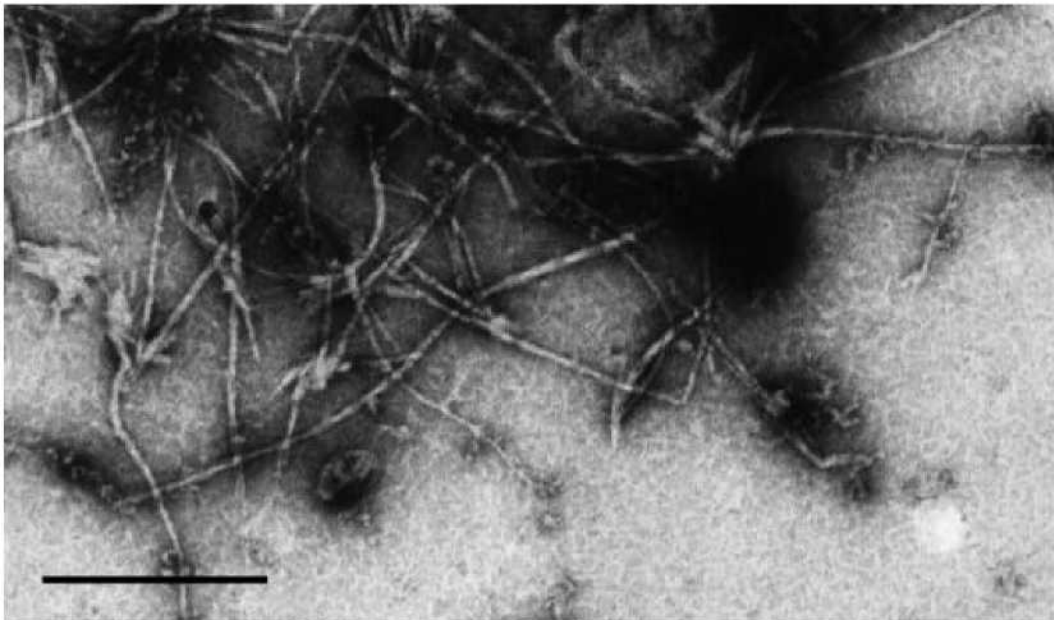


Abbildung 5-16: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Bio-L-A β ₁₋₄₂, Vorbereitung der A β -Lösung wie bei Selektion 1

Das Bio-L-A β ₁₋₄₂ wurde in einer Konzentration von 2,5 mM in HFIP gelöst und in DMSO auf eine Konzentration von 250 μ M weiter verdünnt. Der Balken entspricht einer Länge von 400 nm

5.5. Untersuchung der Bindung zwischen dem D-Enantiomer eines selektierten Peptids und synthetischem L-A β ₁₋₄₂

5.5.1. Fluoreszenz-Spektroskopie-Titrations-Experimente

Das Prinzip des Spiegelbild-Phagen-Display-Verfahrens mit Peptiden als Target beruht darauf, dass die Bindung eines selektierten L-Peptids zum D-Enantiomer des Targets das Spiegelbild zur Bindung zwischen dem D-Enantiomer des selektierten Peptids zum L-Enantiomer des Targets (siehe Kapitel 2.2.4.) ist. Zur Überprüfung dieses Prinzips im vorliegenden Fall und für eine Abschätzung der Dissoziations-Gleichgewichts-Konstanten (K_D -Wert) wurden Fluoreszenztitrations durchgeföhrt.

Das in Selektion 1 selektierte 12mer Peptid mit der Sequenz Q S H Y R H I S P A Q V (Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code) wurde als D-Enantiomer synthetisiert und am C-Terminus mit einem Fluorescein-Marker versehen. Das Fluorescein-markierte D-Peptid (Fluo-D-Pep1) wurde in einer Konzentration von 0,8 μ M in PBS, pH 7,5 mit 1 mM SDS vorgelegt. L-A β ₁₋₄₂ wurde in HFIP gelöst und hinzutitriert. Es zeigte sich ein Anstieg der Fluoreszenz mit zunehmender Konzentration an L-A β ₁₋₄₂ (siehe Abbildung 5-17).

Zur Kontrolle wurde statt Fluo-D-Pep1 Fluorescein in gleicher Konzentration vorgelegt und wie vorher A β in HFIP hinzutitriert. Dabei wurde kein Einfluss auf das Fluoreszenzsignal beobachtet (siehe Abbildung 5-17). Im einem weiteren Kontroll-Titrationsexperiment, in dem ein willkürlich ausgesuchtes, Fluorescein-markiertes 12mer-L-Peptid anstelle von Fluo-D-Pep1 eingesetzt wurde, zeigte sich keine Änderung des Fluoreszenzsignals (Ergebnisse nicht aufgeföhrt). Vorversuche mit TBST (Lösungsbedingungen für A β wie in Selektion) und PBS als Lösungsmittel für Fluo-D-Pep1 führten zu einer Trübung der Lösung durch Aggregation des hinzutitrierten A β . Dadurch kam es zur Streuung der emittierten Fluoreszenz, was die Detektion eines reproduzierbaren Fluoreszenzsignals verhinderte (Ergebnisse nicht aufgeföhrt). Erst bei Lösung von Fluo-D-Pep1 in PBS mit 1 mM SDS konnten reproduzierbare Fluoreszenz-Titrationsmessungen durchgeföhrt werden.

5.5.2. Abschätzung der Dissoziations-Gleichgewichts-Konstanten (K_D)

Die Affinität der Bindung zwischen dem selektierten D-Pep1 und $L-A\beta_{1-42}$ lässt sich durch Ermittlung der Dissoziations-Gleichgewichts-Konstante beschreiben (siehe Gleichung 5-1):

$$K_D = \frac{[L - A\beta_{1-42}][D - Pep1]}{[L - A\beta_{1-42}D - Pep1]} \quad (\text{Gleichung 5-1})$$

Dabei steht $[L - A\beta_{1-42}]$ für die Konzentration an freien $A\beta_{1-42}$, $[D - Pep1]$ für die Konzentration des freien D-Pep1 und $[A\beta_{1-42}D - Pep1]$ für die Konzentration des Komplexes aus beiden Bindungspartnern.

Die Abschätzung des K_D -Werts erfolgte zunächst unter Voraussetzung einer bimolekularen Reaktion zwischen $L - A\beta_{1-42}$ ($n=1$) und D-Pep1 durch nicht-lineare Regression mittels folgender Formel (siehe Gleichung 5-2):

$$F = F_{\min} + \left(\frac{[L - A\beta_{1-42}] + n * [D - Pep1] + K_D}{2} - \sqrt{\frac{([L - A\beta_{1-42}] + n * [D - Pep1] + K_D)^2}{4} - n * [L - A\beta_{1-42}] * [D - Pep1]} \right) * \frac{(F_{\max} - F_{\min})}{n * [D - Pep1]}$$

(Gleichung 5-2)

Mit	$F_{\min}$	=	Fluoreszenzsignal zur Zeit $t = 0$
	$F_{\max}$	=	maximales Fluoreszenzsignal, Sättigungswert
	n	=	Anzahl der gebundenen $A\beta$ -Moleküle pro D-Pep1-Molekül
	K_D	=	Dissoziations-Gleichgewichts-Konstante
	$[L - A\beta_{1-42}]$	=	Gesamtkonzentration an $L - A\beta_{1-42}$
	$[D - Pep1]$	=	Gesamtkonzentration an D-Pep1

Dabei wurden $F_{\min}$, $F_{\max}$ und der K_D -Wert als Optimierungsparameter berücksichtigt. Es wurde ein K_D -Wert von 4,2 μM ermittelt. Die Ausgleichkurve der nicht-linearen Regression ist in Abbildung 5-17 dargestellt (durchgezogene Linie).

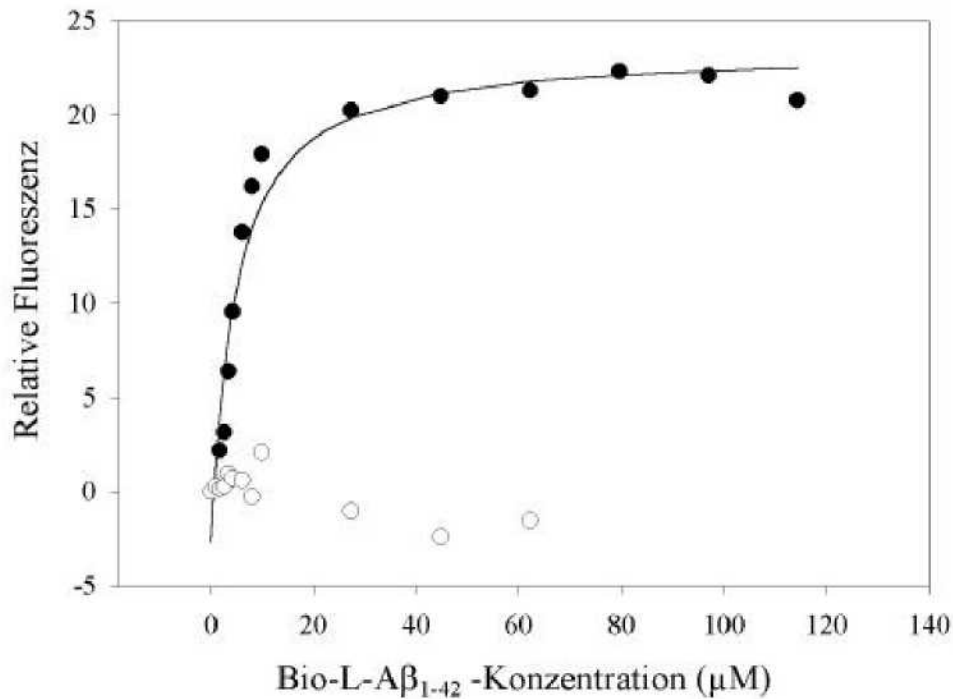


Abbildung 5-17: Bindung von Fluo-D-Pep1 an Bio-L-Aβ₁₋₄₂, Voraussetzung einer bimolekularen Reaktion

Fluo-D-Pep1 wurde in einer Konzentration von 0,8 μM in PBS, pH 7,5 mit 1 mM SDS vorgelegt und Bio-L-Aβ₁₋₄₂ in HFIP gelöst und in steigenden Konzentrationen hinzutitriert (Messung 1). Weiterhin wurde D-Pep1 vorgelegt und HFIP ohne Aβ in gleichen Volumina hinzutitriert (Messung 2). Die aufgeführten Werte resultierten aus der Differenz der Fluoreszenzwerte für beide Messungen (relative Fluoreszenz = Messung 1 – Messung 2) (●). Als Kontrolle wurde unter gleichen Versuchsbedingungen anstelle des Fluorescein-markierten D-Peptids I 0,8 mM Fluorescein vorgelegt (○). Die durchgezogene Linie gibt die Ergebnisse der nicht-linearen Regression mit Voraussetzung einer bimolekularen Reaktion ($n=1$) an (siehe Text).

Wie aus Abbildung 5-17 deutlich wird, beschreibt die Ausgleichskurve der nicht-linearen Regression die gemessenen Fluoreszenzwerte nicht optimal. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei der Reaktion zwischen D-Pep1 und L-Aβ₁₋₄₂ nicht um eine bimolekulare Reaktion handelt. Deshalb wurde der Parameter n als weiterer Optimierungsparameter in die nicht-lineare Regression aufgenommen, d.h. die Voraussetzung der bimolekularen Reaktion wurde aufgehoben (siehe Abbildung 5-18). Die durchgeführte nicht-lineare Regression ergab die Werte $K_D = 0,4 \mu\text{M}$ und $n \approx 11$.

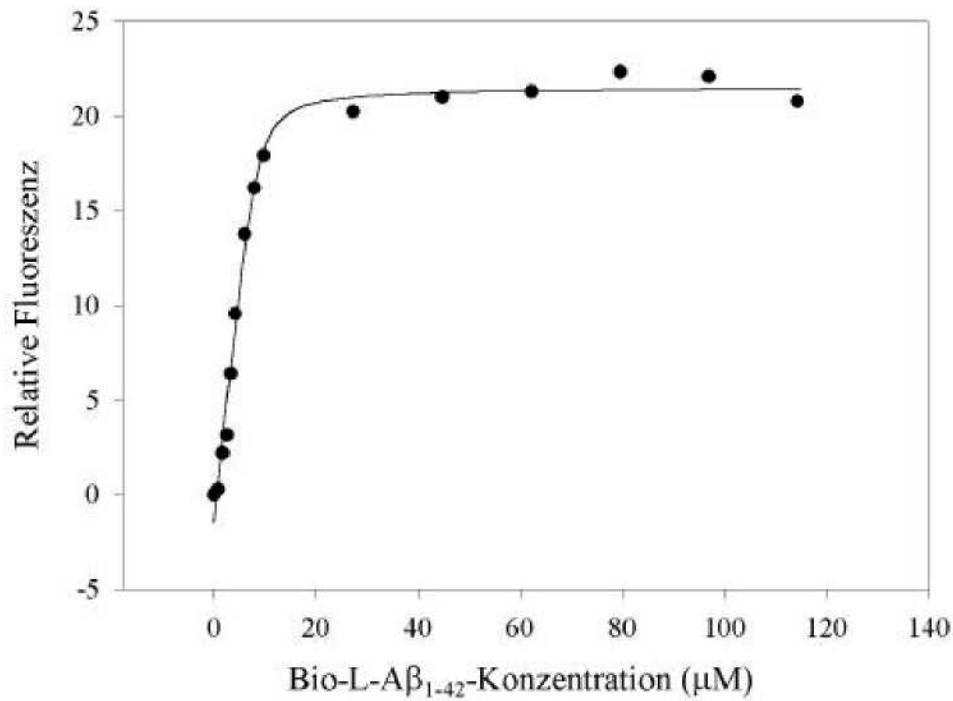


Abbildung 5-18: Bindung von Fluo-D-Pep1 an Bio-L-Aβ₁₋₄₂

Fluo-D-Pep1 wurde in einer Konzentration von 0,8 μM in PBS, pH 7,5 mit 1 mM SDS vorgelegt und Bio-L-Aβ₁₋₄₂ in HFIP gelöst und in steigenden Konzentrationen hinzutitriert (Messung 1). Weiterhin wurde D-Pep1 vorgelegt und HFIP ohne Aβ in gleichen Volumina hinzutitriert (Messung 2). Die aufgeführten Werte resultierten aus der Differenz der Fluoreszenzwerte für beide Messungen (relative Fluoreszenz= Messung1 – Messung2) (•). Die durchgezogene Linie gibt die Ergebnisse der nicht-linearen Regression mit n als zusätzlichen Optimierungsparameter an (siehe Text).

5.6. Histologische Färbungen mit dem selektierten D-Peptid

5.6.1. Prinzip der Färbungen

Durch die Fluoreszenz-Spektroskopie-Titrationsen konnte nachgewiesen werden, dass das selektierte Fluo-D-Pep1 an synthetisches Bio-L-A β ₁₋₄₂ bindet (siehe Kapitel 5.5.). Durch die nachfolgend beschriebenen Experimente sollte untersucht werden, ob Fluo-D-Pep1 auch an natürliches A β in Plaques in Gehirnen von Alzheimer-Patienten bindet. Dafür wurden histologische Färbungen an formalin-fixierten/paraffin-eingebetteten Gewebeschnitten aus dem Gehirn einer ehemaligen Alzheimer-Patientin durchgeführt.

Die Experimente wurden nach dem Prinzip durchgeführt, dass die Gewebeschnitte zum einen mit Fluo-D-Pep1 und zum anderen mit einem Antikörpersystem bestehend aus einem Anti-A β ₁₋₁₆-Antikörper (Maus-Anti-Amyloid-Beta 1-16, monoklonaler Antikörper) und einem Cy3-markierten, sekundären Antikörper (Schaf-Anti-Maus-IgG, ganzes Molekül) inkubiert wurden. Dieses Antikörpersystem wird im Folgenden als Cy3-Anti-A β ₁₋₁₆ bezeichnet. Wenn Fluo-D-Pep1 an natürliches A β bindet, müssen mit beiden Farbstoffen die gleichen Strukturen angefärbt werden.

5.6.2. Histologische Färbungen an Gewebeschnitten einer Alzheimer-Patientin – Färbung von A β -Plaques

Durch Experimente nach dem Schema: “Entparaffinieren der Gewebeschnitte, Behandlung der Gewebeschnitte mit einer alkalischen NaCl-Lösung (Puchtler und Sweat, 1965), gleichzeitige Inkubation der Gewebeschnitte mit Fluo-D-Pep1 und Cy3-Anti-A β ₁₋₁₆ und Betrachtung der Gewebeschnitte (siehe Kapitel 4.10.2.) mit einem Fluorescein- und einem Cy3-Fluoreszenz-Filterset“ wurde eine Markierung von Alzheimer-Plaques mit Cy3-Anti-A β ₁₋₁₆ und Fluo-D-Pep1 nachgewiesen (siehe Abbildung 5-19). Die alkalische NaCl-Lösung war Bestandteil des „Accustain[®] amyloid stain, Congo red-Kit“ von Sigma und besteht aus 80 % Ethanol gesättigt mit NaCl und zugefügtem NaOH.

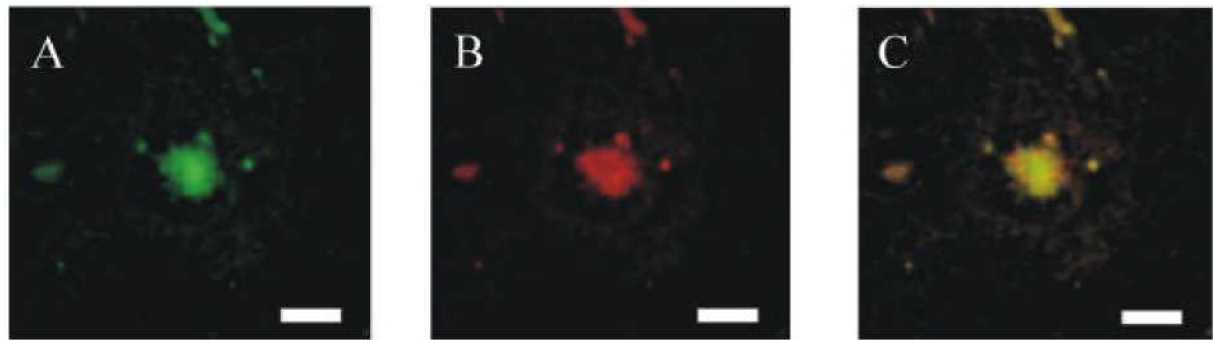


Abbildung 5-19: Färbung von A β -Ablagerungen in Form von Plaques in Gewebeschnitten aus dem Gehirn einer ehemaligen Alzheimer-Patientin mit Fluo-D-Pep1 und Cy3-Anti-A β ₁₋₁₆, Vorbehandlung der entparaffinierten Gewebeschnitte mit alkalischer NaCl-Lösung

Die Gehirngewebeschnitte wurden entparaffiniert, in einer alkalischen NaCl-Lösung inkubiert, mit PBS gewaschen und mit Fluo-D-Pep1 und Cy3-Anti-A β ₁₋₁₆ inkubiert (siehe Kapitel 4.10.2.). Bild A wurde mit einem Fluorescein-Fluoreszenz-Filterset aufgenommen, Bild B mit einem Cy3-Fluoreszenz-Filterset. Bild C zeigt eine Überlagerung von Bild A und Bild B. Neben dem gefärbten Plaque sind Autofluoreszenzen durch Lipofuchsin-Ablagerungen zu erkennen. Der Balken entspricht einer Länge von 20 μ m.

Bei sämtlichen Gehirngewebeschnitten wurde eine Autofluoreszenz beobachtet. Diese Autofluoreszenz ist vermutlich auf Lipofuscin zurückzuführen, welches sich in den Zellen ablagert (Schnell *et al.*, 1999).

Als weitere Kontrollen wurden parallel zur aufgeführten Doppelfärbung mit Fluo-D-Pep1 und Cy3-Anti-A β ₁₋₁₆ Einzelfärbungen mit den beiden Markern durchgeführt und die gefärbten Gewebeschnitte sowohl durch den Fluorescein-Fluoreszenz-Filterset als auch durch den Cy3-Fluoreszenz-Filterset betrachtet. Dies sollte sicherstellen, dass die beobachteten Signale nicht auf ein „Durchbluten“ der Farbstoffe zurückzuführen waren. Mit „Durchbluten“ ist gemeint, dass das Fluoreszenzsignal eines Farbstoffs so stark ist, dass fälschlicherweise Signale mit dem jeweils anderen Filterset beobachtet werden. Ein solches „Durchbluten“ wurde nicht oder nur in einem geringen Maß beobachtet (siehe Abbildung 5-20 und 5-21).

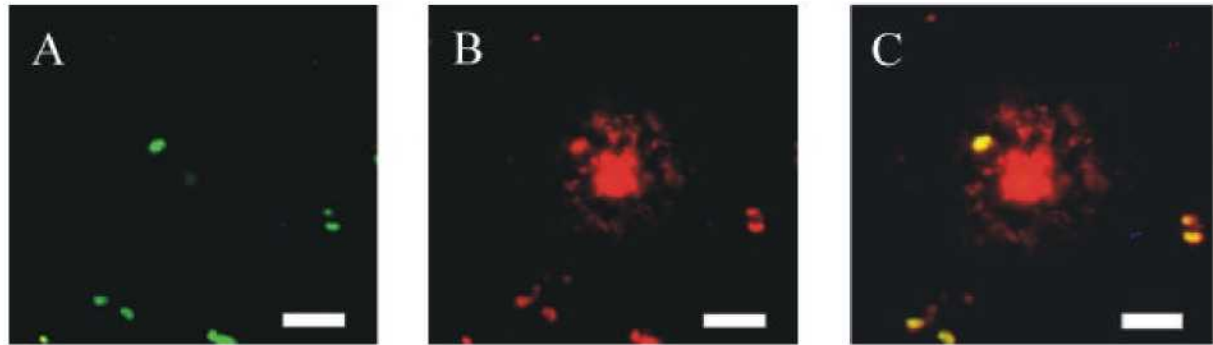


Abbildung 5-20: Färbung von A β -Ablagerungen in Form von Plaques in Gewebeschnitten aus dem Gehirn einer ehemaligen Alzheimer-Patientin mit Cy3-Anti-A β_{1-16} , Vorbehandlung der entparaffinierten Gewebeschnitte mit alkalischer NaCl-Lösung

Die Gehirngewebeschnitte wurden entparaffiniert, in einer alkalischen NaCl-Lösung inkubiert, mit PBS gewaschen und Cy3-Anti-A β_{1-16} inkubiert (siehe Kapitel 4.10.2.). Bild A wurde mit einem Fluorescein-Fluoreszenz-Filterset aufgenommen, Bild B mit einem Cy3-Fluoreszenz-Filterset. Bild C zeigt eine Überlagerung von Bild A und Bild B. Neben dem gefärbten Plaque sind Autofluoreszenzen durch Lipofuchsin-Ablagerungen zu erkennen. Der Balken entspricht einer Länge von 20 μ m.

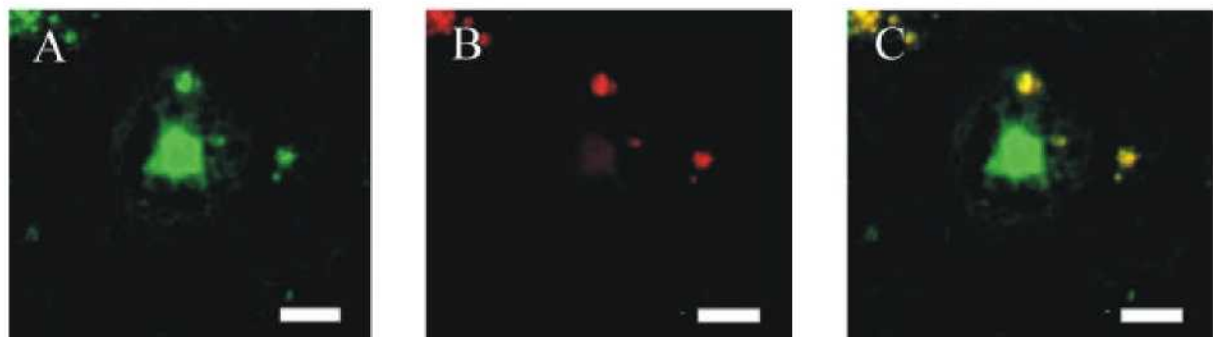


Abbildung 5-21: Färbung von A β -Ablagerungen in Form von Plaques in Gewebeschnitten aus dem Gehirn einer ehemaligen Alzheimer-Patientin mit Fluo-D-Pep1, Vorbehandlung der entparaffinierten Gewebeschnitte mit alkalischer NaCl-Lösung

Die Gehirngewebeschnitte wurden entparaffiniert, in einer alkalischen NaCl-Lösung inkubiert, mit PBS gewaschen und mit Fluo-D-Pep1 inkubiert (siehe Kapitel 4.10.2.). Bild A wurde mit einem Fluorescein-Fluoreszenz-Filterset aufgenommen, Bild B mit einem Cy3-Fluoreszenz-Filterset. Bild C zeigt eine Überlagerung von Bild A und Bild B. Neben dem gefärbten Plaque sind Autofluoreszenzen durch Lipofuchsin-Ablagerungen zu erkennen. Der Balken entspricht einer Länge von 20 μ m.

Beim Mikroskopieren wurde die Beobachtung gemacht, dass die Fluoreszenzsignale der Einzelfärbungen intensiver waren als die Signale bei Doppelfärbungen mit beiden Markern.

Parallel zur aufgeführten Behandlungsmethode der Gewebeschnitte mit einer alkalischen NaCl-Lösung wurden weitere Vorbehandlungsmethoden erprobt, um die Färbung zu verbessern. Durch Experimente ohne Vorbehandlung der entparaffinierten Gewebeschnitte konnten keine Plaques mit Cy3-Anti-A β_{1-16} und D-Pep1 angefärbt werden.

Eine intensive Markierung der Alzheimer-Plaques durch Cy3-Anti-A β_{1-16} wurde nach einer Behandlung der Gewebeschnitte mit Ameisensäure (siehe Kapitel 4.10.2.) beobachtet. Eine solche Vorbehandlung wird vom Hersteller (Chemicon, Hofheim) des Anti-A β_{1-16} -Antikörpers empfohlen. Es wurden Plaques mit und ohne Hof (siehe Kapitel 2.1.4.) angefärbt. Abbildung 5-22 zeigt ein Beispiel für eine solche Färbung. Hier wurde mit Cy3-Anti-A β_{1-16} der „Kern“- und der „Hof“-Bereich des Plaques gefärbt. Eine Färbung durch Fluo-D-Pep1 wurde nicht beobachtet (siehe Abbildung 5-22).

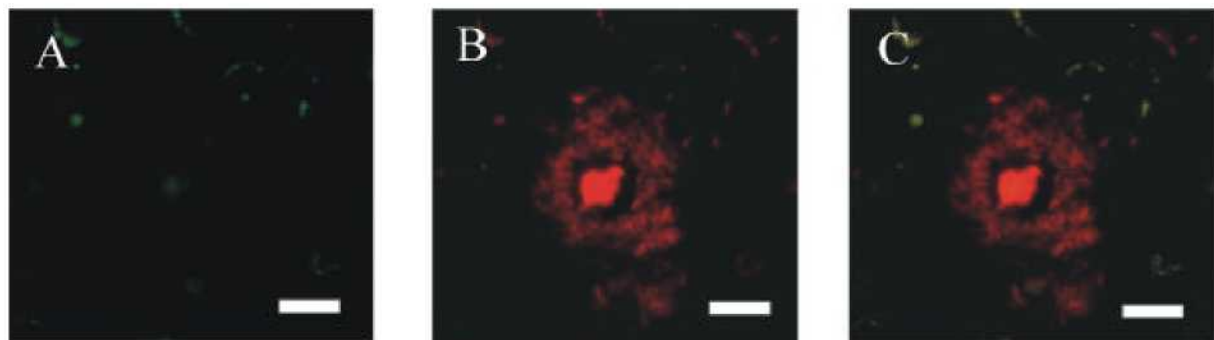


Abbildung 5-22: Färbung von A β -Ablagerungen in Form von Plaques in Gewebeschnitten aus dem Gehirn einer ehemaligen Alzheimer-Patientin mit Fluo-D-Pep1 und Cy3-Anti-A β_{1-16} , Vorbehandlung der entparaffinierten Gewebeschnitte mit Ameisensäure

Die Gehirngewebeschnitte wurden entparaffiniert, mit Ameisensäure 2 min inkubiert, mit PBS gewaschen und mit Fluo-D-Pep1 und Cy3-Anti-A β_{1-16} inkubiert (siehe Kapitel 4.10.2.). Bild A wurde mit einem Fluorescein-Fluoreszenz-Filterset aufgenommen, Bild B mit einem Cy3-Fluoreszenz-Filterset. Bild C zeigt eine Übereinlagerung von Bild A und Bild B. Neben dem gefärbten Plaque sind Autofluoreszenzen durch Lipofuchsin-Ablagerungen zu erkennen. Der Balken entspricht einer Länge von 20 μ m.

Die vorangegangenen Ergebnisse zeigten, dass durch eine Vorbehandlung mit Ameisensäure zwar eine Färbung der Plaques mit Cy3-Anti-A β_{1-16} möglich war, aber die Färbung durch Fluo-D-Pep1 gestört wurde. Durch die Vorbehandlung der Gewebeschnitte mit einer alkalischen NaCl-Lösung nach Puchtler (Puchtler und Sweat, 1965) konnte zwar eine Färbung der Plaques mit Fluo-D-Pep1 beobachtet werden, jedoch war die Färbung der Plaques mit Cy3-Anti-A β_{1-16} weniger intensiv als bei Vorbehandlung mit Ameisensäure. Durch beide Marker wurden die „Kern“-Bereiche der Plaques gefärbt. Eine Anfärbung der „Hof“-Bereiche der Plaques war schwach oder gar nicht zu erkennen. Zum Nachweis, dass trotz der schwachen Färbung A β -Ablagerungen im „Hof“-Bereich der Plaques vorhanden waren, wurde eine Kombination der einzelnen Vorbehandlungen gewählt. Nach dem Entparaffinieren der Gewebeschnitte folgten eine Vorbehandlung des Gewebes mit alkalischen NaCl-Lösung und eine Färbung mit Fluo-D-Pep1 (siehe Abbildung 5-23, Bild A und B). Nach Betrachtung

der Gewebeschnitte und Aufnahme der Bilder folgten eine Behandlung der Gewebeschnitte mit Ameisensäure und eine Inkubation mit Cy3-Anti-A β_{1-16} (siehe Abbildung 5-23, Bild C und D). Bild D zeigt eine eindeutige Färbung des „Hof“-Bereichs eines Alzheimer-Plaques durch Cy3-Anti-A β_{1-16} . Diese Bereiche wurden durch Fluo-D-Pep1 nicht gefärbt (Bild A und E).

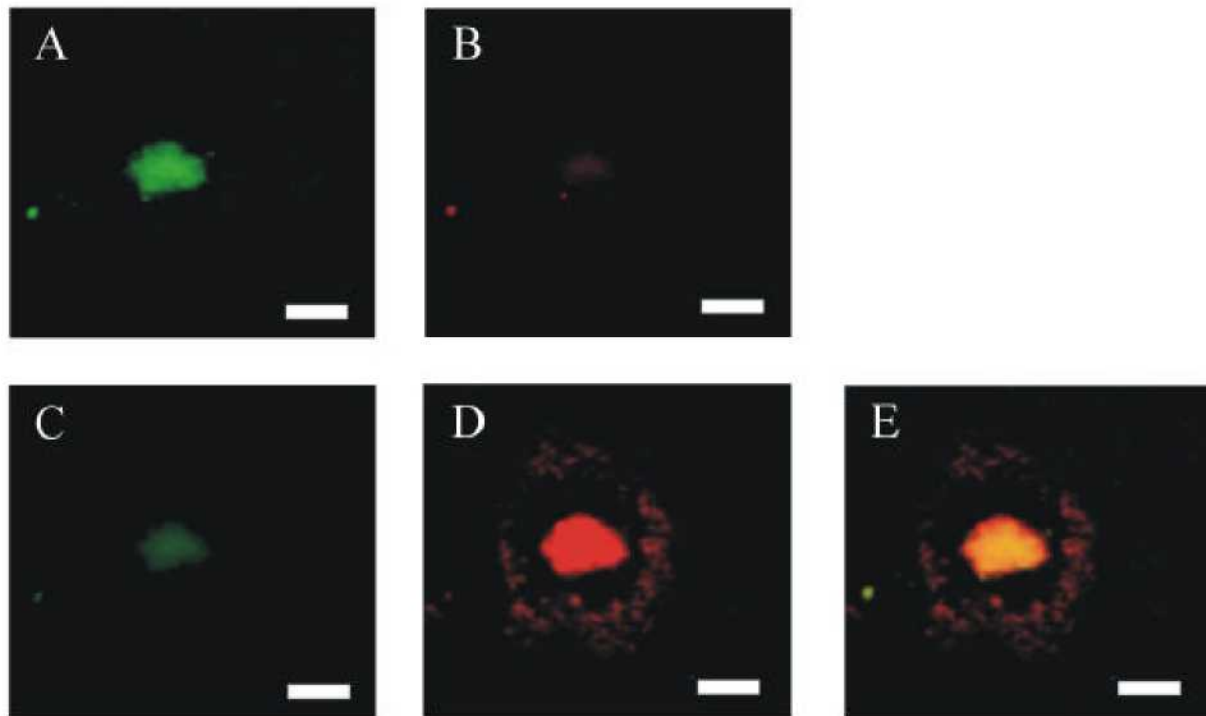


Abbildung 5-23: Färbung von A β -Ablagerungen in Form von Plaques in Gewebeschnitten aus dem Gehirn einer ehemaligen Alzheimer-Patientin, Vorbehandlung der entparaffinierten Gewebeschnitte mit alkalischer NaCl-Lösung, Inkubation mit Fluo-D-Pep1, Vorbehandlung mit Ameisensäure, Inkubation mit Cy3-Anti-A β_{1-16}

Die Gehirngewebeschnitte wurden entparaffiniert, in einer alkalischen NaCl-Lösung inkubiert, mit PBS gewaschen und mit Fluo-D-Pep1 inkubiert (genauere Angaben Kapitel 4.10.). Bild A wurde mit einem Fluorescein-Fluoreszenz-Filterset und Bild B mit einem Cy3-Fluoreszenz-Filterset aufgenommen. Es folgte eine Inkubation des Gewebeschnittes für 2 min mit Ameisensäure und eine Färbung der Plaques mit Cy3-Anti-A β_{1-16} . Bild C wurde mit einem Fluorescein-Fluoreszenz-Filterset und Bild D mit einem Cy3-Fluoreszenz-Filterset aufgenommen. Bild E zeigt eine Überlagerung von Bild A und Bild D. Neben dem gefärbten Plaque sind Autofluoreszenzen durch Lipofuchsin-Ablagerungen zu erkennen. Der Balken entspricht einer Länge von 20 μm .

5.6.3. Histologische Färbungen an Gewebeschnitten einer Alzheimer-Patientin – Färbung von A β -Ablagerungen in Blutgefäßen

Die Gewebeproben wurden *post mortem* aus dem Gehirn einer Patientin entnommen, bei der neben Alzheimerscher Demenz zusätzlich kongophile Angiopathie diagnostiziert wurde. Bei der kongophilen Angiopathie kommt es zur Anlagerung von A β -Fibrillen in Blutgefäßen des Gehirns. Durch Experimente nach dem Schema: “Entparaffinieren der Gewebeschnitte, gleichzeitige Inkubation der Gewebeschnitte mit Fluo-D-Pep1 und Cy3-Anti-A β_{1-16} und Betrachtung der Gewebeschnitte (siehe Kapitel 4.10.1.) mit einem Fluorescein- und einem Cy3-Fluoreszenz-Filterset“ wurden Blutgefäße mit Amyloid-Ablagerungen Cy3-Anti-A β_{1-16} und Fluo-D-Pep1 angefärbt (siehe Abbildung. 5-24).

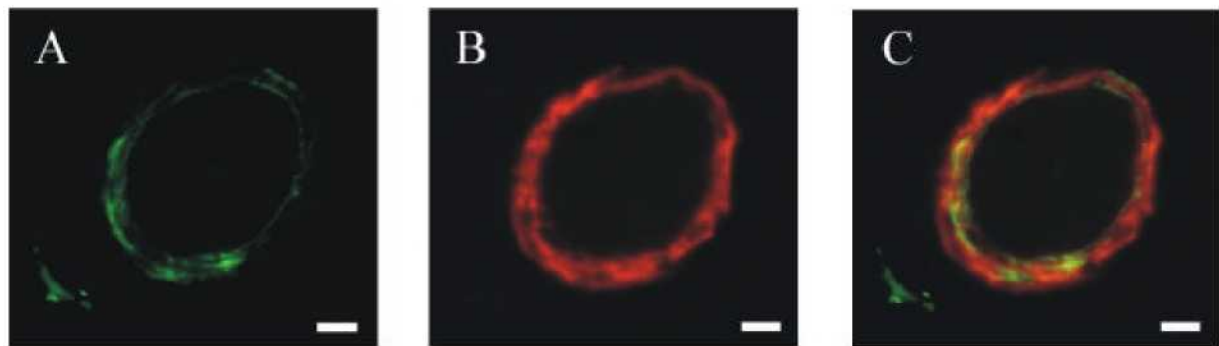


Abbildung 5-24: Färbung von A β -Ablagerungen in Blutgefäßen in Paraffin-Gewebeschnitten aus dem Gehirn einer Alzheimer-Patientin mit Fluo-D-Pep1 und Cy3-Anti-A β_{1-16}

Die Gehirngewebeschnitte wurden entparaffiniert und mit Fluo-D-Pep1 und Cy3-Anti-A β_{1-16} inkubiert. Bild A wurde mit einem Fluorescein-Fluoreszenz-Filterset aufgenommen, Bild B mit einem Cy3-Fluoreszenz-Filterset. Bild C zeigt eine Überlagerung von Bild A und Bild B. Der Balken entspricht einer Länge von 50 μ m.

Auch hier wurden wie in Kapitel 5.6.2. Einzelfärbungen mit dem Fluo-D-Pep1 bzw. Cy3-Anti-A β_{1-16} durchgeführt und kaum bzw. kein „Durchbluten“ beobachtet (siehe Abbildungen 5-25 und 5-26).

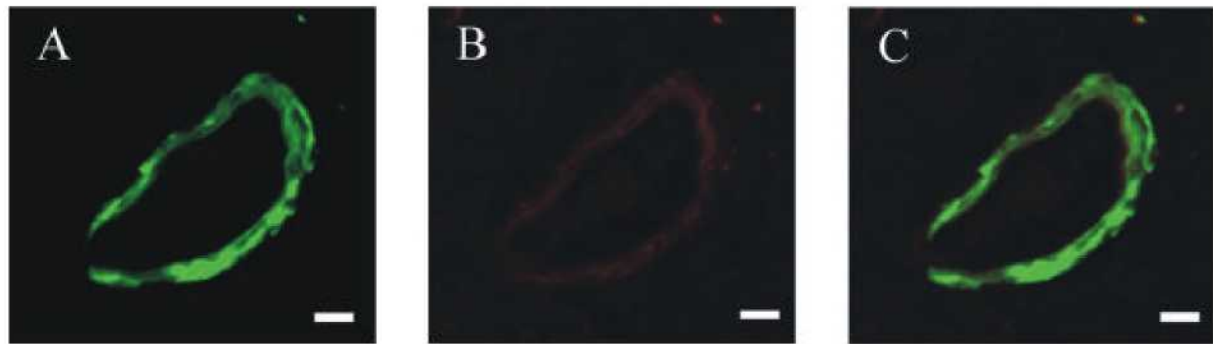


Abbildung 5-25: Färbung von A β -Ablagerungen in Blutgefäßen in Paraffin-Gewebeschnitten aus dem Gehirn einer Alzheimer-Patientin mit Fluo-D-Pep1

Die Gehirngewebeschnitte wurden entparaffiniert und mit Fluo-D-Pep1 inkubiert. Bild A wurde mit einem Fluorescein-Fluoreszenz-Filterset aufgenommen, Bild B mit einem Cy3-Fluoreszenz-Filterset. Bild C zeigt eine Überlagerung von Bild A und Bild B. Der Balken entspricht einer Länge von 50 μ m.

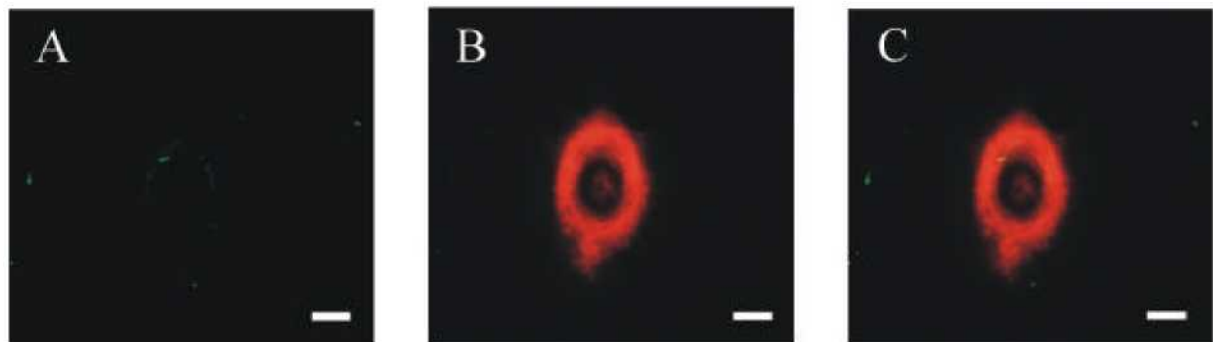


Abbildung 5-26: Färbung von A β -Ablagerungen in Blutgefäßen in Paraffin-Gewe beschnitten aus dem Gehirn einer Alzheimer-Patientin mit Cy3-Anti-A β_{1-16}

Die Gehirngewebeschnitte wurden entparaffiniert und Cy3-Anti-A β_{1-16} inkubiert. Bild A wurde mit einem Fluorescein-Fluoreszenz-Filterset aufgenommen, Bild B mit einem Cy3-Fluoreszenz-Filterset. Bild C zeigt eine Überlagerung von Bild A und Bild B. Der Balken entspricht einer Länge von 50 μ m.

5.6.4. Histologische Färbungen an Gewebeschnitten eines Nicht-Alzheimer-Patienten

Als Kontrolle wurden Doppelfärbungen mit Fluo-D-Pep1 und Cy3-Anti-A β_{1-16} von Gewebeschnitten eines Patienten, bei dem weder AD noch kongophile Angiopathie diagnostiziert wurde. Hier wurde keine Färbung von Blutgefäßen und plaque-ähnlichen Strukturen beobachtet (Ergebnisse nicht aufgeführt).

5.7. Histologische Färbungen verschiedener Amyloidose-Fälle

5.7.1. Prinzip der Färbungen

Amyloide sind Protein-Aggregate, die als gemeinsames Strukturmotiv eine β -Faltblatt-Konformation aufweisen und als Fibrille vorliegen (siehe Kapitel 2.1.2.). Vom Farbstoff Kongo-Rot ist bekannt, dass er an die fibrillären Formen der Amyloid-Proteine bindet (Klunk *et al.*, 1999). Durch histologische Färbungen mit einem Cy3-markierten Anti-A β ₁₋₄₂-Antikörpersystem und Fluo-D-Pep1 konnte eine Färbung von „Kern“-Bereichen in Alzheimer-Plaques nachgewiesen werden (siehe Kapitel 5.6.). DPep1 bindet an natürliche A β -Ablagerungen. Durch Färbungen von Gewebeschnitten von Patienten mit verschiedenen Amyloidosen sollte die Frage untersucht werden, ob DPep1 unspezifisch Amyloid-Fibrillen oder ausschließlich A β -Aggregate markiert. Dafür wurden formalin-fixierte/paraffin-eingebettete Gewebeschnitte verschiedener Amyloidose-Fälle entparaffiniert, mit alkalischer NaCl-Lösung behandelt, mit Fluo-D-Pep1 inkubiert und mit einem Fluorescein-Fluoreszenz-Filterset mikroskopiert. Nach dem Mikroskopieren wurde eine Färbung mit Kongo-Rot durchgeführt, was zu einer Markierung der Amyloid-Ablagerungen des jeweiligen Gewebeschnittes führte. Die Kongo-Rot-Anfärbungen der Amyloid-Ablagerungen wurden mit dem Cy3-Fluoreszenz-Filterset sichtbar (siehe Kapitel 4.9., 4.11., 4.12.). Zur Kontrolle wurde jeder Gewebeschnitt vor der Färbung betrachtet. Damit sollten Fehlinterpretationen aufgrund von Autofluoreszenzen im Gewebe verhindert werden. Weiterhin wurden parallel zu jeder Färbung unter gleichen Bedingungen Gewebeschnitte aus dem Gehirn einer ehemaligen Alzheimer-Patientin gefärbt. Damit wurde sichergestellt, dass unter den angewendeten Bedingungen eine Färbung sowohl mit dem DPep1 als auch mit Kongo-Rot möglich war und dass eine mögliche Nicht-Markierung der Amyloid-Ablagerungen nicht auf Fehler in der Versuchsdurchführung beruhte.

5.7.2. Histologische Färbungen an Gewebeschnitten: Alzheimersche Demenz

Die Plaques in Gewebeschnitten aus Proben einer Alzheimer-Patientin wurden mit der aufgeführten Methode sowohl mit DPep1 als auch mit Kongo-Rot angefärbt (siehe Abbildung 5-27).

Das Fluorescein-Fluoreszenzsignal ist nach der Kongo-Rot-Färbung weniger intensiv bzw. gar nicht erkennbar, weil Kongo-Rot durch einen Fluoreszenzwellenbereich angeregt wird, bei dem Fluorescein Fluoreszenzlicht emittiert. Deshalb mussten die Färbungen nacheinander durchgeführt werden.

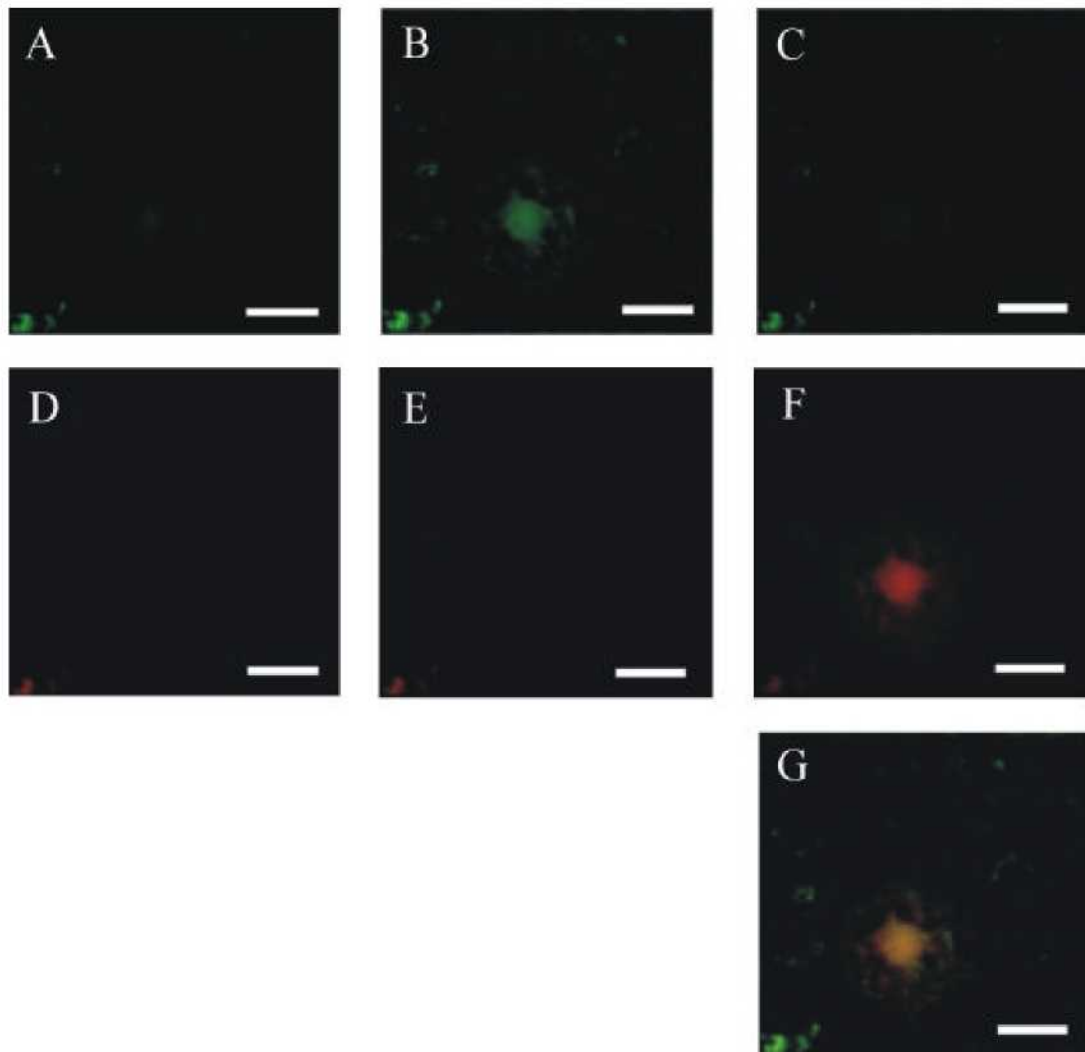


Abbildung 5-27: Färbung von A β -Ablagerungen in Form von Plaques in Gewebeschnitten aus dem Gehirn einer ehemaligen Alzheimer-Patientin, Vorbehandlung der entparaffinierten Gewebeschnitte mit alkalischer NaCl-Lösung, Inkubation mit Fluo-D-Pep1, Inkubation mit Kongo-Rot-Lösung

Die Gehirngewebeschnitte wurden entparaffiniert, in einer alkalischen NaCl-Lösung inkubiert und mit PBS gewaschen. Bild A wurde mit einem Fluorescein-Fluoreszenz-Filterset und Bild D mit einem Cy3-Fluoreszenz-Filterset vor der ersten Färbung aufgenommen. Es folgte die Inkubation mit dem Fluo-D-Pep1. Bild B wurde mit dem Fluorescein-Fluoreszenz-Filterset und Bild E mit dem Cy3-Fluoreszenz-Filterset aufgenommen. Nach der anschließenden Färbung mit Kongo-Rot wurde Bild C mit dem Fluorescein-Fluoreszenz-Filterset und Bild F mit dem Cy3-Fluoreszenz-Filterset aufgenommen. Bild G zeigt eine Überlagerung von Bild B und Bild F. Neben dem gefärbten Plaque sind Autofluoreszenzen durch Lipofuchsin-Ablagerungen zu erkennen. Der Balken entspricht einer Länge von 20 μ m.

Im Allgemeinen werden in Gehirngewebeschnitten von Alzheimer-Patienten neben den extrazellulären A β -Plaques weitere Amyloid-Ablagerungen gefunden, die durch Kongo-Rot

angefärbt werden können (siehe Kapitel 2.1.1.). Diese Ablagerungen bestehen aus degenerierten Neurofilamenten und Mikrotubuli-assoziierten Proteinen. Der Hauptbestandteil der Ablagerungen ist das τ -Protein, welches in fibrillärer Form vorliegt. Die Filamente sind paarweise helikal verdreht angeordnet und werden als „paired helical filaments“ (PHF) bezeichnet. Eine Markierung dieser PHFs durch D-Pep1 wurde nicht beobachtet (Ergebnisse nicht aufgeführt).

5.7.3. Histologische Färbungen an Gewebeschnitten: AA-Amyloidose

Beim Muckle-Wells-Syndrom kommt es zu Protein-Ablagerung. Das Vorläuferprotein ist Serum-Amyloid-A und die Amyloidklasse wird als AA-Amyloidose bezeichnet. In den Gewebeschnitten eines Patienten mit Muckle-Wells-Syndrom wurden zwei verschiedene Ablagerungen beobachtet. In Abbildung 5-28 sind arterielle und in Abbildung 5-29 glomeruläre Amyloid-Ablagerungen sichtbar. Beide Amyloid-Ablagerungen wurden nur mit Kongo-Rot angefärbt. In Abbildung 5-28 und 5-29 zeigt sich ein Hintergrundsignal des Gewebes bei der Aufnahme mit dem Fluorescein-Fluoreszenz-Filterset vor und nach der Färbung mit Fluo-D-Pep1 (Bild A und B). Dabei ist die Hintergrundfärbung nach der Färbung mit Fluo-D-Pep1 anscheinend etwas stärker. Wahrscheinlich wurde nach der Fluo-D-Pep1-Färbung nicht häufig genug mit PBS gewaschen, so dass vereinzelt Fluo-D-Pep1-Moleküle im Gewebe verblieben sind. Allerdings konnte die Anzahl der Waschvorgänge nicht erhöht werden, weil die Durchführung der Färbeprozedur sehr strapazierend für das Gewebe war und bei Einführung weiterer Waschschrirte die Gefahr bestand, dass sich das Gewebe von Objektträger löst. Dennoch erlauben die Bilder die Aussage, dass Fluo-D-Pep1 nicht an die Amyloid-Ablagerungen bindet, weil die Hintergrund-Färbung gleichmäßig auftritt. Sie wurde nicht speziell in den in Abbildung 5-28, Bild F rot gefärbten Bereichen der Amyloid-Ablagerungen beobachtet.

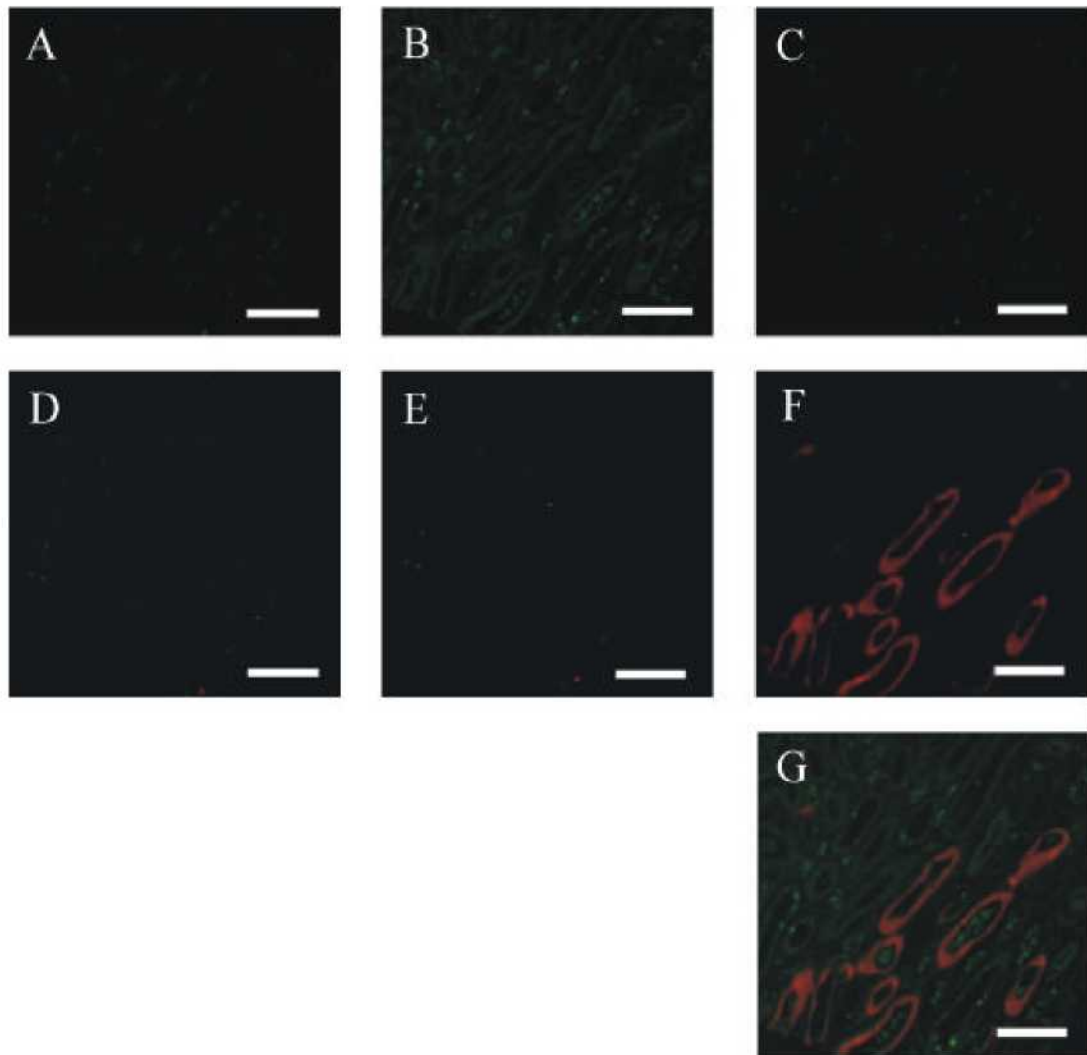


Abbildung 5-28: Färbung von arteriellen Amyloid-Ablagerungen in Paraffin-Gewebeschnitten aus der Niere eines Patienten mit einer AA-Amyloidose, Vorbehandlung der entparaffinierten Gewebeschnitte mit alkalischer NaCl-Lösung, Inkubation mit Fluo-D-Pep1, Inkubation mit Kongo-Rot-Lösung

Die Gewebeschnitte wurden entparaffiniert, in einer alkalischen NaCl-Lösung inkubiert und mit PBS gewaschen. Bild A wurde mit einem Fluorescein-Fluoreszenz-Filterset und Bild D mit einem Cy3-Fluoreszenz-Filterset vor der ersten Färbung aufgenommen. Es folgte die Inkubation mit dem Fluo-D-Pep1. Bild B wurde mit dem Fluorescein-Fluoreszenz-Filterset und Bild E mit dem Cy3-Fluoreszenz-Filterset aufgenommen. Nach der anschließenden Färbung mit Kongo-Rot wurde Bild C mit einem Fluorescein-Fluoreszenz-Filterset und Bild F mit dem Cy3-Fluoreszenz-Filterset aufgenommen. Bild G zeigt eine Überlagerung von Bild B und Bild F. Der Balken entspricht einer Länge von 50 µm.

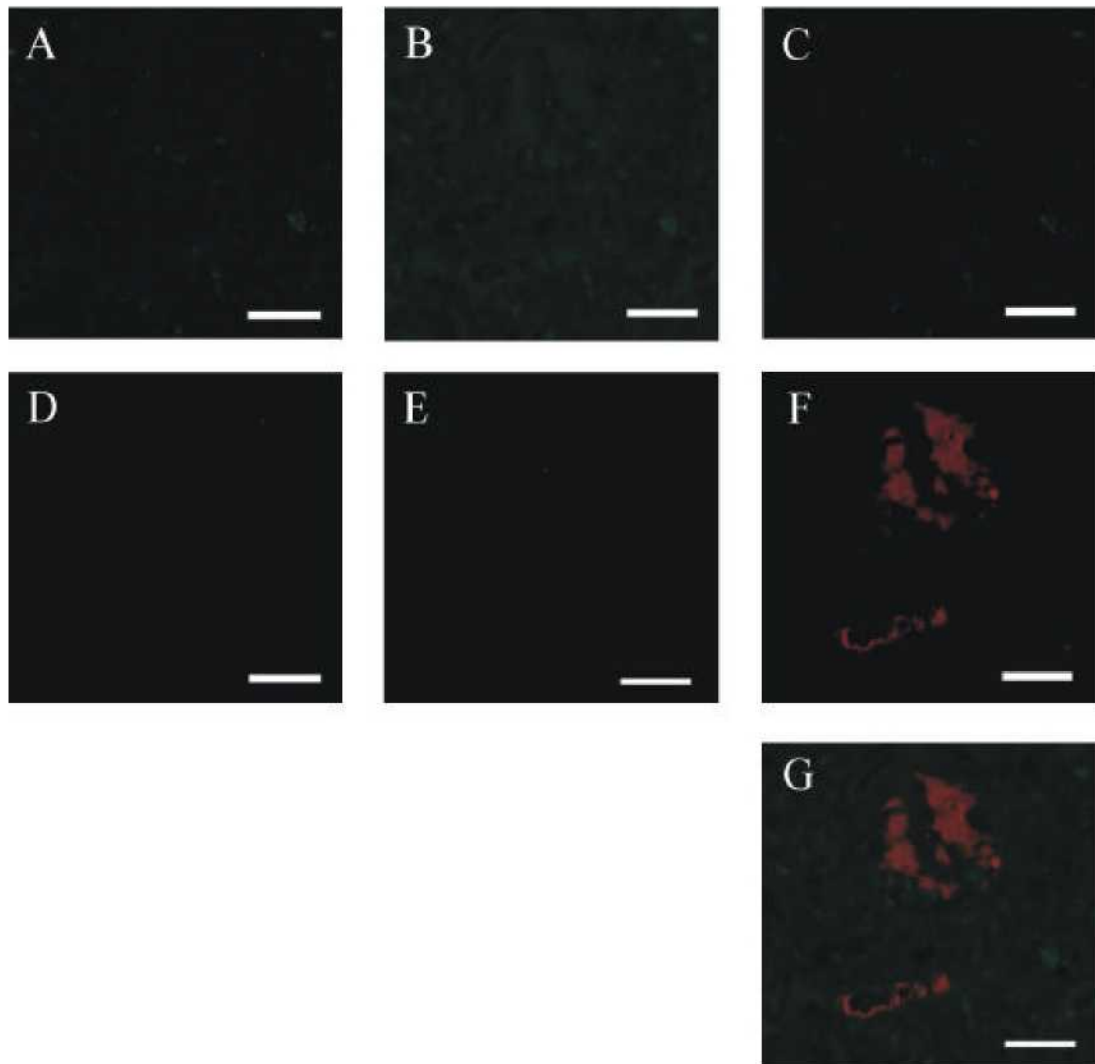


Abbildung 5-29: Färbung von glomerularen Amyloid-Ablagerungen in Paraffin-Gewebeschnitten aus der Niere eines Patienten mit einer AA-Amyloidose, Vorbehandlung der entparaffinierten Gewebeschnitte mit alkalischer NaCl-Lösung, Inkubation mit Fluo-D-Pep1, Inkubation mit Kongo-Rot-Lösung

Die Gewebeschnitte wurden entparaffiniert, in einer alkalischen NaCl-Lösung inkubiert und mit PBS gewaschen. Bild A wurde mit einem Fluorescein-Fluoreszenz-Filterset und Bild D mit einem Cy3-Fluoreszenz-Filterset vor der ersten Färbung aufgenommen. Es folgte die Inkubation mit dem Fluo-D-Pep1. Bild B wurde mit dem Fluorescein-Fluoreszenz-Filterset und Bild E mit dem Cy3-Fluoreszenz-Filterset aufgenommen. Nach der anschließenden Färbung mit Kongo-Rot wurde Bild C mit einem Fluorescein-Fluoreszenz-Filterset und Bild F mit dem Cy3-Fluoreszenz-Filterset aufgenommen. Bild G zeigt eine Überlagerung von Bild B und Bild F. Der Balken entspricht einer Länge von 50 μm .

5.7.4. Histologische Färbungen an Gewebeschnitten : AL κ -Amyloidose

Die Gewebeschnitte in Abbildung 5-30 stammen von einer Patientin, bei der eine krankhafte Ablagerung von Ig κ -Fragmenten diagnostiziert wurde. Es handelt sich um eine AL κ -Amyloidose. Wiederum wurden die Amyloid-Ablagerungen nur mit Kongo-Rot gefärbt.

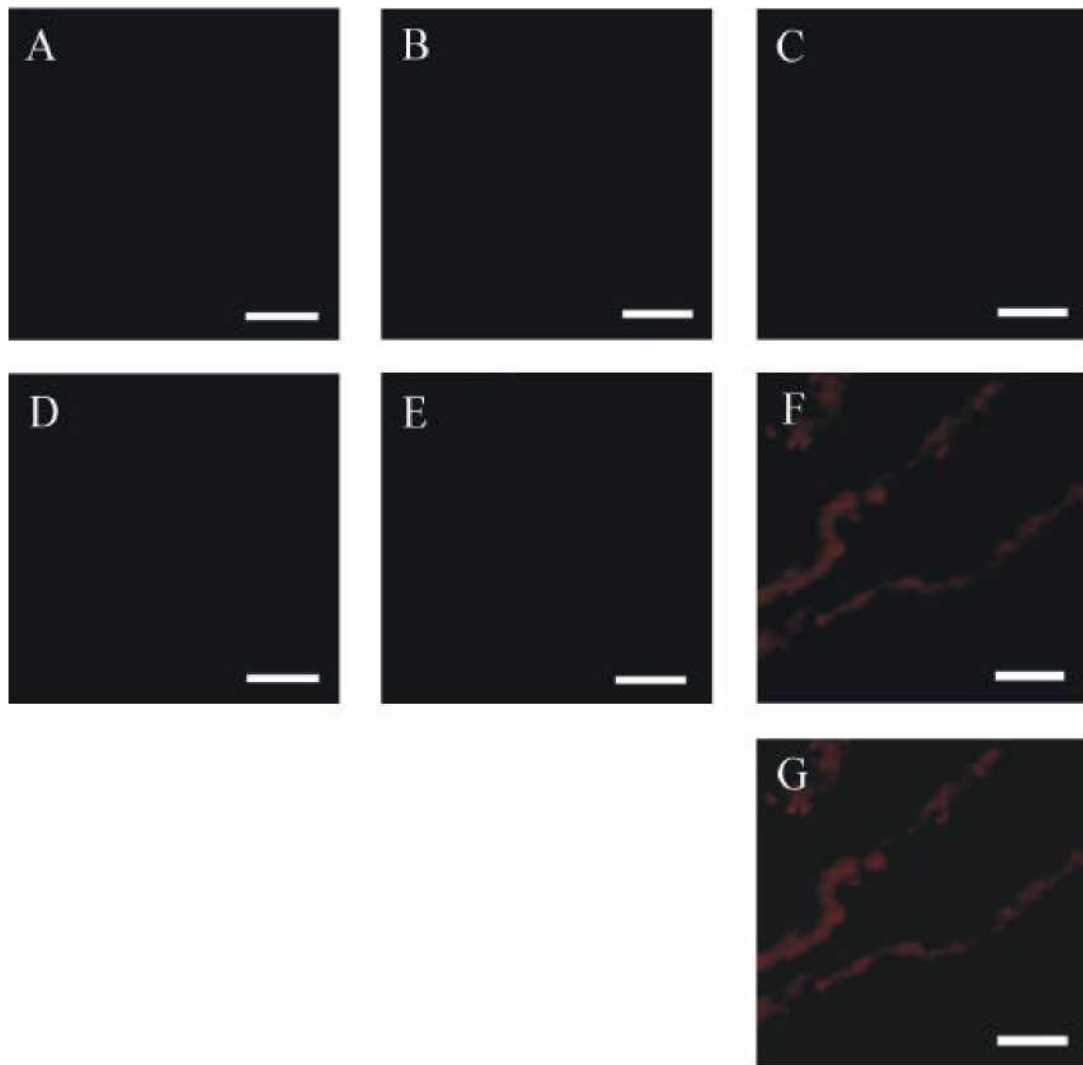


Abbildung 5-30: Färbung von Amyloid-Ablagerungen in Paraffin-Gewebeschnitten aus der Zunge einer Patientin mit einer AL κ -Amyloidose , Vorbehandlung mit alkalischer NaCl-Lösung, Inkubation mit Fluo-D-Pep1, Inkubation mit Kongo-Rot-Lösung

Die Gewebeschnitte wurden entparaffiniert, in einer alkalischen NaCl-Lösung inkubiert und mit PBS gewaschen. Bild A wurde mit einem Fluorescein-Fluoreszenz-Filterset und Bild D mit einem Cy3-Fluoreszenz-Filterset vor der ersten Färbung aufgenommen. Es folgte die Inkubation mit dem Fluo-D-Pep1. Bild B wurde mit dem Fluorescein-Fluoreszenz-Filterset und Bild E mit dem Cy3-Fluoreszenz-Filterset aufgenommen. Nach der anschließenden Färbung mit Kongo-Rot wurde Bild C mit einem Fluorescein-Fluoreszenz-Filterset und Bild F mit dem Cy3-Fluoreszenz-Filterset aufgenommen. Bild G zeigt eine Übereinlagerung von Bild B und Bild F. Die Länge des Balkens entspricht 50 μ m.

5.7.5. Histologische Färbungen an Gewebeschnitten: AL λ -Amyloidose

Bei AL λ -Amyloidose kommt es zur Ablagerung von Fragmenten von monoklonalen Ig λ -Leichtketten kommt. Wiederum erfolgte eine Färbung der Amyloid-Ablagerungen nur durch Kongo-Rot. In Abbildung 5-31, Bild A bis C ist jeweils ein Bereich der Autofluoreszenz sichtbar.

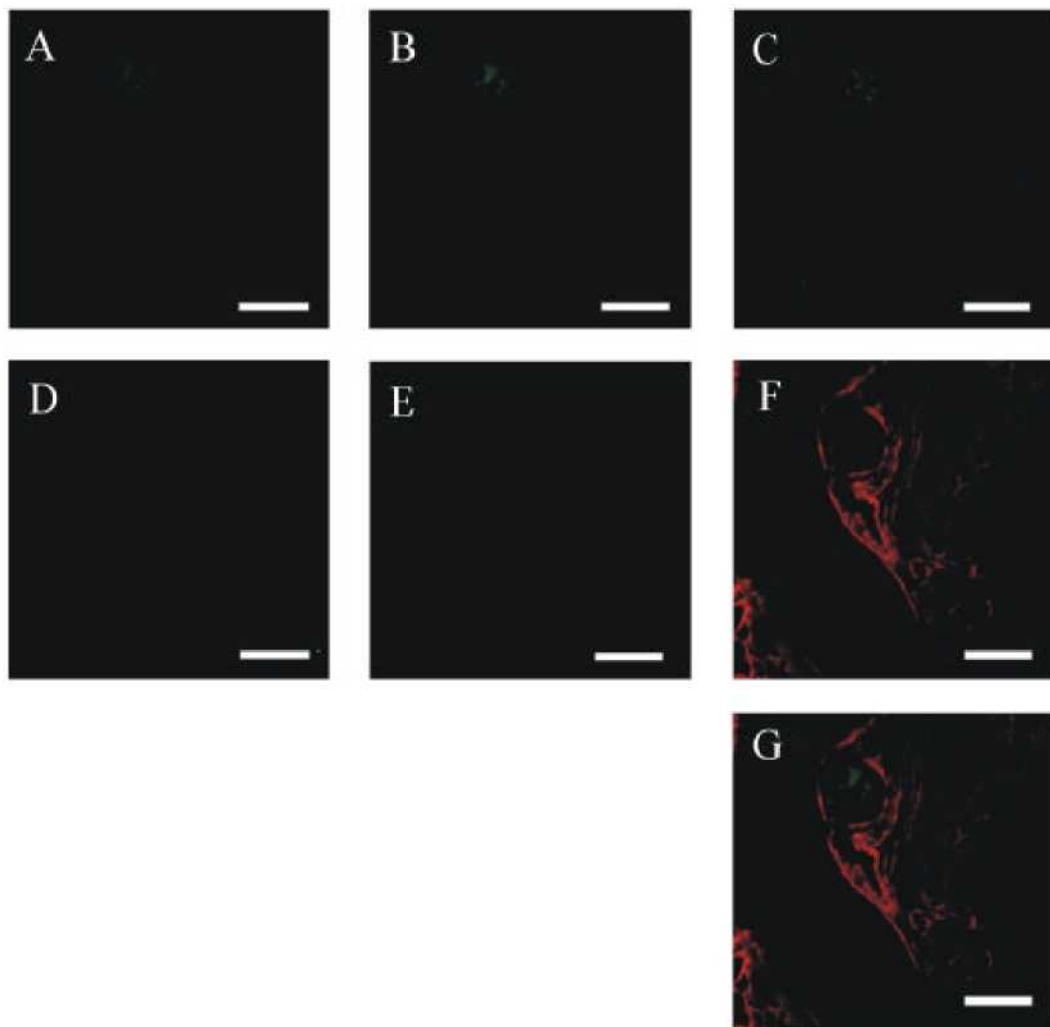


Abbildung 5-31: Färbung von Amyloid-Ablagerungen in Paraffin-Gewebeschnitten aus dem Pankreas-Gewebe eines Patienten mit einer AL λ -Amyloidose, Vorbehandlung der entparaffinierten Gewebeschnitte mit alkalischer NaCl-Lösung Inkubation mit Fluo-D-Pep1, Inkubation mit Kongo-Rot-Lösung

Die Gewebeschnitte wurden entparaffiniert, in einer alkalischen NaCl-Lösung inkubiert, mit PBS gewaschen. Bild A wurde mit einem Fluorescein-Fluoreszenz-Filterset und Bild D mit einem Cy3-Fluoreszenz-Filterset vor der ersten Färbung aufgenommen. Es folgte die Inkubation mit dem Fluo-D-Pep1. Bild B wurde mit dem Fluorescein-Fluoreszenz-Filterset und Bild E mit dem Cy3-Fluoreszenz-Filterset aufgenommen. Nach der anschließenden Färbung mit Kongo-Rot wurde Bild C mit einem Fluorescein-Fluoreszenz-Filterset und Bild F mit dem Cy3-Fluoreszenz-Filterset aufgenommen. Bild G zeigt eine Überlagerung von Bild B und Bild F. Der Balken entspricht einer Länge von 50 μ m.

5.8. Einfluss des selektierten D-Peptids auf die cytotoxische Wirkung von

$A\beta_{1-42}$

5.8.1. Einfluss des selektierten D-Pep1 auf die cytotoxische Wirkung von $A\beta_{1-42}$ –

Zugabe D-Pep1 vor $A\beta$ -Fibrillenbildung

Der Effekt des selektierten D-Pep1 auf die cytotoxische Wirkung von L- $A\beta_{1-42}$ wurde anhand der MTT-Reduktion durch PC12-Zellen untersucht. Wie schon unter 5.2. ausgeführt, ist die MTT-Reduktion ein Maß für die Lebensfähigkeit der Zellen im Test. Ein Wert von 100 % MTT-Reduktion entspricht dem 100%igen Überleben der Zellen. In diesem Fall hat die zu prüfende Substanz keinen Einfluss auf das Überleben der Zellen.

L- $A\beta_{1-42}$ wurde zunächst in 8 M Harnstoff in 10 mM Glycin-NaOH, pH 10, gelöst. Dadurch sollte die Fibrillenbildung verhindert werden (Pallitto und Murphy, 2001). Es folgte eine Verdünnungsstufe mit PBS als Lösungsmittel (Pallitto und Murphy, 2001) und die abschließende Verdünnung von 1:5 in DMEM durch die Zugabe der Lösungen in den Versuchsansatz. D-Pep1 wurde im PBS gelöst, das für die Verdünnung der $A\beta$ -Lösung verwendet wurde. D-Pep1 sollte zum Zeitpunkt der Fibrillenbildung in der Lösung vorhanden sein (siehe Kapitel 4.14.3.). Zur Untersuchung, ob unter den gegebenen Versuchsbedingungen eine *in-vitro*-Cytotoxizität von L- $A\beta_{1-42}$ nachgewiesen werden kann, wurde eine Dosis-Wirkungskurve von L- $A\beta_{1-42}$ ohne D-Pep1 (siehe Abbildung 5-32) angefertigt (siehe Kapitel 4.14.2.).

Konzentrationen von 10 μ M und 20 μ M führten zu einem Absinken der MTT-Reduktion auf 45 %. Bei einer Konzentration von 1 μ M wurde eine MTT-Reduktion von ca. 55 % ermittelt. Bei geringeren Konzentrationen wurde durch Zugabe von L- $A\beta_{1-42}$ keine eindeutige Hemmung der Lebensfähigkeit der Zellen festgestellt.

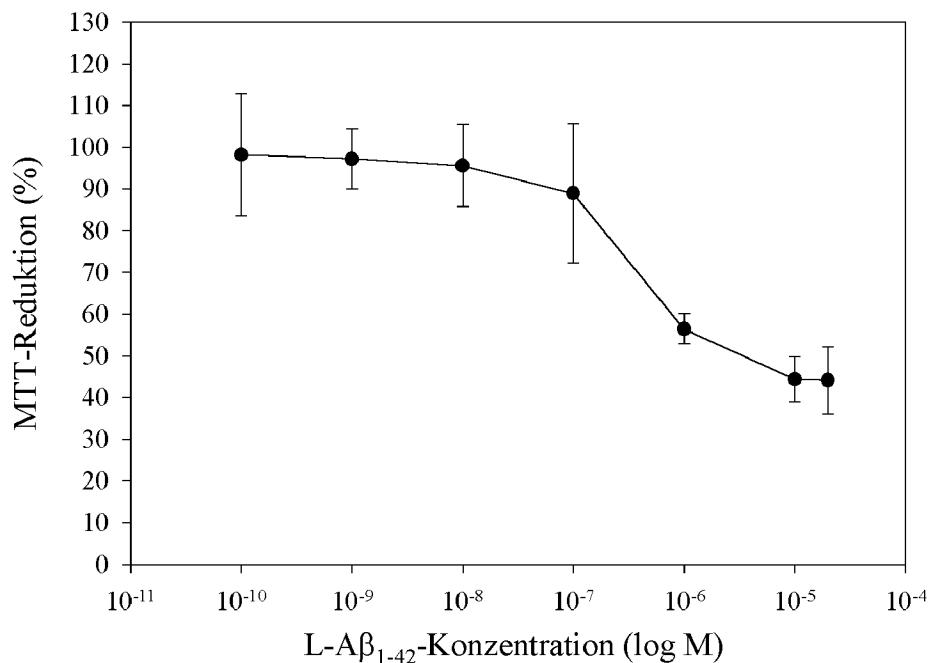


Abbildung 5-32: Dosis-Wirkungs-Kurve des cytotoxischen Effekts von L-Aβ₁₋₄₂ gemessen an der Reduktion von MTT durch PC12-Zellen

L-Aβ₁₋₄₂ wurde in einer Konzentration von 1 mM in 8 M Harnstoff in 10 mM Glycin-NaOH, pH 10, gelöst und in PBS und DMEM weiter verdünnt (siehe Kapitel 4.14.2.). Die Berechnung der Prozentwerte der MTT-Reduktion (%) erfolgte anhand parallel gemessener Kontrollwerte (100 % = gleiche Anteile an PBS und Harnstoff, ohne Aβ und ohne D-Pep1; 0 % = 0,2 % Triton-X). Aufgeführt sind jeweils die arithmetischen Mittel von 6 Parallelen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen an.

Zur Untersuchung des Effekts von D-Pep1 auf die *in-vitro*-Cytotoxizität von 1 μM L-Aβ₁₋₄₂ wurde L-Aβ₁₋₄₂ in einer Konzentration von 1 mM in 8 M Harnstoff, pH 10, gelöst. Das in Selektion 1 selektierte D-Pep1 (ohne Marker) wurde in Konzentrationen von 5 mM, 2,5 mM, 500 μM, 250 μM, 50 μM, 10 μM und 1 μM in PBS gelöst und die Aβ₁₋₄₂-Lösung jeweils 1:200 darin verdünnt. Durch die Zugabe der Aβ₁₋₄₂/D-Peptid-Lösung zu PC12-Zellen erfolgte eine weitere Verdünnung von 1:5 auf die jeweiligen Endkonzentrationen im Ansatz (siehe Abbildung 5-33).

Wie bereits nachgewiesen, hat L-Aβ₁₋₄₂ unter den gegebenen Versuchsbedingungen Auswirkungen auf die Lebensfähigkeit von PC12-Zellen. Die Werte für die MTT-Reduktion lagen bei einer Konzentration von 1 μM L-Aβ₁₋₄₂ ohne D-Pep1 (0 μM) bei 60%. Durch die Zugabe von 50 μM bzw. 100 μM D-Pep1 stieg die Lebensfähigkeit der PC12-Zellen an. Bei einer D-Pep1-Konzentration von 100 μM waren 100 % der Zellen lebensfähig. Der Wert für die MTT-Reduktion lag bei 100 %. Interessanterweise trat dieser Einfluss von D-Pep1 auf die

Cytotoxizität von L-A β ₁₋₄₂ bei D-Pep1-Konzentrationen oberhalb 100 μ M nicht mehr auf. Die Werte für die MTT-Reduktion lagen hier bei 60 %. Dies Ergebnis wurde in zwei unabhängigen Versuchen ermittelt.

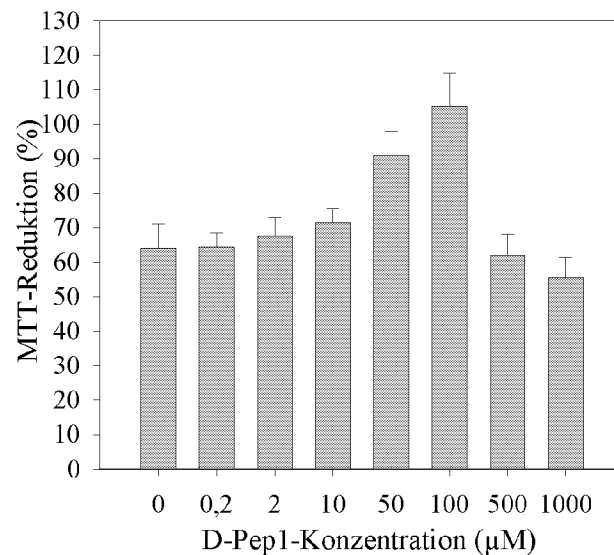


Abbildung 5-33: Einfluss D-Pep1 auf cytotoxische Wirkung von 1 μ M A β ₁₋₄₂ gemessen an der Reduktion von MTT durch PC12-Zellen

Das A β ₁₋₄₂ wurde in einer Konzentration von 1 mM in 8 M Harnstoff in 10 mM Glycin-NaOH, pH 10, gelöst und in PBS und DMEM weiter verdünnt (siehe Kapitel 4.14.3.). Die Berechnung der Prozentwerte der MTT-Reduktion (%) erfolgte relativ zu parallel gemessenen Kontrollwerten (100 % = gleiche Anteile an Harnstoff und PBS, ohne A β und ohne D-Pep1; 0 % = 0,2 % Triton-X). Aufgeführt sind jeweils die arithmetischen Mittel von 6 Parallelen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen an.

Zur Kontrolle, ob D-Pep1 einen Einfluss auf die MTT-Reduktion der PC12-Zellen hat, wurde ein Versuch unter gleichen Versuchsbedingungen wie oben mit gleichen Konzentrationen an D-Pep1, aber ohne A β durchgeführt. Wie in Abbildung 5-34 zu erkennen ist, lagen alle Werte um 100 %. Der Messpunkt für 0 μ M D-Pep1 wurde ausgelassen, weil er dem 100 %-Wert entspricht (100 % = gleiche Anteile an PBS, Harnstoff in im Test, ohne A β und ohne D-Pep1). Für D-Pep1 wurde kein Einfluss auf die MTT-Reduktion von PC12-Zellen festgestellt.

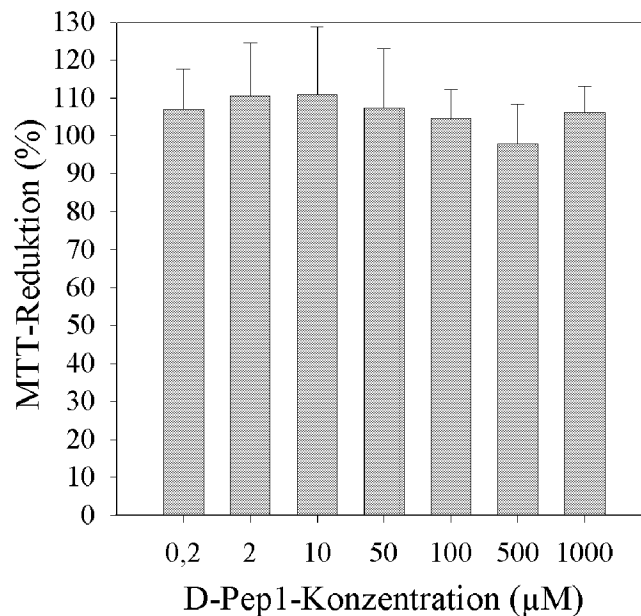


Abbildung 5-34: Einfluss D-Pep1 auf Reduktion von MTT durch PC12-Zellen

Die Berechnung der Prozentwerte der MTT-Reduktion (%) erfolgte relativ zu parallel gemessenen Kontrollwerten (100 % = gleiche Anteile an PBS, Harnstoff, ohne A β und ohne D-Pep1; 0 % = 0,2 % Triton-X). Aufgeführt sind jeweils die arithmetischen Mittel von 6 Parallelen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen an.

5.8.2. Einfluss von D-Pep1 auf die *in-vitro*-Cytotoxizität von fibrillärem A β_{1-42}

Der vorherige Versuch war so angelegt, dass D-Pep1 während der Aggregation von A β_{1-42} vorhanden war. Im Gegensatz dazu wurde in einem zweiten Versuch L-A β_{1-42} in einer Konzentration von 350 µM in H₂O gelöst und 5 Tage unter Schütteln bei 37 °C inkubiert, um eine Fibrillenbildung zu ermöglichen. Unmittelbar nach dem Lösen von A β wies die Flüssigkeit eine Trübung auf, was auf eine sofortige Aggregation von A β schließen lässt. Lorenzo und Yankner wiesen nach, dass A β_{1-42} unter gleichen Bedingungen Fibrillen ausbildet. Dieser Nachweis erfolgte über elektronenmikroskopische Aufnahmen (Lorenzo und Yankner, 1994). In Lösungen aus Bio-A β_{1-42} , welches unter gleichen Versuchsbedingungen gelöst wurde, wurden bei eigenen elektronenmikroskopischen Untersuchungen ebenfalls Fibrillen gefunden (siehe Kapitel 5.1.3.). Deshalb wurde davon ausgegangen, dass auch nicht-biotinyliertes A β_{1-42} unter diesen Bedingungen Fibrillen bildet. Zum Nachweis der A β -Cytotoxizität unter den gegebenen Versuchsbedingungen wurde eine Dosis-Wirkungs-Kurve

erstellt (siehe Abbildung 5-35). Unter den vorliegenden Versuchsbedingungen trat ein cytotoxischer Effekt von L-A β_{1-42} auf.

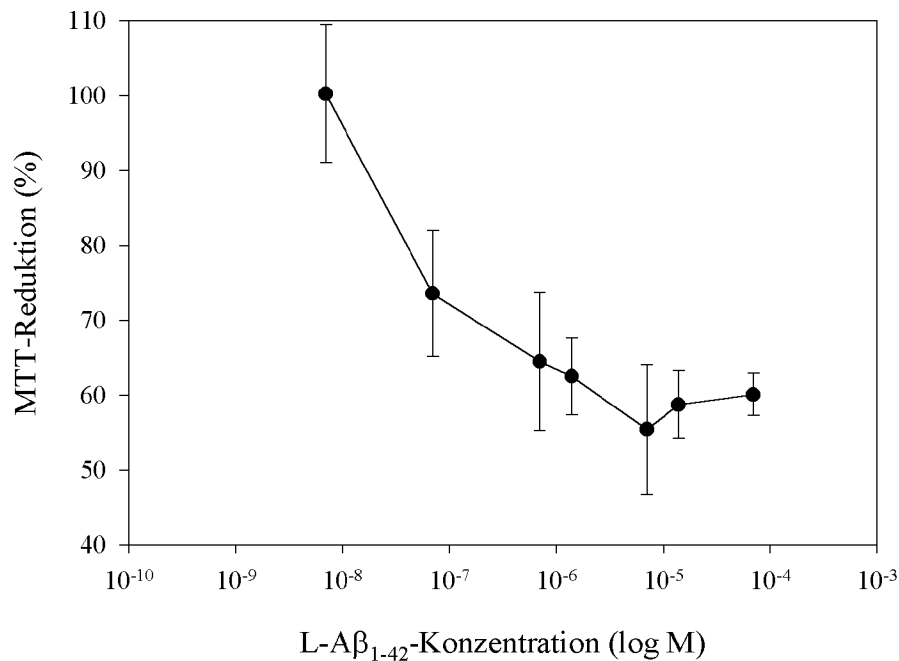


Abbildung 5-35: Dosis-Wirkungs-Kurve des Effekts von A β_{1-42} gemessen an der Reduktion von MTT durch PC12-Zellen

A β_{1-42} wurde in einer Konzentration von 350 μ M in H₂O gelöst und für 5 Tage bei 37°C unter Schütteln bei 200 rpm inkubiert. Die Berechnung der Prozentwerte der MTT-Reduktion (%) erfolgte relativ zu parallel gemessenen Kontrollwerten (100 % = gleiche Anteile an PBS, Harnstoff, ohne A β und ohne D-Pep1; 0 % = 0,2 % Triton-X). Aufgeführt sind jeweils die arithmetrischen Mittel von 6 Parallelen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen an.

Zur Untersuchung des Effekts von D-Pep1 auf die Cytotoxizität von fibrillärem A β_{1-42} wurde A β_{1-42} in Konzentrationen von 1 μ M und 10 μ M im MTT-Test eingesetzt (siehe Abbildung 5-36). Vor Zugabe der A β -Lösung in den Testansatz wurde sie 1:1 mit der jeweiligen der D-Pep1-Endkonzentration entsprechenden D-Pep1-Lösung verdünnt. Dann erfolgte die Zugabe der A β /D-Pep1-Lösung in den Testansatz und eine Inkubation der PC12-Zellen für 24 h.

Aus Abbildung 5-36 lässt sich bei einer Konzentration von 1 μ M A β ein Unterschied zwischen den Werten der MTT-Reduktion mit und ohne D-Pep1 erkennen (siehe Abbildung 5-36, A). Ohne D-Pep1 lag das arithmetische Mittel der Werte bei 60 %. Mit D-Pep1 stiegen die Werte an. Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde erhöht. Um diese Unterschiede statistisch zu belegen, wurde der Student t-Test mittels der Software Sigma-Plot 2000 (SPSS Science

Software GmbH, Erkrath) durchgeführt. Dabei wurden die Messwerte für die einzelnen D-Pep1-Konzentrationen jeweils mit den Messwerten für die Messungen ohne D-Pep1 (0 μM D-Pep1) verglichen. Es ergaben sich p-Werte kleiner 0,05. Der p-Wert gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass zwei Mittelwerte unterschiedlich sind. Per Definition sind zwei Mittelwerte bei p-Werten kleiner 0,05 signifikant unterschiedlich. Die Unterschiede der vorliegenden Messungen sind signifikant. Damit wurde ein Effekt von D-Pep1 auf die Cytotoxizität des vorliegenden A β nachgewiesen.

Der t-Test wurde ebenfalls für die Ergebnisse des MTT-Tests bei einer A β -Konzentration von 10 μM durchgeführt (siehe Abbildung 5-36, B). Hier wurden p-Werte kleiner 0,05 nur bei einer D-Pep1-Konzentration von 25 und 50 μM berechnet. Die Cytotoxizität von 10 μM A β wurde durch die Zugabe von D-Pep1 nach der Fibrillenbildung kaum bzw. gar nicht beeinflusst.

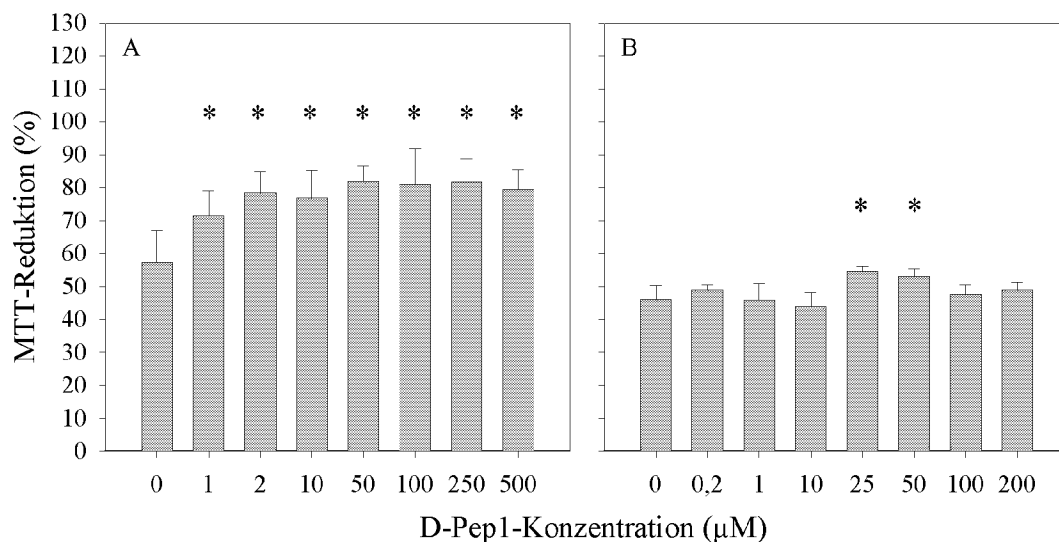


Abbildung 5-36: Effekt des D-Pep1 auf die Cytotoxizität von fibrillärem A β_{1-42} gemessen an der Reduktion von MTT durch PC12-Zellen, A β_{1-42} -Konzentrationen von 1 μM (A) bzw. 10 μM (B)

Die Berechnung der Prozentwerte der MTT-Reduktion (%) erfolgte relativ zu parallel gemessenen Kontrollwerten (100 % = gleiche Anteile an PBS, Harnstoff, ohne A β und ohne D-Pep1; 0 % = 0,2 % Triton-X). Aufgeführt sind jeweils die arithmetischen Mittel von 6 Parallelen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen an. * markiert p-Werte < 0,05, Student t-Test.

6. Diskussion

Ein charakteristisches Merkmal der Alzheimerschen Demenz (AD) ist die Ausbildung von Amyloid-Plaques, die aus extrazellulären Ablagerungen des Amyloid- β -Peptids ($A\beta$) bestehen. Die Pathogenese der AD und die Rolle von $A\beta$ innerhalb der Pathogenese sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Die „Amyloid-Kaskaden-Hypothese“ weist $A\beta$ eine zentrale Rolle in der Erkrankung zu. Es wird postuliert, dass durch $A\beta$ verschiedene Mechanismen induziert werden, die zu neurodegenerativen Schäden und zur Ausbildung der Krankheitssymptome führen. In diesem Zusammenhang ist die Identifizierung von $A\beta$ -bindenden Liganden ein viel versprechendes Ziel in der Entwicklung von Substanzen zur Diagnose und Therapie der Krankheit. Wichtige Kriterien für den Einsatz einer Substanz in Diagnose- und Therapieansätze für AD-Patienten sind 1.) die Substanz soll keine Immunantwort im Körper des Patienten hervorrufen, 2.) die Substanz soll nicht zu schnell durch körpereigene Enzyme abgebaut werden, 3.) die Substanz muss permeabel für die Blut-Hirn-Schranke sein und 4.) die Substanz muss spezifisch wirken, um Nebenwirkungen oder Fehldiagnosen zu vermeiden. Aus D-Aminosäuren bestehende Peptide (D-Peptide) sind potentielle Kandidaten zur Erfüllung dieser Kriterien. Sie gelten als Substanzen, die im Vergleich mit den jeweiligen L-Enantiomeren eine reduzierte Proteasesensitivität und reduziertes immunogenes Potential aufweisen (Schumacher *et al.*, 1996). Bei der chemischen Synthese der D-Peptide kann das Peptid um beliebige Marker z.B. Detektionsmarker erweitert werden. Gleichzeitig kann eine chemische Derivatisierung erfolgen, z.B. durch Einfügen von chemischen Gruppen, die die Permeabilität über die Blut-Hirn-Schranke erhöhen (Witt *et al.*, 2001). Zur Identifizierung von D-Peptiden als $A\beta$ -Liganden wurde in der vorliegenden Arbeit das Spiegelbild-Phagen-Display-Verfahren verwendet.

6.1. Aus einer Peptid-Bibliothek wurden mit D-A β ₁₋₄₂ als Target Peptide selektiert

6.1.1. In Selektion 1 wurden verschiedene Peptide selektiert

Für das Phagen-Display-Verfahren wurde eine kommerziell erhältliche Peptid-Bibliothek mit 12 randomisierten Aminosäuren und einer vom Hersteller angegebenen Variabilität von ca. 2×10^9 unterschiedlichen Peptid-Varianten ausgewählt. In der Selektion 1 gegen Biotinyl-D-A β ₁₋₄₂ (Bio-D-A β ₁₋₄₂) als Target wurden aus dieser Bibliothek in vier Selektionsrunden verschiedene Peptide selektiert (siehe Abbildung 5-5). Aufgrund des häufigen Auftretens der Aminosäuresequenz: Q S H Y R H I S P A Q V (Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code) wurde davon ausgegangen, dass diese Sequenz ein Peptid beschreibt, das eine signifikante Affinität zum Target hat. Das chemisch synthetisierte D-Enantiomer dieses Peptids wurde in Bindungsexperimente eingesetzt.

6.1.2. In der Selektion 1 gegen L-A β ₁₋₄₂ wurde keine dominierende Aminosäuresequenz selektiert

Die Selektion gegen L-A β diente als Kontrolle, ob in dieser Selektion ähnliche Peptide selektiert werden wie in der Selektion gegen D-A β . In Selektion 1 gegen Biotinyl-L-A β ₁₋₄₂ (Bio-L-A β ₁₋₄₂) wurden Peptide mit heterogenen Aminosäuresequenzen selektiert. Es zeigt sich keine Präferenz für einzelne Aminosäuren, und eine dominierende Aminosäuresequenz wurde nicht selektiert. Ein Vergleich der Anreicherungsfaktoren für die einzelnen Aminosäuren für die Selektionen 1 gegen L-A β ₁₋₄₂ und D-A β ₁₋₄₂ (siehe Abbildung 5-7) zeigt, dass zwar einzelne Aminosäuren in beiden Selektion ähnliche Anreicherungsfaktoren aufweisen (Serin, Isoleucin), aber bei dem Großteil der Aminosäuren (u.a. Leucin, Methionin, Histidin) unterschiedliche Faktoren bestimmt wurden. Warum gegen L-A β keine dominierende Aminosäuresequenz selektiert wurde (siehe Abbildung 5-6), wurde nicht weiter untersucht, weil dies für die Zielsetzung der Arbeit nicht entscheidend war.

6.1.3. Während der Selektion lag A β u.a. in Form von Fibrillen vor

Für die Selektion wurde A β in einer Konzentration von 2,5 mM in Hexafluoroisopropanol (HFIP) aufgenommen und in Dimethylsulfoxid (DMSO) auf eine Konzentration von 250 μ M weiter verdünnt. Zur Untersuchung, in welcher Form A β während der Selektion vorlag, wurde eine Bio-L-A β_{1-42} -Lösung in HFIP/DMSO wie oben beschrieben vorbereitet und ein Aliquot im Elektronenmikroskop betrachtet (siehe Kapitel 5.4.). In dem Aliquot wurden zwei verschiedene Formen von A β -Aggregationen beobachtet: einerseits Fibrillen mit unbestimmter Länge und einem Durchmesser von 6 bis 10 nm, andererseits kürzere Filamente mit deutlich geringeren Durchmessern. Beide A β -Formen sind in der Literatur beschrieben. Die Filamente werden als Protofibrille oder Protofilamente bezeichnet (Harper *et al.*, 1997; Walsh *et al.*, 1997; Walsh *et al.*, 1999, Pallitto und Murphy, 2001). Walsh *et al.* stellten fest, dass die Filamente durchschnittlich einen Durchmesser von 4-10 nm und eine Länge von < 200 nm aufweisen (Walsh *et al.*, 1997). Für beide A β -Formen wurde *in-vitro* eine cytotoxische Wirkung nachgewiesen (Walsh *et al.*, 1999). Im Folgenden wird für die Filamente der Ausdruck Protofilamente verwendet.

Nach Burdick *et al.* stehen die aggregierten A β -Fibrillen im Gleichgewicht mit A β -Monomeren (Burdick *et al.*, 1992). Dies spricht für eine Anwesenheit von Monomeren im Aliquot, die mit der angewendeten Methode nicht nachgewiesen werden konnten. Wie bei Harper *et al.* erwähnt, kann man mit einer einzelnen Methode nicht alle Intermediate der A β -Fibrillenbildung detektieren und quantifizieren (Harper *et al.*, 1999). Eine Anwesenheit verschiedener Intermediate im untersuchten Aliquot kann also nicht ausgeschlossen werden.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten, dass es bei den Vorbereitungen der in die Selektion 1 eingesetzten A β -Lösungen trotz der Verwendung von HFIP und DMSO zu einer Bildung von Biotinyl-A β_{1-42} -Fibrillen in DMSO kam und demzufolge A β während der Selektion u. a. in fibrillärer Form vorlag. Eine Selektion gegen A β in Form von Fibrillen ist grundsätzlich möglich, kann aber nicht vorausgesetzt werden, da in der A β -Lösung mit hoher Wahrscheinlichkeit noch weitere A β -Moleküle mit anderer Struktur anwesend waren.

6.2. D-Pep1 bindet an synthetisches L-A β ₁₋₄₂

In einer Spiegelbild-Phagen-Display-Selektion gegen Peptide wird das D-Enantiomer des zu untersuchenden Target (D-Target) in die Selektion eingesetzt (siehe Kapitel 2.2.4.). In der vorliegenden Arbeit wurde Bio-D-A β ₁₋₄₂ als Target verwendet. Verläuft eine solche Selektion erfolgreich, werden L-Peptide selektiert, die an D-A β ₁₋₄₂ binden. Nach dem Prinzip der Spiegelbild-Phagen-Display-Verfahren müsste das D-Enantiomer eines selektierten Peptids an L-A β ₁₋₄₂ binden.

Zur Untersuchung, ob das D-Enantiomer des dominierenden Peptids aus der oben aufgeführten Selektion 1 (D-Pep1) mit der Aminosäuresequenz Q S H Y R H I S P A Q V an L-A β ₁₋₄₂ bindet, wurden Fluoreszenz-Spektroskopie-Titrations-Experimente durchgeführt. Das chemisch synthetisierte, mit Fluorescein markierte D-Pep1 (Fluo-D-Pep1) wurde in PBS mit 1 mM Natriumdodecylsulfat (SDS), pH 7,5, gelöst und L-A β ₁₋₄₂, gelöst in Hexafluoroisopropanol, (HFIP), hinzutitriert. Die Fluoreszenzmessungen ergaben einen Anstieg der Fluoreszenz mit steigender Konzentration an A β . Die Bindung von Fluo-D-Pep1 an synthetisches L-A β ₁₋₄₂ wurde somit nachgewiesen.

Zur Abschätzung der Dissoziations-Gleichgewichts-Konstante (K_D -Wert) wurde zunächst eine nicht-lineare Regressionsanalyse unter der Voraussetzung einer bimolekularen Reaktion durchgeführt. Die resultierende Ausgleichskurve beschreibt die Messwerte nicht optimal (siehe Abbildung 5-17). Durch eine nicht-lineare Regression unter Aufhebung der Voraussetzung einer bimolekularen Reaktion wurde ein K_D -Wert von 0,4 μ M abgeschätzt und eine verbesserte Anpassung der Ausgleichskurve an die Messwerte erreicht (siehe Abbildung 5-18). Das Ergebnis dieser nicht-linearen Regressionen legt die Vermutung nahe, dass nicht ein sondern mehrere A β -Moleküle an ein D-Pep1-Molekül binden. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen wurde eine Reaktionsstöchiometrie zwischen Fluo-D-Pep1 und L-A β ₁₋₄₂ von 1:11 ermittelt (siehe Kapitel 5.5.2.). Dabei kann nicht mit Sicherheit festgestellt werden, ob der Wert 11 einen Durchschnittswert darstellt, d.h. unter den gegebenen Versuchsbedingungen binden durchschnittlich 11 A β -Moleküle an ein D-Pep1, oder ein fester Wert ist, d.h. ein D-Pep1 bindet exakt an 11 A β -Moleküle.

In Vorversuchen mit TBST und PBS ohne SDS als Lösungsmittel für Fluo-D-Pep1 erfolgte während Durchführung der Titration eine Aggregation von A β . Die gebildeten A β -Aggregate führten zu einer Streuung des Fluoreszenzlichts. Eine reproduzierbare Aufnahme des Fluoreszenzsignals war nicht möglich. Erst bei Verwendung von PBS mit 1 mM SDS als Lösungsmittel konnten reproduzierbare Fluoreszenztitrationen durchgeführt werden. Dies lässt den Schluss zu, dass es durch die Anwesenheit von 1 mM SDS zu einer verlangsamten Aggregation der A β -Moleküle kam. Als wichtige Faktoren bei der Aggregation von A β werden hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen angesehen (Fraser *et al.*, 1991; Hilbich *et al.*, 1992). Die Ausbildung dieser Wechselwirkungen wird durch das Detergenz SDS gestört. Dadurch kann es zu einer verlangsamten Aggregation und zur Bildung von Oligomeren gekommen sein, die die Detektion des Fluoreszenzsignals nicht störten. Die Bindung der Fluo-D-Pep1-Moleküle an solche Oligomere würde das Ergebnis erklären, dass ein Fluo-D-Pep1-Molekül an mehrere L-A β ₁₋₄₂-Moleküle bindet. Ein anderer Grund für die ermittelte nicht-bimolekulare Reaktionsstöchiometrie könnte eine teilweise Denaturierung von A β durch SDS sein. In diesem Falle nimmt nicht jedes A β -Molekül eine Konformation ein, an die Fluo-D-Pep1 binden kann. Unter dieser Annahme würden den berechneten Werten zufolge zehn von elf A β -Molekülen eine Konformation annehmen, an die D-Pep1 nicht bindet.

6.3. D-Pep1 bindet spezifisch an natürlich vorkommendes A β

6.3.1. D-Pep1 markiert Alzheimer-Plaques

Durch die Fluoreszenz-Spektroskopie-Titrations-Experimente wurde eine Bindung von D-Pep1 an synthetisches A β nachgewiesen (siehe Kapitel 6.2). Im diesem Zusammenhang war es interessant, ob D-Pep1 auch an natürlich vorkommendes A β bindet. Zur Untersuchung dieses Punktes wurden paraffin-eingebettete und formalin-fixierte Gewebeschnitte aus dem Gehirn einer ehemaligen Alzheimer-Patientin mit Fluo-D-Pep1 und einem Cy3-markiertem Anti-A β_{1-16} -Antikörpersystem (Cy3-Anti-A β_{1-16}) inkubiert. Wenn D-Pep1 die gleichen Strukturen im Gewebeschnitt markiert wie Cy3-Anti-A β_{1-16} wäre damit eine Bindung an natürlich vorkommendes A β nachgewiesen.

Neuritische Alzheimer-Plaques können aus verschiedenen Bereichen bestehen (siehe Kapitel 2.1.4.). In den Arbeitsgruppen von Colin Masters und Konrad Beyreuther wurde 1985 erstmalig A β aus dem „Kern“-Bereich von Plaques isoliert (Masters *et al.*, 1985). Der Hauptbestandteil des „Kern“-Bereichs ist fibrilläres A β (Roher *et al.*, 1993). Im „Hof“-Bereich werden neben fibrillären Ablagerungen auch amorphe Aggregate gefunden (Rudelli *et al.*, 1984) (siehe Kapitel 2.1.4.). Es ist gelungen, mit Fluo-D-Pep1 die „Kern“-Bereiche der Alzheimer-Plaques zu markieren. Die gleichen Strukturen wurden auch durch Cy3-Anti-A β_{1-16} markiert (siehe Abbildung 5-19). Eine Bindung von Fluo-D-Pep1 an natürlich vorkommendes A β wurde damit nachgewiesen.

In parallel durchgeführten Färbungen mit Gewebeschnitten aus dem Gehirn eines Nicht-Alzheimer-Patienten wurden keine plaque-ähnlichen Strukturen angefärbt (siehe Kapitel 5.6.4.).

6.3.2. D-Pep1 markiert keine anderen Amyloid-Ablagerungen

AD ist eine Krankheit, die zu den Amyloidosen gezählt wird. Amyloidosen sind durch fibrilläre Ablagerungen von normalerweise löslichen Proteinen charakterisiert, die alle als gemeinsames Merkmal u.a. die Bildung von Fibrillen und β -Faltblatt-Konformation aufweisen.

Zur Untersuchung, ob D-Pep1 spezifisch an A β -Ablagerungen oder allgemein an Amyloid-Fibrillen bindet, wurden erste Färbe-Experimente mit Fluo-D-Pep1 an Gewebeschnitten von drei Patienten durchgeführt, bei denen verschiedene Amyloidosen diagnostiziert worden waren (siehe Kapitel 5.7.). Als Kontrolle erfolgten Färbungen von Alzheimer-Plaques unter gleichen Bedingungen (siehe Kapitel 5.7., Abbildung 5-27). Die A β -Ablagerungen wurden durch Fluo-D-Pep1 markiert, die anderen Amyloid-Ablagerungen nicht (siehe Kapitel 5.7., Abbildungen 5-28 bis 5-31). Diesen ersten Ergebnissen zufolge bindet D-Pep1 spezifisch an A β -Ablagerungen. Hier sollen weitere Experimente folgen, um die Spezifität der D-Pep1-Bindung an A β definitiv nachzuweisen.

6.3.3. D-Pep1 markiert A β -Ablagerungen in Blutgefäßen

Die in der Arbeit verwendeten Gewebeschnitte stammen von einer verstorbenen Alzheimer-Patientin, bei der neben den Alzheimer-typischen Veränderungen zusätzlich eine kongophile Angiopathie (CAA) diagnostiziert worden war.

Eine erste Isolierung von A β aus Ablagerungen im Gehirn gelang 1984 Glenner und Wong (Glenner und Wong, 1984b). Sie reinigten aus Ablagerungen an zerebrovasculären Blutgefäßwänden ein Peptid mit einem Molekulargewicht von ca. 4 kDa und klärten einen Teil der Aminosäuresequenz auf. 1985 konnte in den Arbeitsgruppen von Colin Masters und Konrad Beyreuther ein Peptid aus Alzheimer-Plaques isoliert werden, welches die gleiche Größe und Aminosäuresequenz aufwies (Masters *et al.*, 1985). Damit wurde nachgewiesen, dass A β -Aggregate sowohl in Form von Plaques als auch an Blutgefäßwänden abgelagert werden. Bei CAA kommt es zur Ablagerung von A β -Fibrillen in Blutgefäßen (Glenner und Wong, 1984a). Nach Glenner *et al.* (Glenner *et al.*, 1981) weisen über 80 % aller Alzheimer-Patienten solche Ablagerungen an Blutgefäßwänden auf. Mit Fluo-D-Pep1 wurde natürlich vorkommendes A β sowohl in Alzheimer-Plaques als auch in Blutgefäßen markiert.

6.3.4. Je nach Vorbehandlung der Gewebeschnitte wurden unterschiedliche Strukturen im Gewebe angefärbt

Aufgrund der Beobachtung, dass Fluo-D-Pep1 nur den „Kern“-Bereich der Plaques anfärbt, in dem A β in Form von Fibrillen vorliegt, und nicht den „Hof“-Bereich, der hauptsächlich aus

amorphem A β besteht und nur vereinzelt A β -Fibrillen beinhaltet, könnte man darauf schließen, dass Fluo-D-Pep1 nur an A β -Fibrillen bindet. Dabei muss berücksichtigt werden, dass eine Markierung des „Hof“-Bereichs durch Cy3-Anti-A β_{1-16} bei gleicher Vorbehandlung auch nicht erfolgt. Die fehlende Markierung „Hof“-Bereichs durch Fluo-D-Pep1 kann durch die Art der Vorbehandlung der Gewebeschnitte bedingt sein.

Die Markierung der A β -Ablagerungen durch Cy3-Anti-A β_{1-16} und Fluo-D-Pep1 war abhängig von der Vorbehandlung der Gewebeschnitte. Bei einer Vorbehandlung mit der alkalischen NaCl-Lösung wurden sowohl durch Cy3-Anti-A β_{1-16} , als auch durch Fluo-D-Pep1 nur die „Kern“-Bereiche der Alzheimer-Plaques markiert (siehe Abbildung 5-19). Im Gegensatz dazu wurden bei einer Vorbehandlung mit Ameisensäure und Markierung mit Cy3-Anti-A β_{1-16} Bereiche im „Kern“ und im „Hof“ der Plaques markiert (siehe Abbildung 5-22).

Die in der Arbeit verwendeten Gewebeschnitte waren in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet worden. Ohne eine Vorbehandlung der Gewebeschnitte wurden die Alzheimer-Plaques weder durch Cy3-Anti-A β_{1-16} noch durch Fluo-D-Pep1 gefärbt. Formalin ist eine reaktive elektrophile Substanz, die in Geweben zu einer Quervernetzung von Proteinen, Nukleinsäuren und Polysacchariden führt. Während der Färbung von Formalin-fixiertem Gewebe kann es durch die Methylen-Vernetzung zu einer limitierten Permeation des färbenden Agens durch das Gewebe und zur verringerten Zugänglichkeit der Epitope kommen. Wahrscheinlich ist die Ameisensäure-Vorbehandlung effektiver bezüglich der Beseitigung von Formaldehyd-Verknüpfungen als die alkalische NaCl-Lösung, so dass hier neben den A β -Ablagerungen im „Kern“-Bereich auch die A β -Ablagerungen im „Hof“-Bereich der Plaques für die markierenden Antikörper zugänglich sind. Eine Färbung der Alzheimer-Plaques mit Fluo-D-Pep1 wurde in diesem Fall nicht beobachtet (siehe Abbildung 5-22).

Die fehlende Markierung der „Hof“-Bereiche durch Fluo-D-Pep nach der Vorbehandlung mit Ameisensäure kann durch die pH-Sensitivität von Fluorescein begründet sein. Das Optimum für das Fluorescein-Fluoreszenz-Signal liegt im alkalischen Bereich bei pH 9,5. Durch eine Verringerung des pH-Werts fällt die Intensität der Fluorescein-Fluoreszenz-Emission. Bei einem pH-Wert von 5 kann kaum noch ein Signal nachgewiesen werden (siehe <http://www.probes.com/handbook/figures/0572.html>). Trotz fünfmaligem Waschen der Gewebeschnitte nach der Ameisensäure-Vorbehandlung mit PBS, pH 7,4, könnte der pH-

Wert im Gewebe durch die Behandlung mit Ameisensäure gesunken und damit das Fluorescein-Fluoreszenzsignal abgeschwächt worden sein. Durch Färbeexperimente mit D-Pep1 mit einem nicht-pH-abhängigen Fluoreszenzmarker oder den Einsatz eines Waschpuffers, der für eine Verschiebung des pH-Werts im Gewebe in den alkalischen Bereich sorgt, soll dieser Punkt im Anschluß an die Promotionsarbeit weiter untersucht werden.

Ein weiterer Grund für die fehlende Markierung der Plaques mit Fluo-D-Pep1 nach der Ameisensäure-Vorbehandlung könnte eine Änderung der A β -Oligomer- bzw. Fibrillen-Struktur sein. Masters *et al.* (Masters *et al.*, 1985) führten Löslichkeitsstudien von Amyloid-Plaques in verschiedenen Lösungsmitteln durch. Sie stellten fest, dass es durch Zugabe von Ameisensäure ($\geq 70\%$) zu einer vollständige Lösung der Plaques kommt (Masters *et al.*, 1985). Zwar erfolgt die Behandlung der Gewebeschnitte mit Ameisensäure nur für 2 min, aber eventuell wird in dieser Zeit die A β -Oligomer- bzw. Fibrillen-Struktur in den Plaques derart geändert, dass D-Pep1 nicht mehr binden kann. Im Gegensatz dazu wurde die Bindung des Antikörper nicht gestört.

Das fehlende Fluorescein-Fluoreszenzsignal im „Hof“-Bereich der Plaques nach Vorbehandlung mit alkalischer NaCl-Lösung basiert nicht auf einem Fehlen von A β -Molekülen in diesem Bereich. Ein solches Fehlen von A β -Molekülen wäre z.B. durch ein Auswaschen der A β -Moleküle während der Vorbehandlung mit der alkalischen NaCl-Lösung denkbar. Zur Untersuchung dieses Punktes wurde ein Färbeexperiment mit beiden Vorbehandlungsmethoden durchgeführt (siehe Abbildung 5-28). Nach der Vorbehandlung mit alkalischer NaCl-Lösung und Inkubation mit Fluo-D-Pep1 wurden nur die „Kern“-Bereiche in den Plaques markiert. In der nachfolgenden Färbung am gleichen Gewebeschnitt mit Ameisensäure-Behandlung und Inkubation mit Cy3-Anti-A β_{1-16} wurden die „Kern“- und die „Hof“-Bereiche der Plaques angefärbt (siehe Abbildung 5-28). Im „Hof“-Bereich der Plaques ist demnach auch nach der Behandlung mit alkalischer NaCl-Lösung A β vorhanden, kann aber mit Fluo-D-Pep1 nicht nachgewiesen werden.

Ob diese fehlende Markierung durch eine Epitop-Maskierung begründet ist, oder ob D-Pep1 nicht an A β im „Hof“-Bereich der Plaques bindet, soll durch weiterführende Experimente

untersucht werden. Dabei werden Kryo-Gewebeschnitte zum Einsatz kommen, um die Epitop-Maskierung durch Formalin zu vermeiden.

6.3.5. Teilweise wurden unterschiedliche Bereiche der A β -Ablagerungen gefärbt

Zum Teil wurden durch Fluo-D-Pep1 und Cy3-Anti-A β ₁₋₁₆ zwar die gleichen A β -Ablagerungen gefärbt, aber innerhalb dieser Ablagerungen unterschiedliche Bereiche (siehe u.a. Abbildung 5-24). Diese Beobachtung kann zum einen durch eine Erkennung unterschiedlicher Epitope durch D-Pep1 und den Antikörper begründet sein. Zum anderen könnte eine Konkurrenz zwischen D-Pep1 und dem Antikörper um die gleichen Epitope der Grund sein. Dies würde auch die Beobachtung erklären, dass die Fluoreszenzsignale der Einzelfärbungen mit den beiden Markern intensiver sind als die Signale bei Doppelfärbungen (siehe Kapitel 5.6.2.).

6.3.6. Diagnose mit D-Pep1?

Die Weiterentwicklung von Liquoruntersuchungen und bildgebenden Verfahren wie Magnetresonanztomographie (MRT), Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und Computertomographie (CT) für den Einsatz in der Alzheimer-Diagnostik ist Gegenstand derzeitiger Forschung (Fox *et al.*, 2001; Hampel *et al.*, 1999; Schröder und Pantel, 1999). Trotz neuer Erkenntnisse auf diesen Gebieten ist die definitive Diagnose der Alzheimer-Krankheit bisher erst *post mortem* durch die pathohistologische Untersuchung von Gehirngewebeschnitten der verstorbenen Person und das Auffinden von Biomarkern wie Alzheimer-Plaques und/oder neurofibrillären Bündeln (siehe Kapitel 2.1.1.) möglich. Biomarker sind definiert als anatomische, physiologische, biochemische oder molekulare Parameter, die mit dem Auftreten eines spezifischen Erkrankungsstadium assoziiert sind (Definition nach : <http://www.biomarkers.org/NewFiles/about.html>). Ein Ziel derzeitiger Bemühungen ist es, neue Substanzen zur Markierung von A β -Ablagerungen zu entwickeln, um die bildgebenden Verfahren weiter zu verbessern und um eine *pre mortem* Diagnose durch Markierung der Alzheimer-Plaques *in vivo* zu ermöglichen.

Ein Forschungsansatz zur Verbesserung der Visualisierung von A β -Ablagerungen zur Alzheimer-Diagnostik ist die Derivatisierung von Substanzen, die als A β -Liganden bekannt

sind. Es wurden u.a. Versuche mit Kongo-Rot-Derivaten (Styren *et al.*, 2000) und Thioflavin-T-Derivaten (Klunk *et al.*, 2001) durchgeführt und eine *in-vitro*-Markierung von Plaques und neurofibrillären Bündeln nachgewiesen. Die experimentell am ausführlichsten getestete Substanz ist ein 6-Dialkylamino-2-Naphthylethyliden-Derivat (Agdeppa *et al.*, 2001). Mit dieser Substanz wurden mit PET Plaques und neurofibrilläre Bündel in lebenden Alzheimer-Patienten nachgewiesen (Shoghi-Jadid *et al.*, 2002). Allerdings stellten die Autoren fest, dass die Substanz zum Teil im Körper metabolisiert wird, was zu Nebenwirkungen führen kann und einen erhöhten Einsatz an Substanz notwendig macht (Shoghi-Jadid *et al.*, 2002).

Die oben aufgeführten A β -Liganden binden sowohl an Plaques als auch an neurofibrilläre Bündel. Es werden allgemein Amyloid-Ablagerungen nachgewiesen. Wie schon erwähnt, sind Amyloidosen durch fibrilläre Protein-Aggregate charakterisiert, welche als gemeinsames Strukturmotiv eine β -Faltblatt-Konformation aufweisen. An diese Amyloid-Fibrillen lagern sich die aufgeführten Substanzen an. Zur differentiellen Diagnostik ist es wichtig, einen Detektionsmarker zu entwickeln, der spezifisch an Alzheimer-Plaques bindet, d. h. nur an die A β -Ablagerungen bindet. Wengenack *et al.* erreichten durch die Injektion von 200 μg ^{125}I -markiertem A β_{1-40} in transgenen Mäusen eine spezifische Markierung von Alzheimer-Plaques *in vivo* (Wengenack *et al.*, 2000). Problematisch ist, dass der toxische Vorgang der Aggregation und der Ablagerung von A β wahrscheinlich durch die Injektion von A β noch verstärkt wird, weil die Konzentration an A β künstlich erhöht wird.

D-Pep1 bindet ersten Färbeexperimenten zufolge spezifisch an A β -Ablagerungen und nicht allgemein an Amyloid-Ablagerungen. Dieser Punkt ist viel versprechend für einen Einsatz von D-Pep1 als Detektionsmarker zur differentiellen Diagnostik von AD.

Für die Bindung zwischen A β und D-Pep1 wurde *in vitro* ein K_D -Wert im mikromolaren Bereich ermittelt (siehe Kapitel 5.5.2.). Ob die Affinität der Bindung zwischen D-Pep1 und A β hoch genug für eine *in-vivo*-Markierung von Alzheimer-Plaques und die Detektion mit Hilfe der bildgebender Verfahren ist, muss durch weiterführende Experimente noch untersucht werden. Zurzeit laufen erste Versuche zur Untersuchung des potentiellen Einsatzes von D-Pep1 in diagnostischen Verfahren (siehe Kapitel 6.7.). Ideal wäre eine *in-vivo*-Markierung von Plaques für den Messzeitraum der Detektion und eine Dissoziation von D-Pep1 nach der Detektion, so dass der Marker ausgeschieden werden kann.

6.4. D-Pep1 hat Einfluss auf die Cytotoxizität von A β

Die Pathogenese der AD und die Rolle von A β ist noch unklar (siehe Kapitel 2.1.6.). Es wird vermutet, dass A β über Bindung an Membranrezeptoren oder durch Quervernetzung von Rezeptoren zu einer Aktivierung von Signaltransduktionsmechanismen führt, die die Apoptose oder Nekrose der Zelle induzieren (Bamberger und Landreth, 2001; Kawahara und Kuroda, 2000; Small *et al.*, 2001). Es wurde z.B. eine Bindung von A β an nicotinerge und cholinerge Rezeptoren nachgewiesen (Small *et al.*, 2001). Eine indirekte Aktivierung solcher Mechanismen über die vorherige Aktivierung von Mikroglia-Zellen oder Astrozyten wird ebenfalls vermutet (Übersicht bei (Small *et al.*, 2001)). Ein weiterer Ansatz zur Klärung der neurotoxischen Wirkung von A β ist die Bildung von Kalzium-Kanälen durch das Peptid (Arispe *et al.*, 1993a). Durch die Ausbildung solcher Kanäle würde es zur Störung des elektrochemischen Potentials an der Membran kommen.

Weiterhin ist noch nicht vollständig geklärt, in welchen Formen A β toxisch ist (Selkoe, 2001; Soto, 1999). Simmons *et al.* wiesen für lösliches A β in Knäuelkonformation ("random coil") kaum einen bis keinen toxischen Effekt nach. Erst A β in β -Faltblatt-Konformation ist toxisch (Simmons *et al.*, 1994). Lambert *et al.* publizierten Versuche, nach denen lösliche, nicht-fibrilläre Oligomere toxisch sind (Lambert *et al.*, 1998). Verschiedene Untersuchungen sprechen dafür, dass A β in fibrillärer Form toxisch ist (Lorenzo und Yankner, 1994; Pike *et al.*, 1993; Selkoe *et al.*, 1997). Walsh *et al.* wiesen einen cytotoxischen Effekt von Protofilamenten nach (Walsh *et al.*, 1999).

6.4.1. Einfluss von D-Pep1 ist abhängig vom Zeitpunkt der Zugabe bzw. der Konzentration an D-Pep1

Der Einfluss von D-Pep1 auf die Cytotoxizität von L-A β ₁₋₄₂ wurde durch zwei Experimente untersucht, die sich in der Vorbereitung der A β -Lösungen und im Zeitpunkt der Zugabe von D-Pep1 zur A β -Lösung unterschieden.

Im ersten Versuch wurde L-A β in 8 M Harnstoff in Glycin-NaOH (pH 10) aufgenommen. Durch die Verwendung von Harnstoff und eines hohen pH-Wertes sollte die Aggregation von

A β verhindert werden (Burdick *et al.*, 1992; Pallitto und Murphy, 2001). D-Pep1 wurde in PBS gelöst und die A β -Lösung darin verdünnt. Prinzip war, dass die Aggregation von A β erst in Gegenwart von D-Pep1 stattfinden sollte.

Im zweiten Versuch wurde der Einfluss von D-Pep1 auf die Cytotoxizität von bereits gebildeten A β -Fibrillen untersucht.

Die Ergebnisse zur Untersuchung des Einflusses von D-Pep1 auf die Cytotoxizität von A β lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- 1.) Bei Zugabe von 50 μ M bzw. 100 μ M D-Pep1 zeigte sich ein Einfluss auf die Cytotoxizität von 1 μ M A β , wenn die Zugabe von D-Pep1 zum A β vor der A β -Aggregation erfolgte. Ohne D-Pep1 lag die Lebensfähigkeit der Zellen bei 60 %. Bei Zugabe von 100 μ M D-Pep1 stieg die Lebensfähigkeit auf 100 % (siehe Abbildung 5-33).
- 2.) Unter gleichen Versuchsbedingungen wie bei 1.) war durch Zugabe von D-Pep1-Konzentrationen ≥ 500 μ M kein Einfluss auf die Cytotoxizität von 1 μ M A β zu erkennen. Die Lebensfähigkeit mit D-Pep1-Konzentrationen ≥ 500 μ M und ohne D-Pep1 lag bei 60 % (siehe Abbildung 5-33).
- 3.) Durch die Zugabe von D-Pep1-Konzentrationen ≥ 1 μ M zu 1 μ M A β nach der Fibrillenbildung stieg die Lebensfähigkeit der Zellen an. Eine Lebensfähigkeit der Zellen von 100 % wurde nicht erreicht (siehe Abbildung 5-36, A).
- 4.) Durch die Zugabe von D-Pep1-Konzentrationen ≥ 1 μ M zu 10 μ M A β nach der Fibrillenbildung zeigte sich kaum ein bzw. kein Einfluss auf die Cytotoxizität von A β (siehe Abbildung 5-36, B).

6.4.2. Interpretation der Ergebnisse der Cytotoxizitätstests anhand eines kinetischen Modells zur *in-vitro*-A β -Fibrillenbildung

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, wie D-Pep1 Einfluss auf die cytotoxische Wirkung von A β haben kann.

Eine Möglichkeit ist die Bindung von D-Pep1 an A β -Monomere. In der Arbeitsgruppe von Peter Lansbury wurde ein Modell zur Erklärung des Prozesses der *in-vitro*-Fibrillenbildung entwickelt (Harper und Lansbury, 1997). Stark vereinfacht wird in diesem Nukleations-Elongations-Modell der Prozess der Fibrillenbildung in 2 Phasen eingeteilt. In der ersten

Phase findet die Bildung von A β -Oligomeren aus Monomeren statt. Die entstandenen Oligomere sind nicht stabil und zerfallen wieder zu Monomeren. Eine Reaktion höherer Ordnung liegt vor. Erst wenn eine noch nicht definierte Anzahl von zusammengelagerten Monomeren überschritten wird, bilden sie einen Nukleationskeim. Dieser Nukleationskeim ist Ausgangspunkt für die zweite Phase der Fibrillenbildung, die eine Reaktion erster Ordnung darstellt. Es kommt zu einem exponentiellen Anstieg der Konzentration an Fibrillen. Dabei ist die Dissoziations-Gleichgewichts-Konstante ($K_{OFF\ 2}$) deutlich niedriger als die Assoziations-Gleichgewichts-Konstante ($K_{ON\ 2}$) (Harper und Lansbury, 1997; Jarrett *et al.*, 1993; Jarrett und Lansbury, 1993). Abbildung 6-1 zeigt ein Reaktionsschema dieser vereinfachten Darstellung.

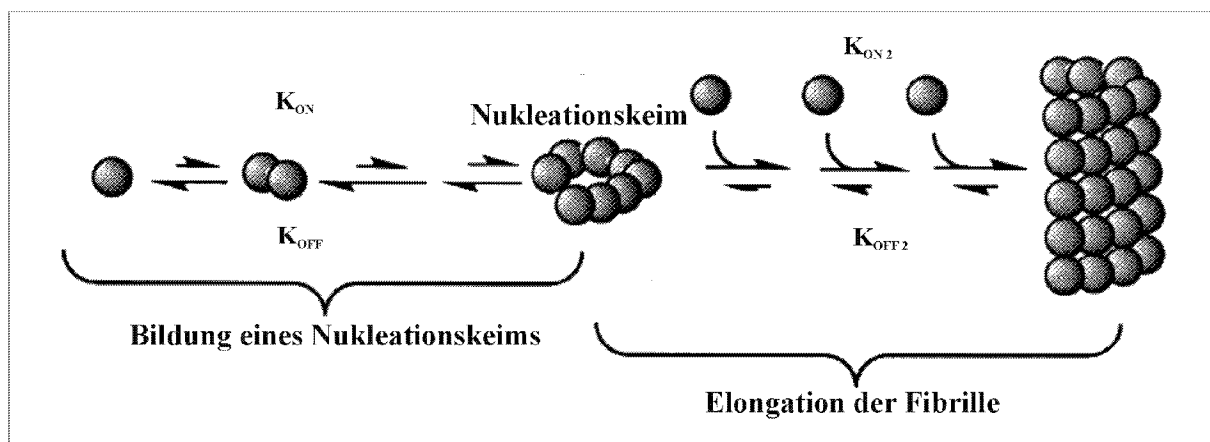


Abbildung 6-1: Schematische Darstellung des Nukleations-Elongations-Modells zur *in-vitro*-Fibrillenbildung nach Lansbury *et al.* (modifiziert nach Harper und Lansbury, 1997)

Durch die Bindung von D-Pep1 an einen A β -Monomer könnte durch die freiwerdende Bindungsenergie ein nicht-toxischer Monomer-Zustand stabilisiert werden, und eine Interaktion mit anderen Monomeren bleibt aus. Ein Teil der Monomere ist aus dem Gleichgewicht entzogen, die Bildung von Nukleationskeimen und damit die Fibrillenbildung oder die Bildung anderer toxischer A β -Produkte wird geringer. Dies würde erklären, warum bei Zugabe von 100 μ M D-Pep1 zu 1 μ M A β vor Fibrillenbildung die Lebensfähigkeit der Zellen auf 100 % steigt (siehe Abbildung 5-33).

Gegen diese Wirkungsweise von D-Pep1 auf die Cytotoxizität des A β spricht, dass bei Zugabe von D-Pep1-Konzentrationen ≥ 500 μ M der positive Effekt von D-Pep1 auf die A β -

Cytotoxizität aufgehoben wird (siehe Abbildung 5-33). Die Lebensfähigkeit der Zellen lag mit D-Pep1-Konzentrationen $\geq 500 \mu\text{M}$ und ohne D-Peptid bei 60 %.

Der Einfluss von D-Pep1 auf die Cytotoxizität von $1 \mu\text{M}$ A β kann durch die Bindung von D-Pep1 an Fibrillen und die dadurch erfolgende Blockierung von A β -Sequenzbereichen bedingt sein, die in den Mechanismus der Cytotoxizität von A β involviert sind. Als Beispiel fanden Giulian *et al.* durch selektive Modifikationen der Aminosäuren 13 bis 16 (H H Q K, Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code) von A β heraus, dass dieser Sequenzbereich anscheinend für die Bindung von A β an Mikroglia-Zellen essentiell ist. Durch die Bindung von A β erfolgt in Mikroglia-Zellen die Induktion der Sekretion von Neurotoxinen (Giulian *et al.*, 1995; Giulian *et al.*, 1998). Eine Blockierung solcher Sequenzbereiche durch einen Liganden wäre eine denkbare Möglichkeit, um eine plaque-induzierte Aktivierung der Mikroglia-Zellen zu verhindern. Die Blockierung dieser Bindungsstellen und fehlende Aktivierung der Mikroglia-Zellen ist nicht der Grund für den Rückgang der Cytotoxizität im vorliegenden Testsystem, da hier keine Mikroglia-Zellen vorhanden waren. Dieses Beispiel soll zur Veranschaulichung des Prinzips dienen.

Dieser Erklärungsversuch bezüglich der Blockierung von einzelnen Sequenzbereichen erklärt aber nicht die Beobachtung, dass bei Zugabe von D-Pep1-Konzentrationen $\geq 500 \mu\text{M}$ **vor** Fibrillenbildung eine Lebensfähigkeit der Zellen von ca. 60 % und bei Zugabe von D-Pep1-Konzentrationen $\geq 500 \mu\text{M}$ **nach** der Fibrillenbildung eine Lebensfähigkeit von ca. 80 % gemessen wurde.

D-Pep1 könnte zwei voneinander unabhängige Effekte bewirken. Unter thermodynamischen Gesichtspunkten ist es denkbar, dass A β -Liganden durch die Bindung an A β zur Förderung der Fibrillenbildung führen. Es wurden bereits Peptide und andere Substanzen gefunden, die die A β -Fibrillenbildung fördern (Kuner *et al.*, 2000; Lowe *et al.*, 2001). In der Annahme einer solchen Förderung der Fibrillenbildung in Abhängigkeit von der D-Pep1-Konzentration kann es durch die Bindung von D-Pep1 an A β zu einer verstärkten Aggregation von A β zu Oligomeren gekommen sein, wodurch vermehrt Fibrillen auftraten, die wiederum einen toxischen Effekt auf die Zellen hatten. Zu einer verstärkten Aggregation zu Oligomeren könnte es z.B. durch eine Stabilisierung von A β -Nukleationskeimen durch die Bindung von

D-Pep1 kommen. Als zweiter möglicher Effekt ist eine Hemmung der Toxizität der Fibrillen denkbar.

Bei **Konzentrationen von 50 μM und 100 μM D-Pep1** könnte D-Pep1 die cytotoxische Wirkung von A β durch eine Bindung an die Fibrillen oder andere Aggregate durch die bereits erläuterte Blockierung von einzelnen Sequenzbereichen verringern. Bei **D-Pep1-Konzentrationen $\geq 500 \mu\text{M}$** tritt eventuell verstärkt ein aggregationsfördernder Effekt auf, was dazu führt, dass der toxizitätshemmende Effekt kompensiert wird und die Lebensfähigkeit der Zellen bei 60 % liegt. Das heisst, dass vermehrt Fibrillen entstehen, deren toxische Wirkung nicht mehr vollständig durch D-Pep1 inhibiert werden kann.

Die Beobachtung, dass bei Zugabe von D-Pep1-Konzentrationen $\geq 500 \mu\text{M}$ **vor** Fibrillenbildung eine Lebensfähigkeit der Zellen von ca. 60 % und bei Zugabe von D-Pep1-Konzentrationen $\geq 500 \mu\text{M}$ **nach** der Fibrillenbildung eine Lebensfähigkeit von ca. 80 % gemessen wurde, kann in diesem Zusammenhang auch erklärt werden. Durch eine aggregationsfördernde Wirkung von D-Pep1 könnte es zur verstärkten Bildung von A β -Fibrillen kommen. Durch diese erhöhte Fibrillen-Konzentration ist eine verstärkte Beeinträchtigung Lebensfähigkeit der Zellen denkbar.

Nicht mit dem Nukleations-Elongations-Modell und den vermuteten 2 Effekten des D-Pep1 lässt sich die Beobachtung erklären, dass der Einfluss von D-Pep1 bei Zugabe nach Fibrillenbildung nicht von der D-Pep1-Konzentration abhängig ist. Schon bei Zugabe von 2 μM D-Pep1 zu 1 μM A β wird eine Lebensfähigkeit der Zellen von ca. 80 % erreicht, welche auch durch Zugabe von zusätzlichem D-Pep1 nicht erhöht werden kann. Würde D-Pep1 die Cytotoxizität von Fibrillen hemmen, würde man einen Anstieg der Lebensfähigkeit mit steigender D-Pep1-Konzentration erwarten.

Die Ergebnisse der Cytotoxizitätstests können nicht vollständig in das Nukleations-Elongations-Modell eingeordnet werden.

6.4.3. Interpretation der Ergebnisse der Cytotoxizitätstests anhand eines erweiterten kinetischen Modells zur *in vitro*-A β -Fibrillenbildung

Durch Methoden wie Elektronenmikroskopie, Rastersondenmikroskopie, Massenspektroskopie und Messung der Lichtstreuung wurden in den letzten Jahren von verschiedenen Arbeitsgruppen A β -Filamente identifiziert, die einen geringeren Durchmesser

und eine geringere Länge als die vollausgebildeten Fibrillen hatten und als Protofibrille oder Protofilamente bezeichnet werden (Harper *et al.*, 1999; Walsh *et al.*, 1999). Harper *et al.* schlossen daraus, dass der Prozess der A β -Fibrillenbildung mehrstufig ist und nicht nur die vorher postulierten Stufen Monomer, Nukleationskeim und Fibrille umfasst.

Harper *et al.* erweiterten das Nukleations-Elongations-Modell zur *in-vitro*-Fibrillenbildung um die Protofilamente (Harper *et al.*, 1999). Dieses erweiterte Modell besteht aus vier Schritten: (1) Initiierung der Protofilamente durch Bildung von Nukleationskeimen, (2) Elongation der Protofilamente, (3) Bildung der Fibrillen durch Zusammenlagerung einzelner Protofilamente (4) und weitere Verlängerung der Fibrillen. Weiterhin wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen festgestellt, dass die aggregierten, unlöslichen Fibrillen nicht die alleinige Ursache für die toxische Wirkung von A β *in-vitro* sind. Intermediate des Prozesses der Fibrillenbildung wie u.a. Protofilamente sind ebenfalls toxisch bzw. toxischer als die Fibrille (Lansbury, 1999; Pallitto *et al.*, 1999; Walsh *et al.*, 1999, Pallitto und Murphy, 2001).

Werden die Ergebnisse der Cytotoxizitätstests im Rahmen des erweiterten Modells betrachtet, lassen sie folgende Vermutungen zu:

Wiederum wird angenommen, dass D-Pep1 zwei unterschiedliche Effekte auf die Cytotoxizität von A β hat. Bei **Konzentrationen von 50 μ M und 100 μ M D-Pep1** könnte D-Pep1 die cytotoxische Wirkung von A β durch eine Bindung an die Protofilamente oder andere Aggregate verringern. Dies kann u.a. durch eine Hemmung der Fibrillenbildung aus Protofilamenten und gleichzeitige Hemmung des cytotoxischen Effekts der Protofilamente bedingt sein. Toxische Fibrillen entstehen nicht, und die toxische Wirkung A β -Protofilamente wird inhibiert. Das setzt voraus, dass für die Cytotoxizität der Protofilamente und der Fibrillen unterschiedliche Mechanismen verantwortlich sind.

Bei **D-Pep1-Konzentrationen $\geq$ 500 μ M** tritt eventuell verstärkt der aggregationsfördernde Effekt auf, was dazu führt, dass der Toxizitätshemmende Effekt kompensiert wird und daraufhin die Lebensfähigkeit der Zellen bei 60 % liegt. Das heisst, es könnte eine größere Konzentration an Protofilamenten entstehen, deren toxische Wirkung nicht mehr vollständig durch D-Pep1 inhibiert werden kann.

Bei **Zugabe von D-Pep1 zu 1 μ M A β nach der A β -Fibrillenbildung** stieg die Lebensfähigkeit der Zellen an. Eine Lebensfähigkeit von 100 % wurde nicht erreicht. Der

Einfluss von D-Pep1 auf die A β -Cytotoxizität ist unter diesen Bedingungen nicht abhängig von der D-Pep1-Konzentration. Unter der Voraussetzung, dass bei diesem Versuch sowohl Fibrillen als auch Protofilamente und andere Oligomere in der A β -Lösung vorhanden waren und dass unterschiedliche Mechanismen für die Cytotoxizität der Protofilamente bzw. Fibrillen verantwortlich sind, kann man annehmen, dass nur noch ein Teil der Cytotoxizität durch Protofilamente bedingt wurde und nur dieser Teil der Cytotoxizität durch D-Pep1 gehemmt wird. Die Toxizität der vorhandenen A β -Fibrillen wird nicht gehemmt und die Lebensfähigkeit der Zellen steigt nur auf 80 % an. Wiederum vorausgesetzt, dass D-Pep1 die Cytotoxizität der Protofilamente spezifisch hemmt und die Cytotoxizität der Fibrillen nicht beeinflusst wird.

Bei **Zugabe von D-Pep1 zu 10 μ M A β nach der Fibrillenbildung** wurde kaum bzw. kein Einfluss auf die Cytotoxizität festgestellt. Hier sind wahrscheinlich bereits so viele toxische Fibrillen vorhanden, so dass der Einfluss von D-Pep1 sich nicht auf die Lebensfähigkeit der Zellen auswirkt.

6.4.4. Vermutungen, an welche A β -Form D-Pep1 bindet

Zur Interpretation der Ergebnisse der Cytotoxizitätstests wurden einige Vermutungen angestellt, an welche A β -Form D-Pep1 bindet. Bindet es an A β -Monomere oder an A β -Oligomere z.B. in Form von Fibrillen? Eine eindeutige Aussage zu diesem Punkt kann durch die bisher durchgeführten Experimente noch nicht getroffen werden. Verschiedene Punkte sprechen dafür, dass D-Pep1 an A β -Oligomere oder Fibrillen bindet.

Wie in Kapitel 6.2. diskutiert, sprechen die Ergebnisse einer Analyse anhand nicht-linearer Regression dafür, dass bei den durchgeführten Fluoreszenz-Titrations-Experimenten eine Bindungsstöchiometrie von einem Fluo-D-Pep1 zu mehrere A β -Molekülen vorlag, was durch Bindung eines D-Pep1 an ein A β -Oligomer oder eine A β -Fibrille erklärt werden kann. Andererseits kann diese nicht-bimolekulare Bindungsstöchiometrie auch auf einer SDS-bedingten Denaturierung von A β -Molekülen basieren, durch die nur ein Teil der A β -Moleküle eine Bindung zum D-Pep1 eingehen kann (siehe auch Kapitel 6.2.).

Durch Färbeexperimente wurde eine Markierung der „Kern“-Bereiche von Alzheimer-Plaques nachgewiesen (siehe Kapitel 5.6.). Dieser Bereich besteht zum Großteil aus A β -Fibrillen. Dieser Aspekt spricht wiederum für eine Bindung von D-Pep1 an Fibrillen.

Allerdings kann die fehlende Färbung von A β -Ablagerungen im „Hof“-Bereich auch durch Epitop-Maskierung bedingt sein (siehe Kapitel 6.3.4.).

Die alternierende hydrophobe/hydrophile Abfolge der Aminosäuren in den Positionen 7 bis 12 von D-Pep1 (hydrophob, hydrophil, hydrophob, hydrophob, hydrophil, hydrophob) könnte wichtig für die Interaktion mit bestimmten Aminosäuren der A β -Moleküle sein.

Eine Sekundärstrukturvorhersage hat für D-Pep1 eine Ausbildung eines β -Faltblatts vorhergesagt. Durch ein solches β -Faltblatt könnte eine Bindung an bestehende β -Faltblattstrukturen von A β -Molekülen erfolgen.

Im Anschluss an die Promotionsarbeit soll durch weiterführende Experimente untersucht werden, an welche A β -Form D-Pep1 bindet und ob D-Pep1 Einfluss auf das Aggregationsverhalten von A β hat (siehe Kapitel 6.7.).

6.4.5. Therapie mit D-Pep1?

A β kommt in nanomolaren Konzentrationen im Plasma und in der zerebrospinalen Flüssigkeit vor (Seubert *et al.*, 1992). Dem Nukleations-Elongations-Modell zufolge ist der Prozess zur Bildung von Fibrillen ein Prozess höherer Ordnung (Harper und Lansbury, 1997). Bei den im Körper normalerweise vorliegenden A β -Konzentrationen findet der Prozess langsam und selten statt. Deshalb treten Alzheimer-Plaques in sporadischen Fällen der AD überwiegend erst im hohen Alter auf. Ist der Prozess initiiert, findet die Fibrillenbildung schnell statt. Es liegt ein Prozess erster Ordnung vor.

Eine Möglichkeit zur Prävention der Fibrillenbildung ist die Stabilisierung des A β -Monomer-Zustands. Dafür ist eine Substanz notwendig, die hochaffin an A β -Monomere bindet. Dabei ist eine nanomolare oder besser picomolare Dissoziations-Gleichgewichts-Konstante notwendig, weil dies der physiologische Konzentrationsbereich von A β ist. Dafür ist der abgeschätzte K_D -Wert für die Bindung zwischen A β und D-Pep1 im mikromolaren Bereich zu hoch. Außerdem sprechen bisherige Experimente dafür, dass D-Pep1 an Fibrillen bindet. Eine Bindung von D-Pep1 an A β -Monomere konnte bisher noch nicht nachgewiesen werden. Das selektierte D-Pep1 ist wahrscheinlich eher für die Diagnose als für die Therapie geeignet.

6.5. D- und L-A β unterschieden sich nicht in ihrem Einfluss die Lebensfähigkeit von PC12-Zellen

In Rahmen der Überprüfung der chemisch synthetisierten, biotinylierten A β ₁₋₄₂-Enantiomere wurde ein Cytotoxizitätstest mit beiden Enantiomeren durchgeführt. Ein Einfluss auf die Lebensfähigkeit der in den MTT-Tests eingesetzten Zellen wurde für beide Enantiomere nachgewiesen. Die Lebensfähigkeit ging jeweils deutlich zurück (siehe Abbildung 5-4). Dies lässt darauf schließen, dass der neurotoxische Effekt von A β unabhängig von stereospezifischen Interaktionen ist. Obwohl dieser Punkt nicht relevant für die eigentliche Zielsetzung dieser Promotionsarbeit ist, sollen die Ergebnisse im Folgenden kurz diskutiert werden.

Der Mechanismus der Neurotoxizität von A β ist nicht bekannt. Anscheinend darf man nicht von nur einem Mechanismus ausgehen, sondern von verschiedenen Mechanismen, die auch parallel ablaufen können. Als mögliche Ursachen der Cytotoxizität werden in der Literatur u.a. die Ausbildung von Kationen-Kanälen (Arispe *et al.*, 1993a; Pollard *et al.*, 1995), Interaktionen mit Membranrezeptoren (Ivins *et al.*, 1999), Aktivierung von Mikroglia-Zellen zur Sekretion von Neurotoxinen (Giulian *et al.*, 1995; Giulian *et al.*, 1996) und Quervernetzung von Membranrezeptoren wie Tyrosin-Kinasen diskutiert (Übersicht bei (Bamberger und Landreth, 2001; Kawahara und Kuroda, 2000; Small *et al.*, 2001)). Eine Aktivierung von Mikroglia-Zellen und Astrozyten war im Testsystem nicht möglich, weil sie nicht vorhanden waren.

Betrachtet man die einzelnen Mechanismen separat voneinander, lassen sich aus den Ergebnissen der Cytotoxizitätstests mit den beiden A β -Enantiomeren folgende Schlüsse ziehen:

Arispe *et al.* fanden heraus, dass L-A β ₁₋₄₀ Kationen-Kanäle in synthetischen Lipidmembranen bildet (Arispe *et al.*, 1993a). In der Zelle kann es durch die Ausbildung solcher Kanäle zur Störung des elektrochemischen Potentials und damit zur Schädigung der Zelle kommen. Theoretisch müsste die Bildung solcher potentieller Kationen-Kanäle unabhängig von der Chiralität sein. Die beiden Enantiomere besitzen gleiche chemische und mit Ausnahme der

optischen Aktivität gleiche physikalische Eigenschaften. Die Mechanismen zur Bildung der Kanäle aus L-A β müssten prinzipiell die gleichen sein wie für einen Kanal aus D-A β , nur dass dieser das Spiegelbild zum Kanal aus L-Enantiomeren ist. Die Einlagerung von Proteinen in die Membranen erfolgt hauptsächlich aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen. Da die chemischen Eigenschaften der Enantiomere gleich sind, dürfte auch hier kein Unterschied zwischen den beiden Enantiomeren auftreten. Eine Bildung von Membrankanälen ist durch beide Enantiomere denkbar.

A β kann an verschiedene Membranrezeptoren, u.a. an cholinerge und nicotinerge Rezeptoren binden und dadurch die Rezeptoren blockieren oder die Signaltransduktionswege induzieren (Small *et al.*, 2001). Die Bindung eines Liganden an seinen Rezeptor ist selektiv. Das Rezeptormolekül besitzt spezielle Oberflächenstrukturen und chemische Eigenschaften, die für die Bindung des Liganden notwendig und die Spezifität der Ligandenbindung verantwortlich sind. Anscheinend kann A β aufgrund seiner Struktur und chemischen Eigenschaften an einige dieser Rezeptoren binden. Die räumliche Anordnung der beiden Enantiomere ist unterschiedlich. Sie sind Bild und Spiegelbild. Den Ergebnissen des Cytotoxizitätstests zufolge sind beide Enantiomere toxisch. Das deutet darauf hin, dass der beobachtete toxische Effekt nicht auf eine Aktivierung der Membranrezeptoren beruht.

Nach Bamberger *et al.* stimuliert A β intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden (Bamberger und Landreth, 2001), die u.a. zur Aktivierung der Apoptose der Zelle führen können. Als Beispiel können solche Kaskaden durch Rezeptortyrosinkinasen induziert werden. Dabei kommt es bei Bindung eines Signalmoleküls an die extrazelluläre Domäne eines solchen Rezeptors zu einer Zusammenführung von zwei Rezeptormolekülen zu einem Dimer und zu einer Quervernetzung der Einzelmoleküle. Durch die Dimerisierung erfolgt eine Phosphorylierung von Tyrosinseitenketten. Anschließend wird durch Bindung intrazellulärer Signalproteine an die phosphorylierten Tyrosine das Signal weitergeleitet. Nach Bamberger *et al.* kann eine solche Quervernetzung auch durch A β -Fibrillen erfolgen (Bamberger und Landreth, 2001). Ausgehend von der Beobachtung, dass beide Enantiomere toxisch sind, ist entweder diese Quervernetzung durch A β -Fibrillen nicht enantio-selektiv oder der in den Cytotoxizitätstests beobachtete toxische Effekt von A β beruht im vorliegenden Testsystem nicht auf diesem Mechanismus.

6.6. Durch andere Selektionsbedingungen wurden andere Peptide selektiert

Durch elektronenmikroskopische Aufnahmen wurde nachgewiesen, dass während der Selektion 1 Fibrillen im Bio-D-A β_{1-42} -Aliquot vorhanden waren. Im Weiteren sollten die Lösungsbedingungen für das A β -Target dahingehend geändert werden, dass die Monomer-Form von A β begünstigt wird und eine Selektion gegen ein A β -Monomer möglich wird. Dies sollte durch Ersetzen von DMSO durch HFIP als Lösungsmittel für die erste Verdünnung der A β -Lösung (Selektion 2) bzw. durch geringere A β -Konzentrationen (Selektion 3) und sofortiges Anbinden der gelösten A β -Moleküle an die Streptavidin-beschichteten Reaktionsgefäße erreicht werden.

In Selektion 2 gegen Bio-D-A β_{1-42} als Target wurde ein geringer Anstieg der prozentualen Häufigkeit für einzelne Aminosäuren ermittelt, aber keiner der Anreicherungsfaktoren stieg über 2,5. Das Peptid mit der Aminosäuresequenz G I S W Q Q S H H L V A (Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code, siehe Abbildung 5-14) wurde am häufigsten selektiert. Vergleicht man dieses Peptid mit dem dominierenden Peptid aus der Selektion 1 gegen Bio-D-A β_{1-42} mit der Aminosäuresequenz Q S H Y R H I S P A Q V (Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code), fällt auf, dass beide Peptide zwei Glutamin-Reste, zwei Histidin-Reste, zwei Serin-Reste, einen Alanin-Rest, einen Isoleucin-Rest und an vierter Position entweder einen Tryptophan-Rest oder einen Tyrosin-Rest beinhalten. Ob beide Peptide ähnliche Bindungseigenschaften zum A β zeigen, soll im Anschluss an die Promotionsarbeit untersucht werden.

Das dominierende Peptid aus Selektion 3 gegen Bio-D-A β_{1-42} als Target (D-Pep3) mit der Aminosäuresequenz R P R T R L H T H R N R (alle Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code) unterscheidet sich deutlich von den dominierenden Peptiden aus den Selektionen 1 und 2. Interessant ist das alternierende Auftreten der Aminosäure Arginin in den Positionen 1, 3, 5 und 10, 12. Bei Ausbildung einer β -Faltblattstruktur könnten sich die ersten drei Arginin-Reste auf einer Seite des Faltblatts befinden. Die Arginine besitzen das Potential, mit den sauren Aminosäuren im A β Salzbrücken zu bilden. Für die vierte bis sechste Aminosäure (T R L, Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code) wurde eine Ausbildung eines β -Faltblatts vorhergesagt (siehe Abbildung 5-15).

Das dominierende Peptid aus der Selektion gegen L-A β ₁₋₄₂ (L-Pep3) weist einen relativ hohen Anteil an hydrophoben, aliphatischen Aminosäuren auf. Zwei Aminosäuren sind basisch. Vielleicht kommt es zwischen A β und L-Pep3 zu hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen.

Meist wurde bei der Suche nach Peptiden als A β -Liganden auf die Selbsterkennungssequenz A β ₁₆₋₂₀ (Aminosäuresequenz: KLVFF) der A β -Monomere zurückgegriffen, die von Tjernberg *et al.* als essentiell für die Interaktionen der A β -Moleküle während der Fibrillenbildung postuliert wurde (Tjernberg *et al.*, 1996). Soto und Kollegen konstruierten auf Basis der zentralen hydrophoben Region A β ₁₇₋₂₁ (Aminosäuresequenz: LVFFA) Peptide, die die A β -Fibrillenbildung *in vitro* inhibieren (Soto *et al.*, 1996; Soto *et al.*, 1998). Durch die hydrophoben Wechselwirkungen der Peptide mit A β wurde anscheinend die Selbsterkennungsstelle der A β -Monomere blockiert, und die Fibrillenbildung wurde verhindert. Vielleicht kann L-Pep1 ähnliche Bindungen eingehen und an hydrophobe Bereiche im A β binden. Ein Ligand zum A β -Monomer wäre ideal zur Stabilisierung des A β -Monomer-Zustands für eine Therapie (siehe Kapitel 6.4.2.).

6.7. Ausblick

Im Zusammenhang mit den Ergebnissen des Cytotoxizitätstests bezüglich des Einflusses von D-Pep1 auf die Cytotoxizität von A β (siehe Kapitel 6.4.) sollen im Anschluss an die Promotionsarbeit Untersuchungen zum Einfluss von D-Pep1 auf die Aggregations-eigenschaften von A β folgen. Dabei soll untersucht werden, wie das Aggregationsverhalten von A β durch die Zugabe von D-Pep1 beeinflusst wird und ob sich der Einfluss bei höheren D-Pep1-Konzentrationen ($\geq 500 \mu\text{M}$) ändert. Es soll ein Methodenspektrum ausgearbeitet werden, um die Bindungseigenschaften zwischen D-Pep1 und A β zu untersuchen. Dabei ist geplant, u.a. durch Elektronenmikroskopie, Lichtstreuung-Messung und/oder der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie den Einfluss von D-Pep1 auf die Struktur und die Molekülgröße von A β -Aggregaten zu untersuchen. Parallel dazu soll ein Aggregationstest zur quantitativen Bestimmung der Fibrillenkonzentration auf der Basis der Bindung von Kongo-Rot an A β -Fibrillen nach Klunk *et al.* (Klunk *et al.*, 1999) etabliert werden, um zu überprüfen, ob sich D-Pep1 hemmend oder fördernd auf die Fibrillenbildung auswirkt. Interessant wären weiterhin eine Fraktionierung der entstehenden A β -Oligomere und die Untersuchung der Cytotoxizität der separierten A β -Oligomere.

Für die dominierenden Peptide der Selektionen 2 und 3 sollen die aufgeführten Bindungs- und Toxizitätstests ebenfalls durchgeführt werden. Dabei sollen zusätzlich (auch für D-Pep1) Fluoreszenz-Titrations-Experimente mit D-A β_{1-42} erfolgen, um die Enantio-Selektivität der Bindung zwischen dem D-Enantiomer des jeweils dominierenden Peptids und L-A β_{1-42} zu untersuchen.

Zurzeit laufen am Lehrstuhl „Experimentelle Radiologie“ von Prof. Dr. Kaiser (Universität Jena) unter der Leitung von Frau Dr. Hilger (Universität Jena) erste Experimente zur Nutzung des selektierten D-Pep1 zur bildgebenden Diagnostik. Das Ziel ist die *in-vivo*-Markierung von A β -Plaques in Gehirnen von transgenen Mäusen und die Detektion der Plaques anhand der MRT-Technologie. Die Experimente werden auch Informationen über D-Pep1 bezüglich der biologischen Abbaubarkeit, der Immunogenität und der Permeabilität von D-Pep1 über die Blut-Hirn-Schranke geben. Dass Peptide aus D-Aminosäuren im Gegensatz zu den jeweiligen L-Enantiomeren kaum bzw. gar nicht durch Proteasen abgebaut werden, wurde in

verschiedenen Untersuchungen nachgewiesen (Findeis *et al.*, 1999; Poduslo *et al.*, 1999). Für anstehende Experimente und für eventuelle diagnostische Anwendungen von D-Pep1 kann es während der chemischen Synthese mit notwendigen Detektionsmarkern versehen werden. Sollte sich z.B. herausstellen, dass D-Pep1 eine geringe Permeabilität über die Blut-Hirn-Schranke aufweist, gibt es Modifizierung zur Verbesserung der Permeabilität verschiedene Möglichkeiten der chemischen (Witt *et al.*, 2001).

7. Zusammenfassung

Die Alzheimersche Demenz (AD) ist eine progressive, neurodegenerative Erkrankung, in deren Pathogenese der „Amyloid-Kaskaden-Hypothese“ zufolge das Amyloid- β -Peptid ($A\beta$) eine zentrale Rolle einnimmt. Dabei wird davon ausgegangen, dass durch die progressive Akkumulierung von $A\beta$ komplexe, multizelluläre Kaskaden initiiert werden, die neuritische Schäden, Aktivierung von Mikroglia-Zellen und Astrozyten, neuronale Funktionsstörungen und den Verlust von Synapsen bewirken. Basierend auf dieser Hypothese werden derzeit Diagnose- und Therapiestrategien erarbeitet, in deren Mittelpunkt die Erkennung von $A\beta$ oder/und $A\beta$ Fibrillen stehen.

In der vorliegenden Promotionsarbeit sollten aus D-Aminosäuren bestehende Peptide (D-Peptide) identifiziert werden, die mit hoher Spezifität an $A\beta$ binden. Für D-Peptide wird im Vergleich mit den jeweiligen L-Enantiomeren eine gesteigerte Protease-Resistenz und eine geringere Immunogenität erwartet (Schumacher *et al.*, 1996).

Zur Identifizierung solcher D-Peptide wurde ein Screening einer Peptid-Bibliothek gegen $A\beta_{1-42}$, bestehend aus D-Aminosäuren, durchgeführt. Dabei kam eine auf dem Bakteriophagen M13 präsentierte, randomisierte 12mer Peptid-Bibliothek zum Einsatz. Nach vier Selektions- und Amplifizierungsrunden wurden durch dieses Spiegelbild-Phagen-Display-Verfahren verschiedene Peptide selektiert. Dabei trat die Aminosäuresequenz Q S H Y R H I S P A Q V (Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code) in 20 von 39 selektierten Peptiden auf. In Fluoreszenz-Spektroskopie-Titrations-Experimenten mit dem Spiegelbild dieses am häufigsten auftretenden Peptids (D-Pep1) wurde eine Bindung an synthetisches $A\beta_{1-42}$, bestehend aus L-Aminosäuren, nachgewiesen. Eine Abschätzung der Dissoziations-Gleichgewichts-Konstante (K_D) mittels nicht-linearer Regression ergab einen Wert im mikromolaren Bereich.

Durch eine *in-vitro*-Markierung von $A\beta$ -Ablagerungen in Gehirn-Gewebeschnitten von Alzheimer-Patienten wurde mit Fluorescein markiertem D-Pep1 eine Bindung dieses D-Peptids an natürlich vorkommendes $A\beta$ nachgewiesen. Amyloid-Ablagerungen in Gewebeschnitten von Patienten mit anderen Amyloid-Erkrankungen wurden durch D-Pep1 nicht markiert.

In Cytotoxizitätstests zeigte sich ein positiver Einfluss des selektierten D-Peptids auf die Cytotoxizität von $A\beta$. Der Einfluss ist von der D-Pep1-Konzentration und dem Zeitpunkt der

Zugabe von D-Pep1 zur A β -Lösung abhängig. Die Ergebnisse der durchgeführten Cytotoxizitätstests konnten nicht in das Nukleations-Elongations-Modell zur *in-vitro* Fibrillenbildung nach Lansbury *et al.* (bestehend aus zwei Schritten: Bildung von Nukleationskeimen, Elongation von Fibrillen) (Jarrett *et al.*, 1993; Jarrett und Lansbury, 1993; Harper und Lansbury, 1997) eingeordnet werden. Eine Interpretation aller Ergebnisse der Cytotoxizitätstests war erst durch erweitertes kinetisches Modell zur *in-vitro* Fibrillenbildung nach Harper *et al.* (Harper *et al.*, 1999) möglich, in dem auch Protofilamente berücksichtigt werden. Dabei wurde ein Einfluss von D-Pep1 auf das Aggregationsverhalten von A β sowie unterschiedliche Wirkmechanismen bezüglich der Toxizität von Protofilamenten und Fibrillen vorausgesetzt.

8. Summary

Alzheimer's Disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder. Extracellular amyloid plaques in the brain are one of the main histopathological hallmarks of this disease. The „amyloid-cascade-hypothesis“ assigns the amyloid- β -peptide ($A\beta$) a central role in the pathogenesis of AD. It is assumed that progressive accumulation of $A\beta$ initiates a complex multicellular cascade that includes neuritic dystrophy, microgliosis, astrocytosis, neuronal dysfunction and loss of synapsis. The consequences of this multicellular cascade are impaired amnesic and cognitive functions of patients suffered by AD. Based on this hypothesis, diagnostic and therapeutic strategies targeting $A\beta$ and $A\beta$ fibrils are being pursued.

In the present dissertation peptides consisting of D-amino acids (D-peptides) should be identified that bind to $A\beta$ with high specificity. D-peptides are thought to be protease-resistant and less immunogenic than the respective L-enantimer (Schumacher *et al.*, 1996).

A screening of a randomized 12mer peptide library presented on bacteriophage M13 for binding to $A\beta_{1-42}$ consisting of D-amino acids as target was performed. After four rounds of selection and amplification different peptides were selected. The amino acid sequence of Q S H Y R H I S P A Q V (all amino acids in one-letter-code) was obtained in 20 of 39 selected peptides. The mirror image of this dominating peptide (D-peptide) binds to synthetic $A\beta_{1-42}$ consisting of L-amino acids as shown by fluorescence spectroscopy titration experiments. An estimation of the dissociation equilibrium constant (K_D) with non-linear regression produced a value in the micromolar range.

Binding of D-Pep1 to natural $A\beta$ was verified through *in-vitro*-targeting of $A\beta$ precipitations in tissue sections derived from patients that suffered from AD. Amyloid precipitations in tissue sections of patients that suffered from other amyloidosis disorders were not marked by D-Pep1.

In cytotoxicity tests, it has been demonstrated that the D-peptide has a positive effect on the cytotoxicity of $A\beta$. The influence depends on the concentration of the D-peptide and the fibril formation state of $A\beta$. The results of the cytotoxicity assays could not be explained based on the nucleations-elongations-modell by Lansbury *et al.* (consisting of two steps: building of a aggregation nucleus and elongation of fibrils) (Jarrett *et al.*, 1993; Jarrett and

Lansbury, 1993; Harper and Lansbury, 1997). An interpretation of all results of the cytotoxicity tests becomes possible by consideration of an extended model by Harper *et al.* which adjusts protofilaments (Harper *et al.*, 1999). Thereby an influence of D-Pep1 to the aggregation of A β as well as different mechanisms for toxicity of protofilaments and fibrils was assumed.

9. Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
AA	Amyloidose, Vorläuferproteine sind Serum-Amyloid-A-Proteine
A β	Amyloid- β -Peptid
AD	Alzheimersche Demenz
AL λ	Amyloidose, Vorläuferproteine sind Ig λ -Leichtketten
AL κ	Amyloidose, Vorläuferproteine sind Ig κ -Leichtketten
Apo	Apolipoprotein
A β PP	Amyloid-Vorläufer-Protein, Amyloid Precursor Protein
APS	Ammoniumperoxodisulfat
A _{xxx}	Extinktion bei xxx nm
Bio-D-A β ₁₋₄₂	A β , alle Aminosäuren in D-Form, mit Biotinyl-Rest am C-Terminus
Bio-L-A β ₁₋₄₂	A β , alle Aminosäuren in L-Form, mit Biotinyl-Rest am C-Terminus
BSA	Rinderserumalbumin („bovine serum albumin“)
CD	Circulardichroismus
COSY	Korrelationsspektroskopie („correlated spectroscopy“)
CT	Computertomographie
Cy3-Anti-A β ₁₋₁₆	Antikörpersystem bestehend aus Maus-Anti-A β ₁₋₁₆ -Antikörper und Cy3-markiertem, sekundären Schaf-Anti-Maus-Antikörper
Da	Dalton, Molekulargewicht für Biopolymere
D-A β ₁₋₄₂	A β -Molekül aus 42 Aminosäuren, alle Aminosäuren in der D-Form
DMEM	Medium für Zellkultur („Dulbecco modified Eagle medium“)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
D-Pepx	12mer Peptid, selektiert in Selektion x, alle Aminosäuren in D-Form,
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkultur
DQF-COSY	„double quantum filtered COSY“
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
ϵ_{xxx}	molarer Extinktionskoeffizient bei xxx nm, (M ⁻¹ cm ⁻¹)
FAD	Familiäre Alzheimersche Demenz

Fluo-D-Pep1	12mer Peptid, selektiert in Selektion 1, alle Aminosäuren in D-Form, mit Fluoresceinyl-Rest am N-terminus
Fluo-D-Pep1	12mer Peptid, selektiert in Selektion 1, alle Aminosäuren in L-Form, mit Fluoresceinyl-Rest am N-terminus
g	Erdbeschleunigung bzw. Gramm
GdmHCl	Guanidiniumhydrochlorid
gp	Genprodukt
HFIP	Hexafluoroisopropanol
HIV	„human immunodeficiency virus“
HPLC	„high performance liquid chromatography“
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid
K _D	Dissoziations-Gleichgewichts-Konstante
L-A β ₁₋₄₂	A β -Molekül aus 42 Aminosäuren, alle Aminosäuren in L-Form
LB	Luria-Broth-Medium
L-Pepx	12mer Peptid, selektiert in Selektion x, alle Aminosäuren in L-Form,
LMW	geringes Molekulargewicht („low molecular weight“)
MHz	Megahertz
min	Minute
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
NMR	Kernmagnetische Resonanz („nuclear magnetic resonance“)
NOESY	NOE-Spektroskopie („nuclear Overhauser enhancement spektroskopie“)
nt	Nukleotid
OD _{xxx}	Optische Dichte bei Wellenlänge von xxx nm
p.a.	pro analysi
PBS	Phosphat-gepufferte Saline („phosphat-buffered saline“)
PC12	Zelllinie, Phäochromozytomzellen, („phaeochromo-cytoma cells“)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion, („polymerase chain reaction“)
PEG	Poly(ethylene glycol)
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
pfu	Plaque-bildende Einheiten („plaque forming units“)
PHF	gepaarte helikale Filamente („paired helical filaments“)

ppm	„parts per million“, hier für die Angabe der NMR-chemischen Verschiebung
PS	Presenilin
RFI	replikative Form
RNA	Ribonukleinsäure („acid“)
rpm	Umdrehungen pro Minute („rounds per minute“)
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde, („second“)
SDS	Natriumdodecylsulfat („sodium dodecylsulfate“)
ssDNA	Einzelstrang-DNA („single-strand DNA“)
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-Borat-Saline-Puffer
TBST	TBS mit Tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
TOCSY	„total correlated spectroscopy“
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderen
UV	Ultravioletter Spektralbereich
VIS	sichtbarer Spektralbereich
v/v	Volumen pro Volumen
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen („weight per volume“)
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
$[\Theta]_{MRW}$	Molare Elliptizität pro Aminosäure

10. Literaturverzeichnis

- Agdeppa, E.D., Kepe, V., Liu, J., Flores-Torres, S., Satyamurthy, N., Petric, A., Cole, G.M., Small, G.W., Huang, S.C. and Barrio, J.R. (2001). Binding characteristics of radiofluorinated 6-dialkylamino-2-naphthylethylidene derivatives as positron emission tomography imaging probes for beta-amyloid plaques in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.*, **21**, RC189.
- Agterberg, M., Adriaanse, H., Lankhof, H., Meloen, R. and Tomassen, J. (1987). Use of outer membrane PhoE as carrier for the transport of foreign antigenic determinant to cell surface of *Escherichia coli* K-12. *Gene*, **59**, 145-149.
- Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg. Z. Psychiat.*, **64**, 146-148.
- Alzheimer, A., Stelzmann, R.A., Schnitzlein, H.N. and Murtagh, F.R. (1995). An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde" [classical article]. *Clin. Anat.*, **8**, 429-31.
- Arispe, N., Pollard, H.B. and Rojas, E. (1993a). Giant multilevel cation channels formed by Alzheimer disease amyloid beta-protein [A beta P-(1-40)] in bilayer membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**, 10573-7.
- Arispe, N., Pollard, H.B. and Rojas, E. (1994). Beta-Amyloid Ca(2+)-channel hypothesis for neuronal death in Alzheimer's disease. *Mol. Cell Biochem.*, **140**, 119-25.
- Arispe, N., Rojas, E. and Pollard, H.B. (1993b). Alzheimer's disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**, 567-71.
- Bai, C. and Elledge, S.J. (1997). Gene identification using the yeast two-hybrid system. *Methods Enzymol.*, **283**, 141-56.
- Bamberger, M.E. and Landreth, G.E. (2001). Microglial interaction with beta-amyloid: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Microsc. Res. Tech.*, **54**, 59-70.
- Bard, F., Cannon, C., Barbour, R., Burke, R.L., Games, D., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Lieberburg, I., Motter, R., Nguyen, M., Soriano, F., Vasquez, N., Weiss, K., Welch, B., Seubert, P., Schenk, D. and Yednock, T. (2000). Peripherally administered antibodies against

- amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat. Med.*, **6**, 916-9.
- Bartels, C., Xia, T., Billeter, M., Güntert, P. and Wüthrich, K. (1995). The program XEASY for computer-supported NMR spectral analysis of biological macromolecules. *J. Biomol. NMR*, **6**, 1-10.
- Bauer, J. (1994). *Die Alzheimer Krankheit: Neurobiologie, Psychosomatik, Diagnostik und Therapie*. Schattauer-Verlag, Stuttgart.
- Behl, C. (1999). Alzheimer's disease and oxidative stress: implications for novel therapeutic approaches. *Prog. Neurobiol.*, **57**, 301-23.
- Behl, C., Davis, J.B., Lesley, R. and Schubert, D. (1994). Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell*, **77**, 817-27.
- Bickel, H. (1999). Epidemiologie der Demenzen. In Förstl, H. (ed.) *Alzheimer Demenz: Grundlagen, Klinik und Therapie*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 9-32.
- Boss, M.A. (2000). Diagnostic approaches to Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1502**, 188-200.
- Burdick, D., Soreghan, B., Kwon, M., Kosmoski, J., Knauer, M., Henschen, A., Yates, J., Cotman, C. and Glabe, C. (1992). Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs. *J. Biol. Chem.*, **267**, 546-54.
- Burritt, J.B., Bond, C.W., Doss, K.W. and Jesaitis, A.J. (1996). Filamentous phage display of oligopeptide libraries. *Anal. Biochem.*, **238**, 1-13.
- Cai, H., Wang, Y., McCarthy, D., Wen, H., Borchelt, D.R., Price, D.L. and Wong, P.C. (2001). BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons. *Nat. Neurosci.*, **4**, 233-4.
- Castano, E.M., Prelli, F., Wisniewski, T., Golabek, A., Kumar, R.A., Soto, C. and Frangione, B. (1995). Fibrillogenesis in Alzheimer's disease of amyloid beta peptides and apolipoprotein E. *Biochem. J.*, **306**, 599-604.
- Charbit, A., Sobezak, E., Michel, M.L., Molla, A., Tiollais, P. and Hofung, M. (1987). Presentation of two epitops of the pre-S2 region of Hepatitis B virus on live recombinant bacteria. Immunization studies. *J. Immunol.*, **139**, 1658-1662.
- Citron, M., Diehl, T.S., Gordon, G., Biere, A.L., Seubert, P. and Selkoe, D.J. (1996). Evidence that the 42- and 40-amino acid forms of amyloid beta protein are generated from the beta-amyloid precursor protein by different protease activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**, 13170-5.

- Cribbs, D.H., Pike, C.J., Weinstein, S.L., Velazquez, P. and Cotman, C.W. (1997). All-D-enantiomers of beta-amyloid exhibit similar biological properties to all-L-beta-amyloids. *J. Biol. Chem.*, **272**, 7431-6.
- Cruz, L., Urbanc, B., Buldyrev, S.V., Christie, R., Gomez-Isla, T., Havlin, S., McNamara, M., Stanley, H.E. and Hyman, B.T. (1997). Aggregation and disaggregation of senile plaques in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**, 7612-6.
- Cull, M.G., Miller, J.F. and Schatz, P.J. (1992). Screening for receptor ligands using large libraries of peptides linked to the C terminus of the lac repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **89**, 1865-1869.
- De_Strooper, B., Saftig, P., Craessaerts, K., Vanderstichele, H., Guhde, G., Annaert, W., Von_Figura, K. and Van_Leuven, F. (1998). Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature*, **391**, 387-90.
- Devlin, J.J., Panganiban, L.C. and Devlin, P.E. (1990). Random peptide libraries: A source of specific protein binding molecules. *Science*, **249**, 404-406.
- Dezutter, N.A., Dom, R.J., de Groot, T.J., Bormans, G.M. and Verbruggen, A.M. (1999). ^{99m}Tc-MAMA-chrysamine G, a probe for beta-amyloid protein of Alzheimer's disease. *Eur. J. Nucl. Med.*, **26**, 1392-9.
- Eckert, D.M., Malashkevich, V.N., Hong, L.H., Carr, P.A. and Kim, P.S. (1999). Inhibiting HIV-1 entry: discovery of D-peptide inhibitors that target the gp41 coiled-coil pocket. *Cell*, **99**, 103-15.
- Findeis, M.A., Musso, G.M., Arico_Muendel, C.C., Benjamin, H.W., Hundal, A.M., Lee, J.J., Chin, J., Kelley, M., Wakefield, J., Hayward, N.J. and Molineaux, S.M. (1999). Modified-peptide inhibitors of amyloid beta-peptide polymerization. *Biochemistry*, **38**, 6791-800.
- Forrer, P., Jung, S. and Pluckthun, A. (1999). Beyond binding: using phage display to select for structure, folding and enzymatic activity in proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **9**, 514-20.
- Fox, N.C., Crum, W.R., Scahill, R.I., Stevens, J.M., Janssen, J.C. and Rossor, M.N. (2001). Imaging of onset and progression of Alzheimer's disease with voxel-compression mapping of serial magnetic resonance images. *Lancet*, **358**, 201-5.
- Fraser, P.E., Nguyen, J.T., Surewicz, W.K. and Kirschner, D.A. (1991). pH-dependent structural transitions of Alzheimer amyloid peptides. *Biophys. J.*, **60**, 1190-201.

- Frölich, L., Hampel, H., Gorriz, C. and Schramm, U. (1999). Cholinerge Behandlungsstrategien. In Förstl, H. (ed.) *Alzheimer Demenz: Grundlagen, Klinik und Therapie*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 179-190.
- Games, D., Adams, D., Alessandrini, R., Barbour, R., Berthelette, P., Blackwell, C., Carr, T., Clemens, J., Donaldson, T., Gillespie, F. and et al. (1995). Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein [see comments]. *Nature*, **373**, 523-7.
- Gates, C.M., Stemmer, W.P., Kaptein, R. and Schatz, P.J. (1996). Affinity selective isolation of ligands from peptide libraries through display on a lac repressor "headpiece dimer". *J. Mol. Biol.*, **255**, 373-86.
- Gill, S.C. and von Hippel, P.H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.*, **182**, 319-326.
- Giulian, D., Haverkamp, L.J., Li, J., Karshin, W.L., Yu, J., Tom, D., Li, X. and Kirkpatrick, J.B. (1995). Senile plaques stimulate microglia to release a neurotoxin found in Alzheimer brain. *Neurochem. Int.*, **27**, 119-37.
- Giulian, D., Haverkamp, L.J., Yu, J., Karshin, W., Tom, D., Li, J., Kazanskaia, A., Kirkpatrick, J. and Roher, A.E. (1998). The HHQK domain of beta-amyloid provides a structural basis for the immunopathology of Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.*, **273**, 29719-26.
- Giulian, D., Haverkamp, L.J., Yu, J.H., Karshin, W., Tom, D., Li, J., Kirkpatrick, J., Kuo, L.M. and Roher, A.E. (1996). Specific domains of beta-amyloid from Alzheimer plaque elicit neuron killing in human microglia. *J. Neurosci.*, **16**, 6021-37.
- Glenner, G.G., Henry, J.H. and Fujihara, S. (1981). Congophilic angiopathy in the pathogenesis of Alzheimer's degeneration. *Ann. Pathol.*, **1**, 120-9.
- Glenner, G.G. and Wong, C.W. (1984a). Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **122**, 1131-5.
- Glenner, G.G. and Wong, C.W. (1984b). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **120**, 885-90.
- Glenner, G.G., Wong, C.W., Quaranta, V. and Eanes, E.D. (1984). The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis. *Appl. Pathol.*, **2**, 357-69.

- Goodman, Y. and Mattson, M.P. (1994). Secreted forms of beta-amyloid precursor protein protect hippocampal neurons against amyloid beta-peptide-induced oxidative injury. *Exp. Neurol.*, **128**, 1-12.
- Götz, J., Chen, F., van_Dorpe, J. and Nitsch, R.M. (2001). Formation of neurofibrillary tangles in P3011 tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils. *Science*, **293**, 1491-5.
- Greenberg, S.M., Koo, E.H., Selkoe, D.J., Qiu, W.Q. and Kosik, K.S. (1994). Secreted beta-amyloid precursor protein stimulates mitogen-activated protein kinase and enhances tau phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 7104-8.
- Greene, L.A. and Tischler, A.S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **73**, 2424-8.
- Guijarro, J.I., Sunde, M., Jones, J.A., Campbell, I.D. and Dobson, C.M. (1998). Amyloid fibril formation by an SH3 domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 4224-8.
- Haass, C. (1999). Molekulare Mechanismen der Alzheimer Krankheit. In Förstl, H. (ed.) *Alzheimer Demenz: Grundlagen, Klinik und Therapie*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 55-66.
- Haass, C., Koo, E.H., Mellon, A., Hung, A.Y. and Selkoe, D.J. (1992a). Targeting of cell-surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments. *Nature*, **357**, 500-3.
- Haass, C., Schlossmacher, M.G., Hung, A.Y., Vigo_Pelfrey, C., Mellon, A., Ostaszewski, B.L., Lieberburg, I., Koo, E.H., Schenk, D. and Teplow, D.B. (1992b). Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature*, **359**, 322-5.
- Hampel, H., Bürger, K., Padberg, F. and Bahro, M. (1999). Aktuelle Möglichkeiten und Perspektiven der Liquoruntersuchung bei der Alzheimer Demenz. In H., F. (ed.) *Alzheimer Demenz: Grundlagen, Klinik und Therapie*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 153-166.
- Hanes, J. and Pluckthun, A. (1997). In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**, 4937-42.
- Hardy, J. (1997). Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.*, **20**, 154-9.

- Harper, J.D. and Lansbury, P.T.J. (1997). Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, **66**, 385-407.
- Harper, J.D., Wong, S.S., Lieber, C.M. and Lansbury, P.T.J. (1997). Observation of metastable A β amyloid protofibrils by atomic force microscopy. *Chem. Biol.*, **4**, 119-25.
- Harper, J.D., Wong, S.S., Lieber, C.M. and Lansbury, P.T. (1999). Assembly of A β amyloid protofibrils: an in vitro model for a possible early event in Alzheimer's disease. *Biochemistry*, **38**, 8972-80.
- Hilbich, C., Kisters-Woike, B., Reed, J., Masters, C.L. and Beyreuther, K. (1992). Substitutions of hydrophobic amino acids reduce the amyloidogenicity of Alzheimer's disease A β peptides. *J. Mol. Biol.*, **228**, 460-73.
- Hoffmann, S. and Willbold, D. (1997). A selection system to study protein-RNA interactions: functional display of HIV-1 Tat protein on filamentous bacteriophage M13. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **235**, 806-11.
- Holtzman, D.M., Bales, K.R., Tenkova, T., Fagan, A.M., Parsadanian, M., Sartorius, L.J., Mackey, B., Olney, J., McKeel, D., Wozniak, D. and Paul, S.M. (2000). Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 2892-7.
- Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F. and Cole, G. (1996). Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science*, **274**, 99-102.
- Hussain, I., Powell, D., Howlett, D.R., Tew, D.G., Meek, T.D., Chapman, C., Gloger, I.S., Murphy, K.E., Southan, C.D., Ryan, D.M., Smith, T.S., Simmons, D.L., Walsh, F.S., Dingwall, C. and Christie, G. (1999). Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol. Cell. Neurosci.*, **14**, 419-27.
- Hyman, B.T. (1992). Down syndrome and Alzheimer disease. *Prog. Clin. Biol. Res.*, **379**, 123-42.
- Ihl, R. (1999). Klinische Diagnosekriterien. In Förstl, H. (ed.) *Alzheimer Demenz: Grundlagen, Klinik und Therapie*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 109-128.
- Ivins, K.J., Thornton, P.L., Rohn, T.T. and Cotman, C.W. (1999). Neuronal apoptosis induced by beta-amyloid is mediated by caspase-8. *Neurobiol. Dis.*, **6**, 440-9.

- Janus, C., Chishti, M.A. and Westaway, D. (2000a). Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta*, **1502**, 63-75.
- Janus, C., Pearson, J., McLaurin, J., Mathews, P.M., Jiang, Y., Schmidt, S.D., Chishti, M.A., Horne, P., Heslin, D., French, J., Mount, H.T., Nixon, R.A., Mercken, M., Bergeron, C., Fraser, P.E., St George-Hyslop, P. and Westaway, D. (2000b). A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature*, **408**, 979-82.
- Jarrett, J.T., Berger, E.P. and Lansbury, P.T.J. (1993). The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry*, **32**, 4693-7.
- Jarrett, J.T. and Lansbury, P.T.J. (1993). Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell*, **73**, 1055-8.
- Kang, J., Lemaire, H.G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Grzeschik, K.H., Multhaup, G., Beyreuther, K. and Muller-Hill, B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*, **325**, 733-6.
- Katz, B.A. (1995). Binding to protein targets of peptidic leads discovered by phage display: crystal structures of streptavidin-bound linear and cyclic peptide ligands containing the HPQ sequence. *Biochemistry*, **34**, 15421-9.
- Kawahara, M. and Kuroda, Y. (2000). Molecular mechanism of neurodegeneration induced by Alzheimer's beta-amyloid protein: channel formation and disruption of calcium homeostasis. *Brain Res. Bull.*, **53**, 389-97.
- Kay, B.K. and Hoess, R.H. (1996). Principles and Applications of Phage Display. In Kay, B.K., Winter, J. and McCafferty, J. (eds.), *Phage Display of peptides and proteins- A laboratory manual*. Academic Press, Inc, San Diego, California, pp. 21-29.
- Kay, B.K., Kurakin, A.V. and Hyde-DeRuyscher, R. (1998). From peptides to drugs via phage display. *DDT*, **3**, 370-378.
- Kenan, D.J., Tsai, D.E. and Keene, J.D. (1994). Exploring molecular diversity with combinatorial shape libraries. *TIBS*, **19**, 57-64.
- Klaus, S., Krüger, D.H. and Meyer, J. (1992). *Bakterienviren*. Fischer-Verlag, Jena.

- Klunk, W.E., Jacob, R.F. and Mason, R.P. (1999). Quantifying amyloid beta-peptide (Abeta) aggregation using the Congo red-Abeta (CR-abeta) spectrophotometric assay. *Anal. Biochem.*, **266**, 66-76.
- Klunk, W.E., Wang, Y., Huang, G.F., Debnath, M.L., Holt, D.P. and Mathis, C.A. (2001). Uncharged thioflavin-T derivatives bind to amyloid-beta protein with high affinity and readily enter the brain. *Life Sci.*, **69**, 1471-84.
- Klussmann, S., Nolte, A., Bald, R., Erdmann, V.A. and Furste, J.P. (1996). Mirror-image RNA that binds D-adenosine. *Nat. Biotechnol.*, **14**, 1112-5.
- Kozlov, I.A., Mao, S., Xu, Y., Huang, X., Lee, L., Sears, P.S., Gao, C., Coyle, A.R., Janda, K.D. and Wong, C.H. (2001). Synthesis of solid-supported mirror-image sugars: a novel method for selecting receptors for cellular-surface carbohydrates. *Chembiochem*, **2**, 741-6.
- Kuner, P., Bohrmann, B., Tjernberg, L.O., Naslund, J., Huber, G., Celenk, S., Gruninger-Leitch, F., Richards, J.G., Jakob-Roetne, R., Kemp, J.A. and Nordstedt, C. (2000). Controlling polymerization of beta-amyloid and prion-derived peptides with synthetic small molecule ligands. *J. Biol. Chem.*, **275**, 1673-8.
- Lambert, M.P., Barlow, A.K., Chromy, B.A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T.E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K.L., Wals, P., Zhang, C., Finch, C.E., Krafft, G.A. and Klein, W.L. (1998). Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 6448-53.
- Lansbury, P.T.J. (1997). Inhibition of amyloid formation: a strategy to delay the onset of Alzheimer's disease. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **1**, 260-7.
- Lansbury, P.T.J. (1999). Evolution of amyloid: what normal protein folding may tell us about fibrillogenesis and disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 3342-4.
- Lemere, C.A., Lopera, F., Kosik, K.S., Lendon, C.L., Ossa, J., Saido, T.C., Yamaguchi, H., Ruiz, A., Martinez, A., Madrigal, L., Hincapie, L., Arango, J.C., Anthony, D.C., Koo, E.H., Goate, A.M. and Selkoe, D.J. (1996). The E280A presenilin 1 Alzheimer mutation produces increased A beta 42 deposition and severe cerebellar pathology. *Nat. Med.*, **2**, 1146-50.
- Levin, V.A. (1980). Relationship of octanol/water partition coefficient and molecular weight to rat brain capillary permeability. *J. Med. Chem.*, **23**, 682-4.

- Lin, X., Koelsch, G., Wu, S., Downs, D., Dashti, A. and Tang, J. (2000). Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 1456-60.
- Lindl, T. (2000). *Zell- und Gewebekultur: Einführungs in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin.
- Linke, R.P. (2000). Highly sensitive diagnosis of amyloid and various amyloid syndromes using Congo red fluorescence. *Virchows Arch.*, **436**, 439-48.
- Lomakin, A., Teplow, D.B., Kirschner, D.A. and Benedek, G.B. (1997). Kinetic theory of fibrillogenesis of amyloid beta-protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**, 7942-7.
- Lorenzo, A. and Yankner, B.A. (1994). Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 12243-7.
- Lowe, T.L., Strzelec, A., Kiessling, L.L. and Murphy, R.M. (2001). Structure-function relationships for inhibitors of beta-amyloid toxicity containing the recognition sequence KLVFF. *Biochemistry*, **40**, 7882-9.
- Lubkowski, J., Hennecke, F., Pluckthun, A. and Wlodawer, A. (1998). The structural basis of phage display elucidated by the crystal structure of the N-terminal domains of g3p. *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 140-7.
- Luo, Y., Bolon, B., Kahn, S., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Denis, P., Fan, W., Kha, H., Zhang, J., Gong, Y., Martin, L., Louis, J.C., Yan, Q., Richards, W.G., Citron, M. and Vassar, R. (2001). Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nat. Neurosci.*, **4**, 231-2.
- Masters, C.L., Simms, G., Weinman, N.A., Multhaup, G., McDonald, B.L. and Beyreuther, K. (1985). Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **82**, 4245-9.
- Mattheakis, L.C., Bhatt, R.R. and Dower, W.J. (1994). An in vitro polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 9022-9026.
- Muller, U., Cristina, N., Li, Z.W., Wolfer, D.P., Lipp, H.P., Rulicke, T., Brandner, S., Aguzzi, A. and Weissmann, C. (1994). Behavioral and anatomical deficits in mice homozygous for a modified beta-amyloid precursor protein gene. *Cell*, **79**, 755-65.

- Nishimoto, I., Okamoto, T., Matsuura, Y., Takahashi, S., Okamoto, T., Murayama, Y. and Ogata, E. (1993). Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G(o) [see comments]. *Nature*, **362**, 75-9.
- Nolte, A., Klussmann, S., Bald, R., Erdmann, V.A. and Furste, J.P. (1996). Mirror-design of L-oligonucleotide ligands binding to L-arginine. *Nat. Biotechnol.*, **14**, 1116-9.
- Oliphant, A.R., Brandl, C.J. and Struhl, K. (1989). Defining the sequence specificity of DNA-binding proteins by selecting binding sites from random-sequence oligonucleotides analysis of yeast Gcn4 Protein. *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 2944-2949.
- Oliphant, A.R. and Struhl, K. (1987). Use of random-sequence oligonucleotides for determining consensus sequences. *Methods Enzymol.*, **155**, 568.
- Pallitto, M.M., Ghanta, J., Heinzelman, P., Kiessling, L.L. and Murphy, R.M. (1999). Recognition sequence design for peptidyl modulators of beta-amyloid aggregation and toxicity. *Biochemistry*, **38**, 3570-8.
- Pallitto, M.M. and Murphy, R.M. (2001). A Mathematical Model of the Kinetics of beta-Amyloid Fibril Growth from the Denatured State. *Biophys. J.*, **81**, 1805-22.
- Pike, C.J., Burdick, D., Walencewicz, A.J., Glabe, C.G. and Cotman, C.W. (1993). Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. *J. Neurosci.*, **13**, 1676-87.
- Poduslo, J.F., Curran, G.L., Kumar, A., Frangione, B. and Soto, C. (1999). Beta-sheet breaker peptide inhibitor of Alzheimer's amyloidogenesis with increased blood-brain barrier permeability and resistance to proteolytic degradation in plasma. *J. Neurobiol.*, **39**, 371-82.
- Pollard, H.B., Arispe, N. and Rojas, E. (1995). Ion channel hypothesis for Alzheimer amyloid peptide neurotoxicity. *Cell. Mol. Neurobiol.*, **15**, 513-26.
- Puchtler, H. and Sweat, F. (1965). Congo red as a stain for fluorescence microscopy of amyloid. *J. Histochem. Cytochem.*, **13**, 693-4.
- Rodi, D.J. and Makowski, L. (1999). Phage-display technology-finding a needle in a vast molecular haystack. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **10**, 87-93.
- Roher, A.E., Palmer, K.C., Yurewicz, E.C., Ball, M.J. and Greenberg, B.D. (1993). Morphological and biochemical analyses of amyloid plaque core proteins purified from Alzheimer disease brain tissue. *J. Neurochem.*, **61**, 1916-26.
- Rost, B. and Sander, C. (1993). Prediction of protein structure at better than 70% accuracy. *J. Mol. Biol.*, **232**, 584-599.

- Rudelli, R.D., Ambler, M.W. and Wisniewski, H.M. (1984). Morphology and distribution of Alzheimer neuritic (senile) and amyloid plaques in striatum and diencephalon. *Acta Neuropathol.*, **64**, 273-81.
- Saitoh, T., Sundsmo, M., Roch, J.M., Kimura, N., Cole, G., Schubert, D., Oltersdorf, T. and Schenk, D.B. (1989). Secreted form of amyloid beta protein precursor is involved in the growth regulation of fibroblasts. *Cell*, **58**, 615-22.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Liao, Z., Lieberburg, I., Motter, R., Mutter, L., Soriano, F., Shopp, G., Vasquez, N., Vandeventer, C., Walker, S., Wogulis, M., Yednock, T., Games, D. and Seubert, P. (1999). Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*, **400**, 173-7.
- Schmid, F.-X. (1989). Spectral methods of characterizing protein conformation and conformational changes. In Creighton, T.E. (ed.) *Protein Structure: A practical Approach*. IRL Press, Oxford, pp. 251-285.
- Schnell, S.A., Staines, W.A. and Wessendorf, M.W. (1999). Reduction of lipofuscin-like autofluorescence in fluorescently labeled tissue. *J. Histochem. Cytochem.*, **47**, 719-30.
- Schröder, J. and Pantel, J. (1999). Morphologische und funktionelle Bildgebung. In Förstl, H. (ed.) *Alzheimer Demenz: Grundlagen, Klinik und Therapie*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 129-153.
- Schubert, D., LaCorbiere, M., Saitoh, T. and Cole, G. (1989). Characterization of an amyloid beta precursor protein that binds heparin and contains tyrosine sulfate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **86**, 2066-9.
- Schumacher, T.N., Mayr, L.M., Minor, D.L., Jr., Milhollen, M.A., Burgess, M.W. and Kim, P.S. (1996). Identification of D-peptide ligands through mirror-image phage display. *Science*, **271**, 1854-7.
- Seilheimer, B., Bohrmann, B., Bondolfi, L., Müller, F., Stuber, D. and Dobeli, H. (1997). The toxicity of the Alzheimer's beta-amyloid peptide correlates with a distinct fiber morphology. *J. Struct. Biol.*, **119**, 59-71.

- Selkoe, D.J. (1999). Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature*, **399**, A23-31.
- Selkoe, D.J. (2001). Alzheimer's disease results from cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid -beta-protein. *J. Alz. Dis.*, **3**, 75-80.
- Serpell, L.C. (2000). Alzheimer's amyloid fibrils: structure and assembly. *Biochim. Biophys. Acta*, **1502**, 16-30.
- Seubert, P., Vigo_Pelfrey, C., Esch, F., Lee, M., Dovey, H., Davis, D., Sinha, S., Schlossmacher, M., Whaley, J. and Swindlehurst, C. (1992). Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature*, **359**, 325-7.
- Shearman, M.S., Ragan, C.I. and Iversen, L.L. (1994). Inhibition of PC12 cell redox activity is a specific, early indicator of the mechanism of beta-amyloid-mediated cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 1470-4.
- Shoghi-Jadid, K., Small, G.W., Agdeppa, E.D., Kepe, V., Ercoli, L.M., Siddarth, P., Read, S., Satyamurthy, N., Petric, A., Huang, S.C. and Barrio, J.R. (2002). Localization of neurofibrillary tangles and beta-amyloid plaques in the brains of living patients with Alzheimer disease. *Am. J. Geriatr. Psychiatry*, **10**, 24-35.
- Sieber, V., Pluckthun, A. and Schmid, F.X. (1998). Selecting proteins with improved stability by a phage-based method. *Nat. Biotechnol.*, **16**, 955-60.
- Simmons, L.K., May, P.C., Tomaselli, K.J., Rydel, R.E., Fuson, K.S., Brigham, E.F., Wright, S., Lieberburg, I., Becker, G.W. and Brems, D.N. (1994). Secondary structure of amyloid beta peptide correlates with neurotoxic activity in vitro. *Mol. Pharmacol.*, **45**, 373-9.
- Sinha, S., Anderson, J.P., Barbour, R., Basi, G.S., Caccavello, R., Davis, D., Doan, M., Dovey, H.F., Frigon, N., Hong, J., Jacobson_Croak, K., Jewett, N., Keim, P., Knops, J., Lieberburg, I., Power, M., Tan, H., Tatsuno, G., Tung, J., Schenk, D., Seubert, P., Suomensari, S.M., Wang, S., Walker, D. and John, V. (1999). Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature*, **402**, 537-40.
- Skovronsky, D.M., Zhang, B., Kung, M.P., Kung, H.F., Trojanowski, J.Q. and Lee, V.M. (2000). In vivo detection of amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 7609-14.

- Small, D.H., Mok, S.S. and Bornstein, J.C. (2001). Alzheimer's disease and Abeta toxicity: from top to bottom. *Nat. Rev. Neurosci.*, **2**, 595-8.
- Smith, G.P. (1985). Filamentous fusion phage: Novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, **228**, 1315-1317.
- Smith, G.P. and Petrenko, V.A. (1997). Phage Display. *Chem. Rev.*, **97**, 391-410.
- Sommer. (2002). Alzheimer's disease and the amyloid cascade hypothesis: ten years on. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **2**, 87-92.
- Soto, C. (1999). Plaque busters: strategies to inhibit amyloid formation in Alzheimer's disease. *Mol. Med. Today*, **5**, 343-50.
- Soto, C., Kindy, M.S., Baumann, M. and Frangione, B. (1996). Inhibition of Alzheimer's amyloidosis by peptides that prevent beta-sheet conformation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **226**, 672-80.
- Soto, C., Sigurdsson, E.M., Morelli, L., Kumar, R.A., Castano, E.M. and Frangione, B. (1998). Beta-sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: implications for Alzheimer's therapy. *Nat. Med.*, **4**, 822-6.
- Soumillion, P., Jespers, L., Bouchet, M., Marchand Brynaert, J., Sartiaux, P. and Fastrez, J. (1994). Phage display of enzymes and in vitro selection for catalytic activity. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **47**, 175-89.
- Spada, S., Honegger, A. and Pluckthun, A. (1998). Reproducing the natural evolution of protein structural features with the selectively infective phage (SIP) technology. The kink in the first strand of antibody kappa domains. *J. Mol. Biol.*, **283**, 395-407.
- Stemmer, W.P. (1994a). DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 10747-51.
- Stemmer, W.P. (1994b). Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature*, **370**, 389-91.
- Sticht, H., Bayer, P., Willbold, D., Dames, S., Hilbich, C., Beyreuther, K., Frank, R.W. and Rösch, P. (1995). Structure of amyloid A4-(1-40)-peptide of Alzheimer's disease. *Eur. J. Biochem.*, **233**, 293-8.
- Styren, S.D., Hamilton, R.L., Styren, G.C. and Klunk, W.E. (2000). X-34, a fluorescent derivative of Congo red: a novel histochemical stain for Alzheimer's disease pathology. *J. Histochem. Cytochem.*, **48**, 1223-32.

- Tjernberg, L.O., Naslund, J., Lindqvist, F., Johansson, J., Karlstrom, A.R., Thyberg, J., Terenius, L. and Nordstedt, C. (1996). Arrest of beta-amyloid fibril formation by a pentapeptide ligand. *J. Biol. Chem.*, **271**, 8545-8.
- Tuerk, C. and Gold, L. (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA Polymerase. *Science*, **249**, 505.
- Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E.A., Denis, P., Teplow, D.B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M.A., Biere, A.L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J.C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G. and Citron, M. (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*, **286**, 735-41.
- Walsh, D.M., Lomakin, A., Benedek, G.B., Condron, M.M. and Teplow, D.B. (1997). Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate. *J. Biol. Chem.*, **272**, 22364-72.
- Walsh, D.M., Hartley, D.M., Kusumoto, Y., Fezoui, Y., Condron, M.M., Lomakin, A., Benedek, G.B., Selkoe, D.J. and Teplow, D.B. (1999). Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates. *J. Biol. Chem.*, **274**, 25945-52.
- Walter, J., Kaether, C., Steiner, H. and Haass, C. (2001). The cell biology of Alzheimer's disease: uncovering the secrets of secretases. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **11**, 585-90.
- Weidemann, A., Konig, G., Bunke, D., Fischer, P., Salbaum, J.M., Masters, C.L. and Beyreuther, K. (1989). Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell*, **57**, 115-26.
- Wengenack, T.M., Curran, G.L. and Poduslo, J.F. (2000). Targeting alzheimer amyloid plaques in vivo. *Nat. Biotechnol.*, **18**, 868-72.
- Wisniewski, H.M., Ghetti, B. and Terry, R.D. (1973). Neuritic (senile) plaques and filamentous changes in aged rhesus monkeys. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **32**, 566-84.
- Witt, K.A., Gillespie, T.J., Huber, J.D., Eggleston, R.D. and Davis, T.P. (2001). Peptide drug modifications to enhance bioavailability and blood-brain barrier permeability. *Peptides*, **22**, 2329-43.

- Wong, C.W., Quaranta, V. and Glenner, G.G. (1985). Neuritic plaques and cerebrovascular amyloid in Alzheimer disease are antigenically related. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **82**, 8729-32.
- Yan, R., Bienkowski, M.J., Shuck, M.E., Miao, H., Tory, M.C., Pauley, A.M., Brashier, J.R., Stratman, N.C., Mathews, W.R., Buhl, A.E., Carter, D.B., Tomasselli, A.G., Parodi, L.A., Heinrikson, R.L. and Gurney, M.E. (1999). Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature*, **402**, 533-7.
- Yankner, B.A., Dawes, L.R., Fisher, S., Villa_Komaroff, L., Oster_Granite, M.L. and Neve, R.L. (1989). Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease. *Science*, **245**, 417-20.
- Zheng, H., Jiang, M., Trumbauer, M.E., Sirinathsinghji, D.J., Hopkins, R., Smith, D.W., Heavens, R.P., Dawson, G.R., Boyce, S. and Conner, M.W. (1995). Beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell*, **81**, 525-31.

11. Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bedanken bei

- Prof. Dr. Dieter Willbold für die Überlassung des interessanten Forschungsthemas und für zahlreiche Diskussionen.
- Katrin Buder für die interessante und nette Zusammenarbeit am Elektronenmikroskop.
- Prof. Dr. Stephan Patt, Universität Jena, und Prof. Dr. Reinhold Linke, MPI München, für die zur Verfügung gestellten Gewebeschnitte.
- Dr. Bettina Schmitt und Dr. Enrico Bucci für die Durchführung der CD- und NMR-Messungen.
- Prof. Dr. Paul Rösch und den Mitgliedern des Lehrstuhls „Struktur und Chemie der Biopolymere“ der Universität Bayreuth, bei denen ich die ersten zwei Monate meiner Doktorarbeit arbeiten durfte und viel gelernt habe. Besonders möchte ich mich bei Dr. Silke Hoffmann bedanken, die mir viel über Phagen-Display und allgemeine Molekularbiologie beigebracht hat.
- allen Mitgliedern der ehemaligen Arbeitsgruppe „Strukturelle und evolutive Biochemie“ für eine (meistens) angenehme Arbeitsatmosphäre. Speziell bedanken möchte ich mich bei Cornelia Luge für die Hilfe bei den Sequenzierungen, Dr. Gesa Jonas für fachliche Hilfe, besonders zu Beginn der Arbeit, Dr. Lars Briese für die Hilfe bei Computerproblemen. Danke auch an alle anderen Personen am IMB, speziell „Görlis!!“, die durch Grillfeste, Doktorfeiern, Geburtstagsfrühstück ... aber auch durch fachliche Diskussionen dazu beigetragen haben, dass ich (meistens) gerne zur Arbeit gegangen bin.
- allen Personen am IMB, die das alltägliche Leben vereinfacht haben durch Hilfe bei Problemen mit Unix (Friedrich Haubensack), Hilfe im bürokratischen Dschungel,
- der Nachbar-Arbeitsgruppe, den „Genomies“, für die nette Nachbarschaft, die Möglichkeit zur DNA-Sequenzierung,
- bei den Kollegen der neuen Arbeitsgruppe am Forschungszentrum Jülich für die ersten Monate in Jülich. Ein besonderer Dank gilt hier den „alten“ Kollegen Dr. Matthias Stoldt und Thomas Stangler, die mir den Umzug nach Jülich leichter gemacht haben. Ich sehe Potential für eine interessante und lustige Zusammenarbeit und darauf freue ich mich.
- Dr. Matthias Gerds für die Hilfe bei der Auswertung der Fluoreszenz-Titrations-Experimente und alles andere!
- meinen Eltern für die Unterstützung während des Studiums und der Promotion.

13. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner erkläre ich, dass ich nicht anderweitig mit oder ohne Erfolg versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich der Doktorprüfung zu unterziehen.

Bayreuth, den

Forschungszentrum Jülich
in der Helmholtz-Gemeinschaft



Jül-4024
Januar 2003
ISSN 0944-2952