

Monoklonaler Antikörper, mbAb 1E8, welcher für die zwei ersten N-terminalen Aminosäuren von Amyloid-beta-Peptiden spezifisch ist und dessen Verwendung zum Nachweis von Amyloid-beta Peptiden und/oder sAPPa

pdfulltext Die Erfindung bezieht sich auf einen monoklonalen Antikörper und auf die Verwendung des Antikörpers zum Nachweis von A-Peptiden und/oder sAPP. Dabei geht es insbesondere um die neurochemische Diagnostik neuropsychiatrischer Erkrankungen unter Betrachtung von A-Peptidkonzentrationen und hierbei wieder insbesondere um Demenzdiagnostik an Körperflüssigkeits- oder Gewebeproben. Aus DE-Z: Psycho, 24 (1998), 726-731 ist es bekannt, dass bei Patienten mit Alzheimer Erkrankung erniedrigte Konzentrationen von A1-42 im Liquor nachweisbar sind. Bei diesen Patienten gibt es auch eine Neigung zu einer Erhöhung bei der Konzentration von N-terminal modifizierten A-Peptiden Ax-42. Demgegenüber soll es keine Konzentrationsänderungen aufgrund einer Alzheimererkrankung bei dem A-Peptid A1-40 geben. Die Konzentrationen der A-Peptide A1-42 und A1-40 im Liquor von Alzheimerpatienten sollen keine absolute Korrelation mit klinischen oder testpsychologischen Parametern des Schweregrads der Demenz zeigen, obwohl sie intraindividuell sehr konstant sein sollen. Es sind Hinweise bekannt, dass auch sAPP bei Alzheimer-Demenz im Liquor erniedrigt ist. Um nähere Informationen über die Korrelation von Demenzerkrankungen und eventuell anderen neuropsychiatrischen Erkrankungen mit der Konzentration aller oder bestimmter A-Peptide in Körperflüssigkeits- oder -gewebeproben zu gewinnen, muss ein Mittel bereitstehen, mit dem die Konzentrationen der A-Peptide sehr genau und reproduzierbar zu bestimmen sind, damit vorhandene Korrelationen nicht durch unvermeidliche Fehler bei den Konzentrationsbestimmungen verwischen. Der Erfindung liegt daher die primäre Aufgabe zugrunde, ein Mittel zum genauen und reproduzierbaren Bestimmen von Konzentrationen von A-Peptiden in einer Körperflüssigkeits- oder -gewebeprobe bereitzustellen. Weiterhin geht es darum, die Anwendung dieses Mittels zu optimieren und aus den damit messbaren Korrelationen zwischen A-Peptidkonzentrationen und neuropsychiatrischen Erkrankungen Vorhersagen abzuleiten, die bei der zukünftigen neurochemischen Diagnostik neuropsychiatrischer Erkrankungen nutzbar sind. Das Mittel, mit dem die Aufgabe der Erfindung gelöst wird, ist der monoklonale Antikörper, der als mAb 1E8 (Zellkultur UM 1998 clone 1E8) bezeichnet wird, der bei der DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, am 19.12.2000 hinterlegt wurde und dem die DSMZ-Aufnahmenummer DSM ACC2485 zugeordnet wurde. Der Antikörper mAb 1E8 kann radioaktiv markiert sein. Er ist aber auch in Verbindung mit einem sekundären Antikörper zu seiner Markierung verwendbar. Es hat sich herausgestellt, dass der Antikörper mAb 1E8 mit hoher Selektivität und Spezifität an A-Peptide A1-x und A2-x sowie an lösliches -Amyloidvorläuferprotein nach -Sekretaseschnitt (sAPP) anbindet. Damit ist die Voraussetzung geschaffen, dass die Konzentration dieser Peptide mit dem Antikörper mAb 1E8 bestimmbar ist. Die Verwendung des Antikörpers mAb 1E8 kann in einem Western-Immunoblot erfolgen. Dabei kann die effektive Selektivität des Antikörpers mAb 1E8 erhöht werden, indem vor dem Einsatz des Antikörpers unspezifische Bindungsstellen mit einem Blockiermittel blockiert

werden. Ein unter dem Handelsnamen "Roti-Block" erhältliches synthetisches Reagenz hat sich in diesem Zusammenhang gegenüber einer üblichen Verwendung von Milchpulver als Blockiermittel als sehr vorteilhaft herausgestellt, da es bei weitgehend erhaltener Selektivität die effektive Avidität - und damit Nachweisempfindlichkeit - des Antikörpers mAb 1E8 erhöht. Dies gilt nicht generell, da beispielsweise ein anderer kommerziell erhältlicher mAb (6E10) mit diesem Verfahren nicht kompatibel ist. Da der Antikörper mAb 1E8 sowohl A-Peptide A1-x als auch A-Peptide A2-x als auch sAPP erkennt, müssen diese Peptide zum selektiven Nachweis voneinander getrennt werden. Dies ist durch eine Natrium-Laurylsulphat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) möglich. Bei einer herkömmlichen SDS-PAGE werden allerdings nur die A-Peptide A1-x und/oder A2-x insgesamt von dem sAPP abgetrennt, weil die effektiven Molekülgrößen der A-Peptide A1-x und/oder A2-x nicht hinreichend unterschiedlich sind. Durch Harnstoffzugabe und in zusätzlicher Abhängigkeit von Detergenzienkonzentration, Gelporengröße, pH-Wert und Temperatur kann jedoch eine aminosäureprimärsequenzspezifische Konformationsänderung der A-Peptide induziert werden, die die Lauflängen der carboxyterminal unterschiedlich langen A-Peptide A1-x und A2-x in der SDS-PAGE unterscheidbar macht. Diese Methode wird hier auch als A-SDS-PAGE bezeichnet. Von anderen in der jeweiligen Körperflüssigkeits- bzw. -gewebeprobe enthaltenen Substanzen können die A-Peptide zuvor durch isoelektrische Fokussierung in einer zu der Richtung der SDS-PAGE senkrechten Richtung separiert werden. So kann unter Verwendung des Antikörpers mAb 1E8 in einer Probe, die aus der Gruppe ausgewählt ist, welche Liquor, Hirnhomogenisat, Plasma und Mischungen davon umfasst, eine Konzentration des A-Peptids A1-42 bestimmt werden, von der bereits bekannt ist, dass absolute Erhöhungen im Hirnhomogenat und Erniedrigung im Liquor derselben beispielsweise in Korrelation mit Alzheimererkrankungen auftreten. Unter Verwendung des Antikörpers mAb 1E8 ist es aber auch möglich, eine Probe, die aus der Gruppe ausgewählt ist, welche Liquor, Hirnhomogenisat und Mischungen davon umfasst, auf das Vorliegen einer nachweisbaren Konzentration des A-Peptids A2-42 zu überprüfen. Eine solche Nachweisgrenze liegt bei 100 pg/ml oder höher. Wenn sie überschritten wird, kann hieraus auf das Vorliegen einer Demenzerkrankung aus der Gruppe der Proteinfaltungserkrankungen bei dem Patienten, von dem die Probe stammt, geschlossen werden. Zur Gruppe der Proteinfaltungserkrankungen gehören neben der Alzheimerkrankheit die Lewy-Körperchen-Demenz und die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit. Bei vielen Patienten mit diesen Krankheiten konnten hohe Konzentrationen des A-Peptids A2-42 in Liquorproben festgestellt werden. Die Auswertung von Plasmaproben ist hier im Gegensatz zu den vorangehend beschriebenen Verwendungen des Antikörpers mAb 1E8 schwierig, weil die Konzentration des A-Peptids A2-42 bereits im Liquor bei der Nachweisgrenze liegt, und die natürliche Konzentration der A-Peptide im Plasma deutlich niedriger ist als im Liquor. Um gleich hohe Konzentrationen in den Proben zu erhalten, muss daher im Plasma immer ein Aufkonzentrationsschritt, beispielsweise durch Immunopräzipitation mit dem Antikörper mAb 1E8, vor der eigentlichen Konzentrationsbestimmung durchgeführt werden. Als besonders signifikant für das Vorliegen einer Demenzerkrankung aus der Gruppe der Proteinfaltungserkrankungen hat sich ein Anstieg im Verhältnis zwischen der Konzentration des A-Peptids A2-42 zu der Konzentration des A-Peptids A1-42 in der jeweiligen Probe herausgestellt. Bei diesen Demenzerkrankungen kommt es offensichtlich zu einem Vorgang, der die Erzeugung des A-Peptids A2-42 zu Lasten der Erzeugung des A-Peptids A1-42 fördert. Die Verwendung des

Antikörpers mAb 1E8 erschließt noch weitere neurochemische Diagnosemöglichkeiten. So kann in einer Probe, die aus der Gruppe ausgewählt ist, welche Liquor, Hirnhomogenisat, Plasma und Mischungen davon umfasst, mindestens ein Konzentrationsverhältnis bestimmt werden, das aus der Gruppe ausgewählt ist, welche ein Verhältnis zwischen einer Konzentration des A-Peptides A1-42 zu einer Konzentration des A-Peptides A1-40, ein Verhältnis zwischen einer Konzentration des A-Peptides A1-42 zu einer Konzentration des A-Peptides A1-38 und ein Verhältnis zwischen einer Konzentration des A-Peptides A1-38 zu einer Konzentration des A-Peptides A1-40 umfasst. Den Bestimmungen dieser Konzentrationsverhältnisse liegt die neue Erkenntnis zugrunde, dass bei verschiedenen neuropsychiatrischen Erkrankungen signifikante Verschiebungen dieser relativen Konzentration an A-Peptiden gegenüber einem Vergleichspatientenkollektiv auftreten. So kann beim Vergleichen des Konzentrationsquotienten A1-38/A1-40 mit einem vorgegebenen Grenzwert darauf geschlossen werden, dass beim Unterschreiten des Grenzwerts eine Alzheimererkrankung vorliegt. Dieser Grenzwert liegt im Liquor typischerweise zwischen 0,285 und 0,300. Diese Zahlenangaben beziehen sich wie alle weiteren Zahlenangaben, soweit im Einzelfall nichts anderes angegeben ist, auf Liquorproben, die nach ihrer Gewinnung jeweils einmalig zur Konservierung eingefroren wurden. Umgekehrt kann beim Vergleichen dieses Konzentrationsquotienten A1-38/A1-40 mit einem anderen Grenzwert darauf geschlossen werden, dass beim Überschreiten eine chronisch entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems vorliegt. Dieser Grenzwert liegt im Liquor typischerweise zwischen 0,250 und 0,260. Er liegt damit zwar unterhalb des Grenzwerts, bei dessen Unterschreiten auf eine Alzheimer Krankheit geschlossen wird. Die Überschneidung ist aber nur gering. Dabei ist auch zu sehen, dass die hier getroffenen Diagnosen im Rahmen einer differenziellen Diagnostik zu sehen sind. So kann beim Überschreiten des Grenzwerts für die Alzheimererkrankung relativ sicher ausgeschlossen werden, dass eine solche Krankheit vorliegt. Umgekehrt kann beim Unterschreiten des Grenzwerts für eine chronische entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems darauf geschlossen werden, dass keine solche Erkrankung vorliegt. Auch der Konzentrationsquotient A1-42/ A1-40 weist bei dem Unterschreiten eines vorgegebenen Grenzwerts daraufhin, dass eine Alzheimererkrankung vorliegt. Hier liegt der Grenzwert im Liquor typischerweise zwischen 0,130 und 0,145. Bei dem Konzentrationsquotienten A1-42/A1-38 hat sich herausgestellt, dass dieser bei Erfüllung einer Ungleichung:  $A \cdot A1-42/A1-38 + B > A1-38/A1-40$  Zusammen mit dem Konzentrationsquotienten A1-38/A1-40 auf das Vorliegen einer Alzheimererkrankung hinweist, wobei A und B Konstanten sind, für die im Liquor  $0,2 < A < 0,8$  und  $0,5 \cdot A < B < 2 \cdot A$  und  $B < 0,9$  gilt. Die bis hierher und nachfolgend beschriebenen neurochemischen Diagnosemöglichkeiten sind zwar unter Verwendung des Antikörpers mAb 1E8 entwickelt worden. Sie sind aber genauso mit anderen Mitteln zum Bestimmen der Konzentrationen der einzelnen A-Peptide A1-x und A2-x umsetzbar. Hierbei kann es zu Verschiebungen der angegebenen Grenzwerte durch unterschiedliche Spezifitäten der Nachweismittel für die einzelnen A-Peptide relativ zu den Spezifitäten des Antikörpers mAb 1E8 kommen. Neben den bislang angesprochenen Konzentrationsquotienten zwischen den Konzentrationen einzelner A-Peptide hat sich herausgestellt, dass relative Anteile einzelner A-Peptide an den insgesamt vorliegenden A-Peptiden ebenfalls diagnostisch in Bezug auf neuropsychiatrische Erkrankungen auswertbar sind. So kann in einer Probe, die aus der Gruppe ausgewählt ist, welche Liquor, Hirnhomogenisat, Plasma und Mischungen davon umfasst,

mindestens ein relativer Anteil A1-n% einer Konzentration eines A-Peptids A1-n an einer Konzentration von A-Peptiden A1-x bestimmt werden, wobei der relative Anteil A1-n% aus der Gruppe ausgewählt ist, welche einen relativen Anteil A1-42% einer Konzentration des A-Peptids A1-42, einen relativen Anteil A1-40% einer Konzentration des A-Peptids A1-40 und einen relativen Anteil A1-38% einer Konzentration des A-Peptids A1-38 umfasst, und wobei die Konzentration von A-Peptiden A1-x wenigstens die Konzentration der A-Peptide A1-38, A1-40 und A1-42 aus der Gruppe der A-Peptide A1-37, A1-38, A1-39, A1-40 und A1-42 umfasst. Mit dem Antikörper mAb 1E8 ist es bei geeigneter Verfahrensführung möglich, die Konzentrationen sämtlicher genannter A-Peptide neben denjenigen des sAPP zu bestimmen. Die stärksten Konzentrationen werden bei den A-Peptiden A1-38, A1-40 und A1-42 festgestellt. Bei diesen A-Peptiden finden sich auch signifikante Änderungen der relativen Anteile beim Auftreten neuropsychiatrischer Erkrankungen. Wegen der Dominanz der A-Peptide A1-38, A1-40 und A1-42 reicht es dabei aus, die relativen Anteile in Bezug auf dieses Kollektiv der drei primär vorkommenden A-Peptide zu bestimmen. Es ist aber auch eine Berücksichtigung aller fünf oben genannten A-Peptide für die Bezugsgröße der relativen Anteile möglich und sinnvoll. Die Konzentrationen auf nur die drei hauptsächlich vorkommenden A-Peptide ermöglicht es auch, die hier beschriebene Diagnostik mit Hilfe anderer Verfahren zur Konzentrationsbestimmung durchzuführen. So können die Konzentrationen der drei A-Peptide A1-38, A1-40 und A1-42 beispielsweise mit speziellen Essays für diese drei A-Peptide ermittelt werden. Bei der Analyse des relativen Anteils A1-38% hat sich herausgestellt, dass dieser beim Überschreiten eines vorgegebenen Grenzwerts auf das Vorliegen einer chronischen entzündlichen Erkrankung des zentralen Nervensystems hinweist, wobei dieser vorgegebene Grenzwert typischerweise und bei Verwendung des Antikörpers mAb 1E8 zur Konzentrationsbestimmung der A-Peptide im Liquor zwischen 15,0 und 15,7% liegt. Bei der Analyse des relativen Anteils A1-42% hat sich ergeben, dass ein Unterschreiten eines vorgegebenen Grenzwerts auf das Vorliegen einer Alzheimererkrankung hinweist. Dieser vorgegebene Grenzwert liegt zwischen 8 und 9%. Unter Verwendung des Antikörpers mAb 1E8 zur Konzentrationsbestimmung der A-Peptide im Liquor kann er auf den Bereich 8,3 bis 8,8% eingegrenzt werden. Gleichzeitig weist das Überschreiten eines vorgegebenen Grenzwerts durch den relativen Anteil A1-42% auf das Vorliegen einer chronischen entzündlichen Erkrankung des zentralen Nervensystems hin. Dieser Grenzwert liegt im Liquor zwischen 9,1 und 9,6%. Der relative Anteil A1-40% weist dann auf das Vorliegen einer Alzheimererkrankung hin, wenn ein vorgegebener Grenzwert überschritten wird, der im Liquor typischerweise zwischen 59 und 61% liegt. Es besteht eine positive Korrelation zwischen Schwere der Alzheimer-Demenz, abgebildet über den Mini-Mental-Status Test (MMSE, 0-30 Punkte; 27-20: leichte Demenz; 19-11 Punkte: mittelschwere Demenz; 10-0 Punkte: schwere Demenz), und A1-40%. Demenzpatienten mit A1-40%  $\geq 60$  haben im Mittel einen deutlich höheren Schweregrad der Demenz (MMSE 15-16) im Vergleich zu Demenzpatienten mit A1-40%  $< 60$  (MMSE 19-20). Dagegen besteht eine negative Korrelation zwischen Schwere der Alzheimer-Demenz und A1-38%. Demenzpatienten mit A1-38%  $< 17$  haben im Mittel einen deutlich höheren Schweregrad der Demenz (MMSE 14-15) im Vergleich zu Demenzpatienten mit A1-38%  $\geq 17$  (MMSE 19-20). Aufgrund der Beziehung (A1-38% & A1-40% = Schweregrad der Demenz) ist wie zu erwarten der Quotient A1-38/A1-40 negativ mit dem Schweregrad der Demenz korreliert: Demenzpatienten mit A1-38/A1-40  $< 0,28$  haben im

Mittel einen deutlich höheren Schweregrad der Demenz (MMSE 14-15) im Vergleich zu Demenzpatienten mit A1-38/A1-40 0,28 (MMSE 19-20). In der Anwendung des Antikörpers mAb 1E8 hat sich herausgestellt, dass für diesen Antikörper eine Fraktion der A-Peptide A1-x und A2-x zugänglich ist, die von der Probenvorbehandlung abhängig ist. Die nachweisbaren A-Konzentrationen könnten dadurch maximiert werden, dass die A-Peptide in den Proben durch eine Behandlung mit einem Detergenz aufgeschlossen wurden. Bewährt hat sich hierzu eine SDS-Hitzedenaturierung. In diesem Zusammenhang konnte weiter festgestellt werden, dass eine Kältekonserverung von Proben, die vor dem Aufschluss mit einem Detergenz erfolgt, die anschließend auch nach einem Aufschluss der Probe mit einem Detergenz bestimmbar Konzentrationen von A-Peptiden reduziert. Hieraus lässt sich die Forderung ableiten, die Proben vor der Kältekonserverung und jeglicher anderer Kältebehandlung bereits der Probenbehandlung mit dem Detergenz zu unterwerfen. Darüber hinaus hat sich ergeben, dass Teilmengen des A-Peptids A1-42, die nach einer Kältebehandlung auch durch Aufschluss der Probe mit einem Detergenz nicht mehr dem Nachweis mit dem Antikörper mAb 1E8 zugänglich sind, bei Patienten mit und ohne Proteinfaltungserkrankungen unterschiedlich groß sind. Es gibt offensichtlich unterschiedliche Fraktionen des A-Peptids A1-42 in einer Probe, wobei diese Fraktionen unterschiedlich auf Kältebehandlungen und den Aufschluss mit einem Detergenz reagieren und gleichzeitig in ihren Konzentrationen mit dem Vorliegen von Proteinfaltungskrankheiten variieren. Das unterschiedliche Verhalten dieser Fraktionen gegenüber Kälte weist auf eine Kältepräzipitation hin, so dass auch andere Präzipitationstechniken zum Unterscheiden der beiden Fraktionen möglich sind. So kann eine Probe in mindestens zwei Teilproben unterteilt werden, von denen eine erste Teilprobe der Probenbehandlung mit dem Detergenz vor oder statt einer Präzipitationsbehandlung unterworfen wird, während die zweite Teilprobe vor oder statt der Probenbehandlung mit dem Detergenz vorgenommen wird. Anschließend werden die in beiden Probenteilen bestimmten Konzentrationen des A-Peptids A1-42 miteinander verglichen. Die erwähnte Präzipitationsbehandlung kann neben einer Kältebehandlung auch ein Immunoaffinitätsverfahren umfassen. Interessant ist es insbesondere, eine Differenz A1-42 zwischen den in den beiden Probenteilen bestimmten Konzentrationen des A-Peptids A1-42 zu ermitteln. Dieser Wert ist ein hochsignifikanter Hinweis auf das Vorliegen einer Proteinfaltungskrankheit. In der praktischen Anwendung Antikörpers mAb 1E8 können die A-Peptide, an die der Antikörper mAb 1E8 gebunden ist, mit einem gegen den Antikörper mAb 1E8 gerichteten sekundären Antikörper markiert werden. Der gegen den Antikörper mAb 1E8 gerichtete sekundäre Antikörper kann bereits mit einem mengenmäßig registrierbaren Marker versehen sein oder nach seiner Immunreaktion mit dem Antikörper mAb 1E8 mit einem mengenmäßig registrierbaren Marker versehen werden. Bei der mengenmäßigen Registrierung des Markers ist es bevorzugt, diese Registrierung photometrisch mit einer CCD-Kamera vorzunehmen, weil dieses Vorgehen eine sehr hohe Linearität zwischen dem Signal der CCD-Kamera und den registrierten Mengen des markierten Antikörpers mAb 1E8 gewährleistet. Der neue Antikörper ist neben den bisher beschriebenen Diagnosemöglichkeiten auch zum reinen Aufkonzentrieren von A-Peptiden A1-x und/oder A1-x und/oder A2-x und/oder sAPP geeignet. Eine weitere Verwendungsmöglichkeit ergibt sich bei der Unterscheidung von A-Peptiden A1-x und A2-x von A-Peptiden An-x mit  $n > 2$ , da der Antikörper mAb 1E8 eine ausgeprägte N-terminale Spezifität aufweist und an A-Peptide

An-x mit  $n > 2$  deutlich geringer anbindet ( $< 5\%$ ), wenn er unter den spezifischen Bedingungen des A-SDS-PAGE/Immunoblot eingesetzt wird. Die Erfindung wird im Folgenden durch eine Charakterisierung und eine Beschreibung eines Verfahrens zur Herstellung des Antikörpers mAb 1E8 sowie in Form einer Beschreibung von Anwendungen des Antikörpers mAb 1E8 näher erläutert und beschrieben. In den beigefügten Figuren zeigt: Fig. 1: ein Flußdiagramm der Patientenkollektive, bei denen A-Peptide mittels A-SDS-PAGE/Immunoblot im Liquor oder Plasma gemessen wurden. Die einfach umrahmten Patientenkollektive sind Teilmengen ihrer doppelt umrahmten Obergruppen. Einige Patienten befinden sich gleichzeitig in mehreren Kollektiven (vergl. Tabellen 5a-d) Die NDC-3 Untergruppen IP-Plasma-3 ( $n=5$ ), IP-CSF-3 ( $n=5$ ) und SDS-CSF-3 ( $n=5$ ) sind nicht aufgeführt (vergl. 2.9.1). Fig. 2: einen A-IPG-2D-PAGE/Immunoblot-2 (Panel A, C) und A-SDS-PAGE/Immunoblot-2 (Panel B) von synthetischen A-Peptiden, humanem Liquor und Liquor mit Zusatz synthetischer A-Peptide. Fig. 3: eine Bestimmung von A-Peptiden im Liquor bei NDC-3 mittels A-SDS-PAGE/Immunoblot-2 und ein Vergleich zwischen Trenngel mit (Panel A) und ohne Harnstoff (Panel B). Dabei gilt für die Spalten 1 bis 8: 10  $\mu$ l Liquor pro Patient. Der Liquor wurde nativ eingefroren und anschließend SDS-/hitzenedenaturiert. Für die Spalten a bis e gilt: Mix synthetischer A-Peptide (Verdünnungsreihe). Fig. 4: eine Auftragung von A1-42 im Liquor bei den Patientenkollektiven NDC-1 und AD-1, bestimmt mittels A-SDS-PAGE/Immunoblot-1 und densitometrischer Filmauswertung. Fig. 5: eine Auftragung des Quotienten A1-42/A1-40 im Liquor bei NDC-1 und AD-1, bestimmt mittels A-SDS-PAGE/Immunoblot-1 und densitometrischer Filmauswertung. Fig. 6: eine Auftragung des Quotienten A1-42/A1-38 im Liquor bei NDC-1 und AD-1, bestimmt mittels A-SDS-PAGE/Immunoblot-1 und densitometrischer Filmauswertung. Fig. 7: eine Auftragung von A1-42 im Liquor bei NDC-1 und AD-1, bestimmt mittels Immunopräzipitation (IP ohne Detergenz, mAb 6E10) und A-SDS-PAGE/Immunoblot-1 mit densitometrischer Filmauswertung. Fig. 8: eine Auftragung von A-Peptidkonzentrationen, bestimmt mittels A-SDS-PAGE/Immunoblot-2 im Liquor bei OND-3, CID-3 und AD-3. Fig 9: eine Auftragung von A-Peptidkonzentrationen, bestimmt mittels A-SDS-PAGE/Immunoblot-2 im Liquor bei Patienten der Gruppen OND-3 und AD-3 mit ein oder zwei ApoE 4 Allelen (AD-34plus, OND-34plus), im Vergleich zu OND-3 Patienten ohne ApoE 4 Allel (OND4minus). Fig. 10: eine Korrelation von A-38 und A1-40 im Liquor bei NDC-3 und eine Korrelationsmatrix der A-Peptide. Fig. 11: eine Auftragung von A1-38% über A1-40% im Liquor bei OND-3, CID-3 und AD-3. Die Regressionsgrade bezieht sich auf das Kollektiv AD-3. In Pfeilrichtung steigt der Schweregrad der Demenz. Die Grenzwertlinien ( $A1-38\%=15.5$ ,  $A1-42\%=9.6$ ) beziehen sich auf das Kollektiv CID-3. Einzelne Patienten werden über ihre Code-Nummern identifiziert. Fig. 12: eine Auftragung von A1-40% über A1-42% im Liquor bei OND-3, CID-3 und AD-3. Die Regressionsgrade bezieht sich auf das Kollektiv AD-3. In Pfeilrichtung steigt der Schweregrad der Demenz. Die Grenzwertlinien ( $A40\%=63.0$ ,  $A42\%=8.5$ ) beziehen sich auf das Kollektiv AD-3. Einzelne Patienten werden über ihre Code-Nummern identifiziert. Fig. 13: eine Auftragung von A1-40% über A1-38% im Liquor bei OND-3, CID-3 und AD-3. Die Regressionsgrade bezieht sich auf das Kollektiv AD-3. In Pfeilrichtung steigt der Schweregrad der Demenz. Die Grenzwertlinien ( $A38\%=15.5$ ,  $A40\%=60.0$ ) beziehen sich auf das Kollektiv CID-3. Die unterbrochenen Grenzwertlinien ( $A38\%=16.0$ ,  $A40\%=63.0$ ) kennzeichnen AD-3 Patienten mit schwerer Demenz. Einzelne Patienten werden über ihre Code-Nummern identifiziert. Fig. 14: einen Box-Plot der MMSE Testergebnisse im Liquor bei AD-3

in Abhängigkeit von den prozentualen A-Peptidanteilen an der A-Peptidgesamtkonzentration. Fig. 15: MMSE Testergebnis in Abhängigkeit des prozentualen A-Peptidanteils im Liquor an der A-Peptidgesamtkonzentration bei AD-3. Fig. 16: eine Auftragung von A1-38/A1-40 über A1-42/A1-38 im Liquor bei OND-3, CID-3 und AD-3. Die Regressionsgrade bezieht sich auf das Kollektiv AD-3. Die gestrichelte Grenzwertlinie ist eine Parallele zur Regressionsgeraden. In Pfeilrichtung steigt der Schweregrad der Demenz. Die Grenzwertlinien ( $A1-38/A1-40 = 0.26$ ,  $A1-42/A1-38 = 0.57$ ) beziehen sich auf das Kollektiv CID-3. Einzelne Patienten werden über ihre Code-Nummern identifiziert. Fig. 17: eine Auftragung von A1-38/A1-40 über A1-42/A1-40 im Liquor bei OND-3, CID-3 und AD-3. Die Regressionsgrade bezieht sich auf das Kollektiv AD-3. In Pfeilrichtung steigt der Schweregrad der Demenz. Die Grenzwertlinien ( $A1-38/A1-40 = 0.26$ ,  $A1-42/A1-40 = 0.16$ ) beziehen sich auf das Kollektiv CID-3. Einzelne Patienten werden über ihre Code-Nummern identifiziert. Fig. 18: einen Box-Plot der MMSE Testergebnisse im Liquor bei AD-3 in Abhängigkeit des Quotienten A1-38/A1-40. Fig. 19: eine Auftragung von A1-42nativ im Liquor bei NDC-3KP und AD-3KP über A1-42%, d.h. in Abhängigkeit von der kältepräzipitationsbedingten Erniedrigung von A1-42. Die Grenzwertlinien ( $A1-42 = 2100$ ,  $A1-42\% = -17$ ) beziehen sich auf das Kollektiv AD-3KP. Die Nullachse, d.h. keine kältepräzipitationsbedingte Erniedrigung von A1-42, ist durch eine Linie gekennzeichnet. Der ApoE-Genotyp wird für die NDC-3KP Patienten angegeben. 9/11 AD-3KP Patienten hatten mindestens ein ApoE 4 Allel. Für 2/11 AD-3KP Patienten lag der ApoE 4 Genotypus nicht vor. Fig. 20: eine Auftragung von A1-42SDS im Liquor bei NDC-3KP und AD-3KP in Abhängigkeit von A1-42%, d.h. in Abhängigkeit von der kältepräzipitationsbedingten Erniedrigung von A1-42. Die Grenzwertlinien ( $A1-42 = 2100$ ,  $A1-42\% = -17$ ) beziehen sich auf das Kollektiv AD-3KP. Die Nullachse, d.h. keine kältepräzipitationsbedingte Erniedrigung von A1-42, ist durch eine Linie gekennzeichnet. Der ApoE-Genotyp wird für die NDC-3KP Patienten angegeben. 9/11 AD-3KP Patienten hatten mindestens ein ApoE 4 Allel. Für 2/11 AD-4 Patienten lag der ApoE 4 Genotypus nicht vor. Fig. 21a: einen A-SDS-PAGE/immunoblot-2: Immunopräzipitate (RIPA-IP, mAb 1E8) RIPA-löslicher A-Peptide aus Homogenaten von temporalem Kortex bei AD im Vergleich mit frontotemporaler Demenz (FTD). Auftragsvolumen 4 µl. In den Spalten a bis c: Mix synthetischer A-Peptide (Verdünnungsreihe). In den Spalten 1 bis 4 und 5: temporaler Kortex bei AD. (\* Das Immunopräzipitat bei AD wurde bei einigen Patienten zwanzigfach verdünnt.) In den Spalten 8 bis 10: temporaler Kortex bei FTD. Fig. 21b: einen A-SDS-PAGE/Immunoblot-2: Immunopräzipitate (RIPA-IP, mAb 1E8) RIPA-löslicher A-Peptide aus Homogenaten von temporalem Kortex bei AD im Vergleich mit frontotemporaler Demenz (FTD), Lewy-Körperchen Demenz (LBD) und Kontrollpatient ohne Demenz (NDC). Auftragsvolumen 4 µl. In den Spalten a bis d: Mix synthetischer A-Peptide (Verdünnungsreihe) 5 und 6: temporaler Kortex bei AD 11 und 12: temporaler Kortex bei FTD 13 bis 15: temporaler Kortex bei LBD; (13) LBD CERAD A, (14) LBD CERAD C, (15) LBD CERAD C 16: temporaler Kortex bei NDC \* Das Immunopräzipitat bei AD wurde bei einigen Patienten zwanzigfach verdünnt. Fig. 22: einen A-SDS-PAGE/Immunoblot-2: Immunopräzipitate (mAb 1E8) RIPA-löslicher A-Peptide bei AD aus Hirnhomogenaten unterschiedlicher Hirnregionen. Intraindividuelle Vergleich von Cerebellum und temporalem Kortex. Auftragsvolumen 4 µl. In den Spalten: a bis c: Mix synthetischer A-Peptide (Verdünnungsreihe) 1 bis 7: Cerebellum 1\* bis 7\*: temporaler Kortex, \* Immunopräzipitate zwanzigfach verdünnt Fig. 23a: einen A-SDS-PAGE/Immunoblot-2, in dem vergleichend zu

einem Mix synthetischer A-Peptide (1) dargestellt sind: (2) SDS-/Hitzedenaturierte Zellkulturüberstände von humanAPP751Sw transgenen H4 Neuroglioma Zellen (Auftragsvolumen 4 µl), (3) 10 µl Liquor eines NDC Patienten und (4) 10 µl Liquor eines AD Patienten. Fig. 23b: einen A-SDS-PAGE/Immunoblot-2 in dem vergleichend zu einem Mix synthetischer A-Peptide (1) die Immunopräzipitate (mAb 1E8) RIPA-löslicher A-Peptide folgender Hirnhomogenate dargestellt sind: (2) temporaler Kortex bei AD (3) temporaler Kortex bei frontotemporaler Demenz (4) temporaler Kortex, Kontrollpatient ohne Demenz \* Das Immunopräzipitat bei AD wurde zwanzigfach verdünnt. Fig. 24: drei A-IPG-2D-PAGE/Immunoblots-2: oben: eine zweidimensionale Auftrennung synthetischer A-Peptide. Durch die N-terminale Verkürzung um Aspartat wird der Isoelektrische Punkt (Ip) um eine pH-Einheit basischer. Mitte: Immunopräzipitation (mAb 1E8) und zweidimensionale Auftrennung von Liquor eines Patienten mit AD, der in der A-SDS-PAGE die Bande mit dem Rf-Wert für A2-42 zeigte. unten: Immunopräzipitation (mAb 1E8) RIPA-löslicher A-Peptide und zweidimensionale Auftrennung aus dem temporalen Kortex bei AD. Die Bande mit dem Rf-Wert für A2-42 in der A-SDS-PAGE wird auch zweidimensional als A2-42 identifiziert. Fig. 25a: einen A-SDS-PAGE/Immunoblot-2 von A-Peptiden im Liquor vom Meerschweinchen. Der Liquor wurde vor dem Einfrieren SDS-/Hitzedenaturiert. In den Spalten: 1 bis 3: 10 µl Liquor von Meerschweinchen 1, 2 und 3 a bis d: Verdünnungsreihe synthetischer A-Peptide. Fig. 25b: einen A-SDS-PAGE/Immunoblot-2 von A-Peptiden im Liquor vom Kaninchen. Der Liquor wurde vor dem Einfrieren SDS-/Hitzedenaturiert. In den Spalten: 1 bis 3: 10 µl Liquor a: synthetische A-Peptide. Fig. 26: einen A-SDS-PAGE/Immunoblot-2 von hippokampalen Gewebeschnitten mit Kurzzeitkultur (0-8h) vom adulten Meerschweinchen. Jeweils zwei Gewebeschnitte (Dicke 500 µm) wurden gepoolt, in Anwesenheit von RIPA Detergentien homogenisiert und immunopräzipitiert (mAb 1E8). Die zugehörigen Kulturüberstände (2 x 500 µl) wurden gleichfalls gepoolt und in Anwesenheit von RIPA immunopräzipitiert (mAb 1E8). In den Spalten: 0 bis 8, intrazellulär: Zeitverlauf der intrazellulären Konzentration von A-Peptiden im hippokampalen Gewebeschnitt unmittelbar nach Gewinnung (0) bis zu acht Stunden (8; Doppelmessung) in Kurzzeitkultur. 1 bis 8, Überstände: Zeitverlauf der in die Kulturüberstände freigesetzten A-Peptide. synth. A: synthetisches A1-40 und A1-42 Fig. 27: zwei A-SDS-PAGE/Immunoblots-2, die eine Behandlung einer human751APPSw transgenen H4 Neuroglioma Zelllinie mit unterschiedlichen Proteaseinhibitoren (23a) und einen dosisabhängigen Effekt von Calpaininhibitor-1 (23b) zeigen. Die freigesetzten A-Peptide wurden in jeweils 4 µl SDS-/Hitzedenaturierten Zellkulturüberständen quantifiziert (vergl. Fig. 23a,b). Vergleichend wurde die sAPP Konzentration in den Zellkulturüberständen bestimmt. Im Panel a ist: (1) DMSO-Kontrolle; (2) 50 µM Calpaininhibitor-1; (3) 100 µM Calpaininhibitor-3; (4) 5 µM MG132; (5) 25 µM Calpeptin; (a-d) Mix synthetischer A-Peptide. Im Panel b ist: (1,1\*) DMSO-Kontrolle; (2,2\*) 12.5 µM Calpaininhibitor-1; (3,3\*) 25 µM Calpaininhibitor-1; (4,4\*) 50 µM Calpaininhibitor-1; (a-e) Mix synthetischer A-Peptide; \* Doppelbestimmung. Fig. 28a: einen A-SDS-PAGE/Immunoblot-2, der eine Behandlung einer humanAPP751Sw transgenen H4 Neuroglioma Zelllinie mit unterschiedlichen Konzentrationen von Calpaininhibitor-1 zeigt (vergl. Fig. 23b). Die freigesetzten A-Peptide wurden in jeweils 4 µl SDS-/hitzedenaturierten Zellkulturüberständen quantifiziert. Vergleichend zur DMSO-Kontrolle wurde dosisabhängig der Effekt von Calpaininhibitor-1 auf die A-Peptidkonzentration im Überstand untersucht. Fig. 28b: einen A-SDS-PAGE/Immunoblot-2, der eine Behandlung einer humanAPP751Sw transgenen H4 Neuroglioma Zelllinie mit unterschiedlichen Konzentrationen von



Calpaininhibitor-1 zeigt (vergl. Fig. 23b). Die freigesetzten A-Peptide wurden in jeweils 4 µl SDS-/hitzedenaturierten Zellkulturüberständen quantifiziert. Vergleichend zur DMSO-Kontrolle wurde dosisabhängig der Effekt von Calpaininhibitor-1 auf den prozentualen Anteil einer A-Peptidspecies an der A-Peptidgesamtkonzentration untersucht. Weiterhin sind 21 Tabellen beigelegt. 0

Herstellung des monoklonalen anti A-Antikörpers 1E8 Die Herstellung des monoklonalen Antikörpers mAb 1E8 erfolgte in Auftrag der Schering AG bei der Auftragsfirma "nano Tools Antiköperteknik" in Denzlingen nach deren Standardverfahren. Die Erstellung der Immunisierungs- und Screening-Strategie erfolgte in Absprache mit der Schering AG.

Kurzbeschreibung: Zur Immunisierung Balb/c Mäusen wurde das gesamte A Protein (1-42) eingesetzt (10µg/Immunisierung). Es erfolgte eine Primärimmunisierung sowie 3 sich anschließende Booster-Immunisierungen. Die Immunisierungen erfolgten im Abstand von jeweils 2 Wochen. Danach wurde das Tier getötet und die Milz zur Zellfusion mit einer Maus-Myelomzelllinie eingesetzt. Die fusionierten Zellen wurden auf 96-Loch-Gewebekulturplatten übertragen und in Gegenwart von Feeder-Makrophagen kultiviert. Zur Identifizierung der N-terminal spezifischen Antikörper wurden das Peptid 1-16 kovalent an entsprechend aktivierte ELISA-Platten gekoppelt und für das Screening mit den Hybridomzellüberständen eingesetzt. Die A 1-16-positiven Klone wurden danach rekloniert und wiederholt getestet. Nach Expansion der Klone erfolgte die Cryo-Konservierung. Die Anreicherung des Antikörpers wurde mit Hilfe der Ionenaustauscherschromatographie unter nicht-denaturierenden Bedingungen durchgeführt.. Zur Eingrenzung der Spezifität des Antikörpers wurde ein Epitop-Mapping aus Cellulosegebundenen linearen Peptiden vorgenommen (Spotsynthese). Dazu wurde die Primärsequenz von A als Serie überlappender Peptide in Form von "Spots" auf einer Cellulosemembran synthetisiert und die Membran analog zum Western-Blot-Verfahren mit den monoklonalen Antikörpern inkubiert. Die Detektion spezifisch-gebundener Antikörper erfolgte mit einem Sekundärantikörper. Die Analyse ergab, dass der Antikörper 1E8, der Subklasse IgG1 kappa zugehörig, ein N-terminales lineares Epitop detektiert, das aus den ersten 8 N-terminalen Aminosäuren der A-Sequenz ausgebildet wird. Dieser Antikörper erwies sich in nachfolgenden Experimenten als geeignet für den Nachweis von nativem A im Western Bot, Immunpräzipitation, Immunohistochemie und ELISA. 1 Übersicht

1.1 Beschreibung der Methodik Es wird eine Natrium-Laurylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) für die Auftrennung des -Amyloidvorläuferproteins (APP) und seiner Metabolite, insbesondere den -Amyloid Peptiden (A-Peptide), beschrieben. Die spezielle SDS-PAGE, im folgenden A-SDS-PAGE genannt, nutzt ein multiphasisches Puffersystem (Bicin/Bistris/Tris/Sulfat), und der Trennmechanismus beruht auf einer harnstoffinduzierten Konformationsänderung von A-Peptiden bei Eintritt in das Trenngelkompartiment. Die Konformationsänderung ist hochgradig spezifisch für die Aminosäureprimärsequenz der jeweiligen A-Peptide und führt zu einer reproduzierbaren Änderung des effektiven Molekularradius. Damit lassen sich zahlreiche A-Peptide auftrennen, die sich N- und C-terminal zum Teil nur um eine Aminosäure unterscheiden und aufgrund des geringen Massenunterschiedes mittels konventioneller SDS-PAGE nicht aufgetrennt werden können. Die Konformationsänderung wird unter den Bedingungen des multiphasischen Puffersystems durch die Zugabe von Harnstoff oberhalb einer Konzentration von 6M ausgelöst. Die A-peptidspezifische Konformationsänderung wird bei definiertem pH-Wert und Ionenstärke neben der Molarität des eingesetzten Harnstoffs durch die verwendete Porengröße

des Polyacrylamidgels, die Konzentration des Detergenz (SDS) und die Temperatur während der Trennung bestimmt. Die optimale Trenngelmatrix für die Auftrennung eines breiten Spektrums N- und C-terminal (Nt, Ct) modifizierter A-Peptide wurde mit 12%T/5%C/8MHarnstoff/0.25%SDS gefunden. Die A-SDS-PAGE wurde mit der isoelektrischen Fokussierung (IEF) innerhalb einer ersten analytischen Dimension unter Verwendung von Trägerampholyten oder immobilisierter pH-Gradienten (IPG) zur zweidimensionalen Elektrophorese kombiniert (A-2D-PAGE und A-IPG-2D-PAGE). Anhand von A-SDS-PAGE und A-IPG-2D-PAGE wurde das elektrophoretische Laufverhalten der synthetischen A-Peptide A1-33, A1-34, A1-35, A1-37, A1-38, A1-39, A1-40, A1-42, A2-40, A3-40, A3p-40, A2-42, A3-42 und A3p-42 charakterisiert. Der Nachweis erfolgte mittels Western-Immunoblot (PVDF-Membran) und "enhanced chemiluminescence (ECL)" (A-SDS-PAGE/Immunoblot, A-2D-PAGE/Immunoblot, A-IPG-2D-PAGE/Immunoblot). Dafür wurde der monoklonale Antikörper mAb 1E8 eingesetzt, für den eine ungewöhnlich hohe N-terminale Spezifität nachgewiesen wurde. Unter den Bedingungen des eingesetzten Western-Immunoblot erkennt der mAb 1E8 bei Fehlen des N-terminalen Aspartat die entsprechenden A-Peptide 2-x (z.B. A2-40, A2-42) mit ähnlich guter Nachweisempfindlichkeit wie die A-Peptide 1-x (z.B. A1-40, A1-42). Die synthetischen A-Peptide A3-40 oder A3-42, bei denen zusätzlich N-terminal die Aminosäure Alanin fehlt, und ihre Pyroglutamat-Derivate werden dagegen in physiologisch relevanten Konzentrationen nicht mehr nachgewiesen. Die Nachweisempfindlichkeit im Western-Immunoblot konnte selektiv für den mAb 1E8 verbessert werden, indem anstelle des sonst überwiegend verwendeten Milchpulvers (Immunoblot-1), ein synthetisches Reagenz für die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen eingesetzt wurde (Immunoblot-2). Ein kommerziell erhältlicher N-terminal spezifischer monoklonaler Antikörper (6E10), der sonst häufig für den Nachweis von A-Peptiden mittels Western-Immunoblot eingesetzt wird, ist nicht kompatibel mit Immunoblot-2. Durch die Kombination von A-SDS-PAGE/Immunoblot-2 mit dem Nachweis der APP-Metabolite über eine hochempfindliche CCD-Kamera konnte ein quantitativer Western-Immunoblot mit einer Nachweisempfindlichkeit von 1 pg für A1-40 und 2 pg für A1-42 aufgebaut werden. Für den A-SDS-PAGE/Immunoblot-2 mit CCD-Detektion können Intra- und Interassayvariationskoeffizienten von weniger als 10 % für 20 pg A-Peptid realisiert werden. Für den A-SDS-PAGE/Immunoblot-2 mit Filmdetektion beträgt die Nachweisempfindlichkeit 0.3 pg für A1-40 und 0.6 pg für A1-42. Andere Western-Immunoblot Verfahren mit gleich guter Nachweisempfindlichkeit und Variationskoeffizienten für den Nachweis für A-Peptiden sind bislang nicht bekannt. Die oben genannte Nachweisempfindlichkeit ist Voraussetzung für eine neurochemische Demenzdiagnostik im Liquor, wenn die A-Peptide direkt nach SDS-/Hitzedenaturierung mittels Western-Immunoblot und CCD-Kamera quantifiziert werden sollen, d.h. ohne vorherige selektive Anreicherung durch Immunopräzipitation. Weiter konnte nachgewiesen werden, dass die Trennschärfe des A-SDS-PAGE/Immunoblot für die neurochemische Demenzdiagnostik gerade durch diese Probenvorbehandlung noch einmal wesentlich gesteigert werden kann, wenn die SDS-/Hitzedenaturierung vor dem Einfrieren der Liquorproben erfolgt.

### 1.2 A-SDS-PAGE/Immunoblot und neurochemische Demenzdiagnostik

Der A-SDS-PAGE/Immunoblot-2 (s.o.) realisiert erstmals die direkte Quantifizierung von sAPP und A-Peptiden mittels CCD-Kamera in nur 10 µl humanen oder tierischen (Meerschweinchen, Kaninchen) Liquorproben. Mit dieser Methode konnte erstmals nachgewiesen werden, dass neben

A1-40 und A1-42 drei weitere carboxyterminal (C-terminal) verkürzte A-Peptide (A1-37, A1-38, A1-39) hochgradig konserviert in humanem und tierischem Liquor vorkommen. Dabei ist nicht wie bisher angenommen A1-42 nach A1-40 das zweithäufigste A-Peptid im humanen Liquor, sondern A1-38. Weiter konnte gezeigt werden, dass die drei zusätzlichen C-terminal verkürzten A-Peptide auch im humanen Plasma nachweisbar sind, hier aber mit wesentlich geringerer Konzentration und anderer relativer Verteilung. Insbesondere das Verhältnis A1-42/A1-38 scheint ZNS-spezifisch unterschiedlich zu sein. Bei einigen Patienten mit AD wird im Liquor zusätzlich das N-terminal verkürzte A-Peptid 2-42 nachweisbar, dass in den Hirnhomogenaten von Patienten mit AD regelhaft extensiv erhöht ist. Es konnte erstmals nachgewiesen werden, dass im Gegensatz zu den absoluten Konzentrationen der A-Peptide im Liquor, die prozentualen Anteile A1-n% der A-Peptide A1-n, mit  $n = 37, 38, 39, 40$  oder  $42$ , an ihrer Gesamtmenge A1-x mit hoher Sensitivität und Spezifität Patienten mit AD und chronisch-entzündlichen ZNS-Erkrankungen (CID) identifizieren. Im Gegensatz zu den Absolutkonzentrationen korrelieren die relativen A-Peptidanteile auch signifikant mit dem Schweregrad der Demenz. Weiter konnten für Patienten mit AD spezifische Zusammenhänge zwischen bestimmten prozentualen A-Peptidanteilen gezeigt werden. Dies gilt auch für bestimmte A-Peptidquotienten und die entsprechenden Korrelationen lassen sich für eine verbesserte neurochemische Demenzdiagnostik nutzen. Insbesondere der Zusammenhang zwischen A1-38% und A1-42% bzw. die Korrelation zwischen den A-Peptidquotienten A1-38/A1-40 und A1-42/A1-38 zeigt bei AD eine vergleichsweise hohe Korrelation und ist diagnostisch vielversprechend. Der überraschend deutliche Unterschied zwischen den absoluten und anteiligen Konzentrationen der A-Peptidspecies bezüglich ihrer Eignung für die neurochemische Demenzdiagnostik ist wahrscheinlich dadurch bedingt, dass krankheitsspezifische Änderungen der -Sekretaseaktivität auftreten und diese besser über eine Veränderung der relativen A-Peptidanteile abgebildet werden. Zur Probenvorbereitung für den A-SDS-PAGE/Immunoblot werden A-Peptide und weitere APP-Metabolite SDS-/Hitzedenaturiert. Alternativ kann zur selektiven Konzentrierung von A-Peptiden zuvor eine Immunopräzipitation (IP) durchgeführt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass in Abhängigkeit der Probenvorbereitung unterschiedliche Anteile der in biologischen Flüssigkeiten vorkommenden A-Peptide gemessen werden können. Dabei ist ein Detergenzien(SDS)-dissozierbarer Anteil von einer A-Peptidfraktion unterscheidbar, die Antikörpern innerhalb von Immunopräzipitation oder ELISA-Verfahren direkt zugänglich ist, d.h. ohne gleichzeitige Behandlung mit Detergentien. Diese Differenzierung erklärt sich wahrscheinlich durch hochaffine Bindung der A-Peptide an andere Proteine oder A-Autoaggregate. Der SDS-dissozierbare Anteil ist dabei deutlich höher als die Antikörperdissozierbare Fraktion. Dieses Phänomen ist spezifisch für A1-42 besonders stark ausgeprägt. Für A1-42 ist - im Gegensatz zu A1-40- eine kältepräzipitationsbedingte (KP) Erniedrigung durch das Einfrieren der Liquorproben nachweisbar. Die KP-bedingte Erniedrigung wird wahrscheinlich hauptsächlich von der Aggregat-gebundenen Fraktion von A1-42 getragen und führt bei einem beträchtlichen Teil der Patienten ohne Alzheimer-Demenz (NDC) zu einer AD-typischen Erniedrigung der Liquorspiegel von A1-42. Dieser Effekt ist besonders deutlich bei Patienten mit mindestens einem ApoE 4 Allel und erklärt wahrscheinlich, warum auch bei Patienten ohne AD, aber mit 4 Allel, im zuvor eingefrorenen Liquor vergleichsweise tiefe Konzentrationen von A1-42 gemessen werden. Durch "protektive" SDS-/Hitzedenaturierung vor

dem Einfrieren der Probe kann die KP-bedingte Erniedrigung von A1-42 bei Patienten ohne AD effektiv verhindert werden. Patienten mit AD zeigen dagegen auch bei Vorbehandlung der Liquorprobe mit SDS-/Hitzedenaturierung vor dem Einfrieren niedrige Konzentrationen von A1-42 im Liquor. Damit wird die diagnostische Trennschärfe des A-SDS-PAGE/Immunoblot für die neurochemische Demenzdiagnostik durch SDS-/Hitzedenaturierung der Liquorproben vor dem Einfriervorgang ganz wesentlich verbessert. Der A-SDS-PAGE/Immunoblot in Verbindung mit der oben genannten Probenvorbereitung ist auch für die Früh- und präklinische Diagnostik der AD vielversprechend, da zu erwarten ist, dass grenzwertig tiefe A1-42 Liquorspiegel besonders dann eine beginnende AD anzeigen, wenn sie nicht über eine KP-abhängige Erniedrigung erklärt werden können. Alternativ ist durch prospektive Studien bei Patienten mit leichten kognitiven Störungen zu überprüfen, ob nicht schon eine ausgeprägte KP-abhängige Erniedrigung von A1-42 per se prädiktiven Wert für die spätere Entwicklung einer AD hat. Die KP-abhängige Erniedrigung von A1-42 im Liquor bei AD kann über folgende Hypothesen erklärt werden: 1. der Liquor von Patienten mit AD enthält bei unveränderter A-Peptidgesamtkonzentration selektiv weniger A1-42. 2. die KP-bedingte Erniedrigung von A1-42 kann trotz SDS-/Hitzedenaturierung nicht verhindert werden 3. A1-42 ist im Liquor bei AD nicht erniedrigt, sondern durch SDS-stabile Bindung an Trägerproteine oder A-Peptidaggregate nur vermindert meßbar. Im letzteren Fall (3) wäre diese Fraktion von A1-42 auch dem enzymatischen Katabolismus entzogen, damit pathophysiologisch relevant und potentiell ein molekulares "target" für Wirkstofffindungsprojekte. Dabei muß nicht unbedingt die Zusammensetzung oder die molekulare Primärstruktur A1-42-bindender Proteine innerhalb des Komplexes verändert sein, sondern bei gleicher Primärstruktur könnte die Affinität der Bindung in Abhängigkeit der Konformation von A1-42 unterschiedlich hoch sein. Der Befund, dass bei Patienten mit und ohne AD ein spezifischer Unterschied in der detergentien-dissoziierbaren Fraktion von A1-42 im Liquor nachweisbar wird, kann auch für andere Verfahren der neurochemischen Demenzdiagnostik genutzt werden (ELISA, Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie). Besonders vielversprechend ist der Einsatz des ELISA-Triplett A1-38, A1-40 und A1-42 mit Berechnung der A-Peptidquotienten (38/40, 42/38, 42/40) und Bestimmung der KP-abhängigen Erniedrigung der A-Peptide durch differentielle Probenvorbehandlung.

### 1.3 A-SDS-PAGE/Immunoblot und neuropathologische Diagnostik

Der A-SDS-PAGE/Immunoblot kann für die neuropathologische post mortem Diagnostik dementieller Erkrankungen eingesetzt werden. Bei Analyse der Detergentien(RIPA)-löslichen Fraktion von A-Peptiden in Hirnhomogenaten von Patienten mit AD, anderen dementiellen Erkrankungen und Kontrollen können krankheits- und hirnregional-spezifische Expressionsmuster der A-Peptide 1-37, 1-38, 1-40, 1-42 und 2-42 gezeigt werden. Auffällig ist insbesondere die massive Erhöhung von A2-42 in der RIPA-löslichen Fraktion der Hirnhomogenate bei AD und Patienten mit Lewy-Körperchen-Demenz (LBD). Bei LBD werden diese hohen Konzentrationen von A2-42 beobachtet, wenn die Patienten gleichzeitig eine ausgeprägte -Amyloidpathologie zeigen (LBD, CERAD C). Auch A1-42 ist bei AD und LBD (CERAD C) regelmäßig und deutlich erhöht. Dabei zeigte die Konzentration der übrigen A-Peptide eine hohe interindividuelle Varianz. Dies könnte ein Hinweis auf phänotypische Subtypen der sporadischen AD sein, oder verlaufsabhängig den Scheregrad der Demenz anzeigen. Der hier verwendete RIPA-Detergentienmix ist nicht in der Lage, reife neuritische -Amyloidplaques zu solubilisieren. Die extensiv erhöhten Konzentrationen von A2-42

können daher nicht über A2-42 aus dieser -Amyloidplaquefraktion erklärt werden. Entsprechend ist auch unwahrscheinlich, dass A2-42 überwiegend durch unspezifische - Amyloidplaqueassoziierte posttranslationale Veränderungen entsteht. Die hohen intrazerebralen Konzentrationen von A2-42 sind pathophysiologisch relevant, da das Fehlen von Aspartat die Aggregationsneigung von A1-42 erhöht und diese N-terminale Modifikation anscheinend der Bildung reifer -Amyloidplaques voraus geht.

#### 1.4 Quantifizierung von APP-Metaboliten mittels A-SDS-PAGE/ Immunoblot in Zellkultur- und Tiermodellen

Die carboxyterminal verkürzten A-Peptide 1-37, 1-38 und 1-39 konnten auch regelhaft im cisternalen Liquor von Meerschweinchen und Kaninchen nachgewiesen werden. Weiter gelang der Nachweis in Homogenaten und Überständen (Kurzzeitkultur) von hippokampalen Gewebeschnitten des adulten Meerschweinchens. Weiter konnte eine neuartige neuronale (telencephale) Primärkultur des Hühnchens etabliert und gezeigt werden, dass auch hier das A-Peptidquintett mit vergleichbarer relativer Verteilung wie im humanen Liquor in die Überstände freigesetzt wird. Das A-Peptidquintett - und zusätzlich A2-42 - kann auch in den Überständen einer Neuroglioma Tumorzelllinie (H4) nachgewiesen werden, die humanes APP751 mit schwedischer Doppelmutation (humanAPP751Sw) überexprimiert. Nach Behandlung der Zellen mit Proteaseinhibitoren, die potentielle Inhibitoren von  $\gamma$ -Sekretasen sind, konnte neben der bekannten dosisabhängigen Reduktion von A1-40 und A1-42 auch eine Reduktion der C-terminal verkürzten A-Peptide 1-37, 1-38, und 1-39 nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde die Entstehung von A2-42 gehemmt. Interessant war in diesem Zusammenhang, dass die Entstehung der C-terminal verkürzten A-Peptide - besonders deutlich für A1-37 - im Vergleich zu A1-40 und A1-42 mit anderer Kinetik und schon früher gehemmt wurden. Dieser Effekt wurde besonders deutlich bei Betrachtung der Anteile der einzelnen A-Peptidspecies an ihrer Gesamtkonzentration. Hier zeigt sich eine interessante Analogie zu den oben diskutierten krankheitsspezifischen Veränderungen der A-Peptide im Liquor, die auch wesentlich sensitiver über die prozentualen Peptidanteile im Liquor erfasst werden konnten. Entsprechend kann vermutet werden, dass eine Heterogenität der  $\gamma$ -Sekretaseaktivität über Veränderungen in der relativen Zusammensetzung des A-Peptidquintetts abgebildet werden kann. Dies ist relevant für Wirkstofffindungsprojekte zur Identifizierung isoformspezifische  $\gamma$ -Sekretaseinhibitoren. Bei Behandlung der transgenen H4 Neuroglioma Zellkultur mit Calpaininhibitor-1 konnte bei niedriger Konzentration des Proteaseinhibitors die vorbeschriebene initiale (paradoxe) Konzentrationssteigerung von A1-42 belegt werden. Interessant ist hier, dass der Anstieg von A1-42 nicht mit einer Konzentrationssteigerung von A2-42 korreliert war. Dieser Befund spricht gegen eine sekundäre Entstehung von A2-42 aus A1-42 und für die Hypothese, dass A2-42 durch einen kombinierten  $\gamma$ -Sekretaseschnitt entsteht. In Zusammenhang mit der deutlich und regelmäßig erhöhten Konzentration von A2-42 in Hirnhomogenaten bei AD und dem Nachweis von A2-42 in Liquorproben von Patienten mit AD stellt sich die Frage, ob bei AD eine bestimmte Isoform der  $\gamma$ -Sekretase (BACE) überexprimiert wird oder das physiologisch entstehende A2-42 bei AD vermindert katabolisiert wird.

#### 2. Hintergrund

Die molekularen Grundlagen der AD, ihr Bezug zu neueren medikamentösen Ansätzen der Demenzerkrankung und Verfahren der neurochemischen Demenzdiagnostik sind in zwei Übersichtsarbeiten zusammengefasst (Witfang et al., 1998 und 2000). Bisher wurde ein weiteres SDS-PAGE/Immunoblot Verfahren für die Analyse von A1-40 und A1-42/1-43 in humanem lumbalen Liquor beschrieben (Ida et al., 1996). Die Differenzierung

der A-Peptide kann hier jedoch nicht durch die elektrophoretische Trennung vorgenommen werden, sondern erfolgt auf der Blot-Membran durch C-terminal selektive monoklonale Antikörper. Gleichzeitig muß A1-42 vor der Trennung durch Einengung der Probe konzentriert werden. Die Einengung erfolgt ohne vorherige SDS-Denaturierung, was bedingt durch die hohe Aggregationsneigung von A1-42 methodisch problematisch erscheint. Für die Bestimmung von A1-40 und A1-42 müssen bei dieser Methodik getrennte Elektrophoresen durchgeführt werden. Das für den A-SDS-PAGE/Immunoblot eingesetzte multiphasische Puffersystem (Wiltfang et al., 1991), kombiniert die Vorteile spezieller Puffersysteme für Proteine (Laemmli, 1970) und Peptide (Schagger and von Jagow, 1987). Entsprechend können mit diesem SDS-PAGE Verfahren sowohl Proteine als auch Peptide in einem homogenen Polyacrylamidtrenngelsystem mit hoher Auflösung aufgetrennt werden. Weiter wurde unter Verwendung der Harnstoffversion (Wiltfang et al., 1991) des letztgenannten SDS-PAGE Verfahrens die elektrophoretische Trennung von A1-40 und A1-42 beschrieben (Klafki et al., 1996). Die Anwendung dieses Verfahrens auf Zellkulturmodelle des familiären AD, die mit Inhibitoren APP-spaltender Enzyme (-Sekretase) vorbehandelt wurden, zeigte mittels Nachweis der in vivo radioaktiv markierten A-Peptide A1-40 und A1-42, dass unterschiedliche -Sekretasen an der enzymatischen Entstehung von A1-42 beteiligt sind (Klafki et al., 1996). Mit einer Modifikation dieses Systems konnte auch die Trennung zwischen A1-42 und A1-43 realisiert werden (Wiltfang et al., 1997). Die maximale immunologische Nachweisempfindlichkeit des letztgenannten Verfahrens lag bei 50 pg A1-42, was für die hier gezeigten Applikationen bei weitem nicht ausreicht. Gleichzeitig wurde in dem hier vorgestellten Verfahren die Trenngelmatrix optimiert, um zusätzliche N-terminal und C-terminal modifizierte A-Peptide aufzutrennen. Die SDS-PAGE läßt sich als zweite analytische Dimension mit der isoelektrischen Fokussierung (IEF) in der ersten Dimension als 2D-PAGE kombinieren (O'Farrell, 1975; O'Farrell et al., 1977). Damit gelingt eine zweidimensionale Auftrennung von Polypeptiden und Proteinen nach isoelektrischem Punkt und effektivem Molekularradius. Die isoelektrische Fokussierung, bei Verwendung hochgradig gespreizter immobilisierter pH-Gradienten (Gorg et al., 1995; Gorg et al., 1997; Righetti and Bossi, 1997), kann minimale Ladungsunterschiede aufdecken. Der zweidimensionale A-SDS-PAGE/Immunoblot kann daher auch für die hochauflösende Analyse von posttranslationalen Modifikationen der APP-Metabolite eingesetzt werden. Gleichzeitig kann eine Nachweisempfindlichkeit im oberen Femtogrammbereich realisiert werden. Posttranslationale Modifikationen können in spezifischer Weise das Aggregationsverhalten von A-Peptiden beeinflussen und sind damit pathophysiologisch und diagnostisch relevant (Thome et al., 1996; Thome J., 1996; Kuo et al., 1997; Russo et al., 1997; Tamaoka et al., 1997). Für die neurochemische Demenzdiagnostik ist relevant, dass selektiv der Anteil von N-terminal modifiziertem A1-42/43 zu A1-42/43, nicht jedoch der Anteil N-terminal modifiziertes A1-40 zu A1-40 ansteigt (Tamaoka et al., 1997). Zusätzlich zur Bestimmung der A-Peptide erlaubt der A-SDS-PAGE/Immunoblot auch die Quantifizierung von sAPP, dass bei AD im Liquor erniedrigt gemessen wird (Sennvik et al., 2000). Für die Bestimmung von sAPP wird das harnstoffhaltige Trenngelkompartiment mit einem oberen (kathodischen) Trenngel ohne Harnstoff und größerer Porengröße kombiniert. Der quantitative A-SDS-PAGE/Immunoblot erlaubt die gleichzeitige und ultrasensitive Bestimmung eines Spektrums von APP-Metaboliten, die hohe Relevanz für die neurochemische Frühdiagnostik und Pathogenese der AD besitzen. Das

Verfahren kann auch innerhalb der tierexperimentellen und klinischen Evaluation neuer Pharmaka eingesetzt werden, die in den Metabolismus oder Katabolismus von A-Peptiden eingreifen.

### 3 Materialien und Methoden

#### 3.1 A-SDS-PAGE

##### 3.1.1 Material und Reagentien

Bio-RAD (Richmond, CA, USA): Mini Protean II Elektrophorese System, Acrylamid (Best.-Nr. 161-0101), N,N'-Methylenbis-acrylamid (Best.-Nr. 161-0201); Merck (Darmstadt, Deutschland): Ammoniumperoxodisulfat (AMPS, Best.-Nr. 1201.1000), Bromphenolblau (Best.-Nr. 8122), 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Best.-Nr. 1.09072.1000), Natriumhydroxid Plätzchen p.A. (NaOH, Best.-Nr. 6498), Aktivkohle p.A. (Best.-Nr. 1.02186.0250), Saccharose (Best.-Nr. 1.07654.1000) Paesel+Lorei (Hanau, Deutschland): Tris ultra rein (Best.-Nr. 100840) Biomol (Hamburg, Deutschland): Natrium Laurylsulfat, ultra rein, 2x cryst. (SDS, Best.-Nr. 51430), Bis-(2-hydroxyethyl)-imino-tris(hydroxymethyl) methan (Bis-Tris, Best.-Nr. 50003), N,N'-Bis-(2-hydroxyethyl)glycine p.A. (Bicine, Best.-Nr. 01848); GibcoBRL/Life Technologies (Karlsruhe, Deutschland): Harnstoff (Best.-Nr. 15716-012); Serva (Heidelberg, Deutschland): N,N,N',N'-Tetramethylethylen-di-Amin (TEMED, Best.-Nr. 35925); Sigma (Steinheim, Deutschland): 2-Mercaptoethanol (Best.-Nr. M-7154); Bachem (Bubendorf, Schweiz): A1-38, A1-40, A1-42

Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie (Berlin, Deutschland): A1-33, A1-34, A1-35, A1-37, A1-39, A2-40, A2-42, A3-40, A3-42, A3p-40, A3-42

Amersham Pharmacia Biotech AB (Buckinghamshire, England) und Serva (Heidelberg, Deutschland): Trypsin Inhibitor Rinderlunge (Mr 6500), Mellitin (Mr 2847) und Met-Lys-Bradykinin (Mr 1320) wurden über Serva bezogen und dem "low-molecular-weight (LMW) marker kit" von Amersham Pharmacia zugefügt. Das LMW Kit setzt sich zusammen aus: Phosphorylase b (Mr 94000), Rinderserum Albumin (Mr 67000), Ovalbumin (Mr 43000), Carbonic Anhydrase (Mr 30000), Trypsin Inhibitor, Sojabohne (Mr 20100) und -Lactalbumin (Mr 14400).

##### 3.1.2 Gelzusammensetzung und Elektrophorese

Die SDS-PAGE wurde durchgeführt mittels des Bio-Rad Mini Protean II Elektrophorese System. Die Größe der verwendeten Gelkompartimente war wie folgt: Trenngellänge etwa 54 mm; Sammelgellänge etwa 5 mm (entsprechend einem Volumen von 250 µl); Kammgelhöhe etwa 12-15 mm; Geldicke jeweils 0.50 mm, Gelbreite jeweils 85 mm. Trenn- und Sammelgele für die zweite analytische Dimension innerhalb der A-2D-PAGE haben eine Geldicke von 1.0 mm. Für den Probenauftrag wird ein 15-zähliger Probenauftragskamm verwendet (Zahnbreite ca. 3 mm, Zahnabstand 2 mm). Die resultierende Probenauftragstasche im Kammgel mißt etwa 3x10 mm. Die max. Probenauftragsmenge sollte 10 µl nicht überschreiten, um Verschleppungen zwischen den Probenschächten sicher zu verhindern. Die Proben werden nach Einfüllen des Kathodenpuffers unterschichtet.

Elektrophorese: a) 12 mA / 0.5 mm Geldicke bei konstanter Stromstärke über 2h, b) 1,0 mm Gele der zweiten analytischen Dimension: 60 Volt / 1,0 mm Geldicke für 10 min, 120 Volt / 1,0 mm Geldicke über 1h 45min. Für die Trenngelkompartimente wurde die Harnstoffversion des Bicin/Tris SDS-PAGE Verfahrens von Wiltfang et al. (Wiltfang et al., 1991) verwendet und für die vorgestellten Applikationen in wesentlichen Aspekten modifiziert. Tabelle 1 faßt die konzentrierten Puffer für die Gelkompartimente, Kathodenpuffer, Anodenpuffer und die Acrylamidstammlösung zusammen. Die Gelzusammensetzung für die A-SDS-PAGE zur optimierten Trennung von APP-Metaboliten und A-Peptiden in humanen oder tierischen biologischen Proben findet sich in Tabelle 2.

##### 3.1.3 Probenvorbereitung für A-SDS-PAGE

##### 3.1.3.1 Aufnahme von Liquorproben

300µl Aliquots des SDS-SB-3 ohne 2-Mercaptoethanol (Tabelle 3) werden mittels Speed-Vac in 1.5 ml Eppendorf

Probengefäßen ("safe lock") auf Trockensubstanz eingeengt und bis zum Gebrauch bei Raumtemperatur gelagert. Liquorproben werden aliquotiert und mittels des in den Eppendorfgefäßen als Trockensubstanz vorgelegten SDS-SB-3 unterschiedlich aufgearbeitet: (a) Nativ eingefrorener Liquor 330 µl zentrifugierter Liquor wird nativ bei -80°C in 1.5 ml Eppendorfgefäßen eingefroren und gelagert. Nach Auftauen und Vortexschritt wird mit 300 µl Liquor und 2.5% v/v 2-Mercaptoethanol der vorgelegte SDS-SB-3 aufgenommen und nach Vortexschritt für 5 min bei 95°C erhitzt. Anschließend erfolgt die A-SDSPAGE. (b) Vorbehandlung mittels SDS-/Hitzedenaturierung Der als Trockensubstanz vorgelegte SDS-SB-3 wird mit 300 µl zentrifugiertem Liquor aufgenommen und nach Vortexschritt für 5 min. bei 95°C erhitzt (keine Zugabe von 2-Mercaptoethanol ). Anschließend wird der SDS-/Hitzedenaturierte Liquor bei -80°C gelagert. Vor A-SDS-PAGE wird die Probe nach Zugabe von 2.5% v/v 2-Mercaptoethanol erneut für 5 min. bei 95°C erhitzt. (c) Einengung von Liquorproben für die Bestimmung von A-Peptiden Nach SDS-/Hitzedenaturierung, aber vor Zugabe von 2-Mercaptoethanol, kann die Liquorprobe, oder auch andere biologische Proben, mittels SpeedVac auf Trockensubstanz eingeengt werden und mit 100 µl H<sub>2</sub>O und 2.5% v/v 2-Mercaptoethanol aufgenommen werden (3-fache Konzentrierung). Vor A-SDS-PAGE erfolgt erneut Erhitzen auf 95°C für 5 min. Durch die SDS-/Hitzedenaturierung vor Einengung der Probe sollen Proteolyse, Präzipitation und Autoaggregation der A-Peptide während der Konzentrierung vermieden werden. Die reduzierte SDS-Konzentration in SDS-SB-3 ist erforderlich, weil höhere SDS-Konzentrationen nach dreifacher Einengung der Proben und bei einem Auftragsvolumen von ca. 10 µl zu einem beeinträchtigten Laufverhalten der A-Peptide am anodischen Ende des harnstoffhaltigen Trenngels führen. Gleichzeitig ist die SDS-Konzentration von 0.5% w/v in SDS-SB-3 aber noch ausreichend hoch für eine vollständige SDS-/Hitzedenaturierung der Probe.

### 3.1.3.2 Aufnahme anderer biologischer Proben

Liegen die Proben flüssig vor (z.B. Zellkulturüberstände, Zellhomogenate) und ist die A-Peptidkonzentration ausreichend hoch kann eine Volumeneinheit Probe mit einer Volumeneinheit des zweifach konzentrierten SDS-SB-2 aufgenommen werden (Tabelle 3).

### 3.1.3.3 Aufnahme der Proben nach Immunopräzipitation (IP)

Die mittels magnetischen Dynabeads (s.u.) immobilisierten APP-Metabolite werden nach dem abschließenden Waschschrift bei 37°C für 10 min im Ultraschallbad unter Verwendung des SDS-SB-1 oder SDS-PB-3 (jeweils ohne 2-Mercaptoethanol ) aus der Antigenbindung eluiert. Nach Zugabe von 2-Mercaptoethanol auf 2.5% w/v, erfolgt Erhitzen auf 95°C für 5 min. Bei Verwendung von SDS-PB-3 können die Proben anschließend durch Einengung auf Trockensubstanz und Aufnahme mit H<sub>2</sub>O mittels SpeedVac nochmals dreifach konzentriert werden.

## 3.2 Konventionelle A-2D-PAGE (Trägerampholyt IEF)

Die Trägerampholyt-IEF in Rundgelen der ersten analytischen Dimension und die vertikale A-SDS-PAGE der zweiten analytischen Dimension werden mit dem Mini-Protean II 2-D Cell System von Bio-Rad durchgeführt.

### 3.2.1 Materialien und Reagenzien für die Trägerampholyt IEF

Bio-RAD (Richmond, CA, USA): Mini-Protean II 2-D Cell System, Glasröhrchen (Ø 1mm), Agarose (162-0017); Merck (Darmstadt, Deutschland): CHAPS (Best.-Nr. 1.11662.0010), Natriumhydroxid Plätzchen p.A. (NaOH, Best.-Nr. 6498), Bromphenolblau (Best.-Nr. 8122), Phosphorsäure 85% (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, Best.-Nr. 1.00573.1000); Serva (Heidelberg, Deutschland): Servalyt® pH 5-6 (Best.-Nr. 42924) pH 4-7 (Best.-Nr. 42948) pH 3-10 (Best.-Nr. 42951); Fluka (Buchs, Schweiz): Igepal CA 630 (NP 40, Best.-Nr. 56741) GibcoBRL/Life Technologies (Karlsruhe, Deutschland): Harnstoff



(Best.-Nr. 15716-012); Sigma (Steinheim, Deutschland): 2-Mercaptoethanol (Best.-Nr. M-7154) Biomol (Hamburg, Deutschland): Natrium Laurylsulfat, ultra rein, 2x cryst. (SDS, Best.-Nr. 51430), Bis-(2-hydroxyethyl)-imino-tris(hydroxymethyl) methan (Bis-Tris, Best.-Nr. 50003), N,N'-Bis-(2-hydroxyethyl) glycine p.A. (Bicine, Best.-Nr. 01848)

### 3.2.2 Probenaufnahme für die Trägerampholyt IEF

Die Probenaufnahme erfolgt in IEF-SB (Tabelle 4a). Trockensubstanz und mittels MSP magnetisch immobilisierte Dynabeads (s.u.) werden direkt mit dem IEF-SB unmittelbar vor IEF aufgenommen und 10 min. im Ultraschallbad bei 37° C inkubiert. Für die Aufnahme von Liquorproben wird eine Volumeneinheit Liquor mit einer Volumeneinheit IEF-SB aufgenommen und 10 min. im Ultraschallbad bei 37° C inkubiert.

### 3.2.3 Erste analytische Dimension: Trägerampholyt IEF in Rundgelen

Glasröhrchen (Ø 1mm) werden zur Gelpolymerisation mit der Monomerlösung aus Tabelle 4b gefüllt. Die IEF Rundgele werden auf eine Länge von 60 mm polymerisiert. 20 µl Probe nach direkter Aufnahme in IEF-SB (10 µl Liquor plus 10 µl IEF-SB) oder 10 µl Eluat aus der Immunopräzipitation in IEF-SB (Tabelle 4a) werden aufgetragen und mit dem kathodischen Elektrolyten überschichtet. Diese Seite der Glasröhrchen wird mit der oberen kathodischen Elektrolytkammer verbunden. Die Zusammensetzung von Anolyt und Katholyt für die Trägerampholyt IEF findet sich in Tabelle 4c. Anschließend wird wie folgt bei Raumtemperatur fokussiert: 100V x 1h, 200Vx1h, 500Vx2h, 1000Vx1h ( 4300 Vxh). Nach IEF werden die Rundgele mittels Wasserdruck aus den Glasröhrchen ausgestoßen und für 5 min. im IEF-Equilibrationpuffer (Tabelle 4d) bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden die IEF Gele auf das Sammelgel (s.o.) der A-SDS-PAGE aufgelegt und mit der IEF-Agaroselösung (Tabelle 4d) in ihrer Position fixiert. Eine Probentasche für den vergleichenden Auftrag von synthetischen A-Peptiden oder Mr Markerproteinen wird mittels eines Teflonzahns in der heißen Agarose geformt.

### 3.2.4 Zweite analytische Dimension: A-SDS-PAGE

Die A-SDS-PAGE erfolgte, wie in Tabelle 1 und 2 ausgeführt (Trenngel: 12%T/5%C/8M Harnstoff). Ein Kammgel wird nicht polymerisiert. Die Geldicke der verwendeten Trenngele beträgt 1mm. Die Elektrophorese erfolgt bei Raumtemperatur: 10 min. / 60 V, 90 min. / 120 V.

## 3.3 A-IPG-2D-PAGE

### 3.3.1 Material und Reagentien

GibcoBRL/Life Technologies (Karlsruhe, Deutschland): Harnstoff (Best.-Nr. 15716-012) Merck (Darmstadt, Deutschland): CHAPS (Best.-Nr. 1.11662.0010), Bromphenolblau (Best.-Nr. 8122), Glyzerin (100%) (Best.-Nr. 1.04092.1000) Biomol (Hamburg, Deutschland): Natrium Laurylsulfat, ultra rein, 2x cryst. (SDS, Best.-Nr. 51430); Serva (Heidelberg, Deutschland): Serdolit MB-1 (Best.-Nr. 40701), Dithiotreitol (DTT, Best.-Nr. 20710) Amersham Pharmacia Biotech AB (AB (Buckinghamshire, England): Pharmalyte pH 3-10 (Best.-Nr. 17-0456-01), Pharmalyte pH 4-6,5 (Best.-Nr. 17-0452-01), Immobiline DryStrip 70 x 3 x 0.5 mm, pH 4-7 L (Best.-Nr. 17-6001-10); Sigma (Steinheim, Deutschland): Iodoacetamide (Best.-Nr. I-6125) BioRAD (Richmond, CA, USA): Agarose (162-0017)

### 3.3.2 Probenaufnahme

Die Probenaufnahme erfolgt in IPG-SB (Tabelle 5a). Trockensubstanz und mittels MSP magnetisch immobilisierte Dynabeads (s.u.) werden direkt mit dem IPG-SB unmittelbar vor IEF aufgenommen und 10 min. im Ultraschallbad bei 37° C inkubiert.

Aufnahme flüssiger biologischer Proben: Nach Entfernung des Mischbettionenaustauschers (Serdolit MB-1) wird der IPB-SB in Eppendorf Probengefäßen aliquotiert (z.B. 100 µl) und mittels SpeedVac bei Raumtemperatur auf Trockensubstanz eingengt. Der als Trockensubstanz vorgelegte IPG-SB wird im Volumenverhältnis 1:1 mit Probe aufgenommen (z.B. 100 µl) und nach Vortexschritt (1 min.) für 10 min. im Ultraschallbad bei 37° C inkubiert.

### 3.3.3 IPG-IEF

Die IEF

mittels kommerzieller IPG "DryStrips" erfolgte entsprechend dem Protokoll des Herstellers (Amersham Pharmacia Biotech / Kurzanleitung 71-5009-57, Ausgabe AA, 99-04). IPG "DryStrips" (4-7, linearer pH-Gradient, Länge 7cm) wurden über Nacht bei Raumtemperatur unter Verwendung der Rehydrierungslösung aus Tabelle 5a auf eine Geldicke von 0.5 mm rehydriert. Die Probenauftragsvorrichtung ("sample cups") wird auf die basische Seite der IPG Streifen, etwa bei pH 6.5, aufgelegt (kathodischer Auftrag) und 30 µl Probe aufgetragen. Die IPG-IEF erfolgt für 30 min / 300V, 30 min / 800V, 30 min. / 1400V und 5 h / 2000V ( 12500 Vxh). 3.3.4 Zweite analytische Dimension: A-SDS-PAGE Nach IPG-IEF werden die "DryStrips" für 2x10 min. equilibriert (Tabelle 5b). Die erste Equilibrierungslösung enthält DTT (50 mg/5ml), die zweite Lösung Jodacetamid (240 mg / 5 ml) zur Neutralisierung von überschüssigem DTT, das sonst bei Silberfärbung der Gele zu Färbeartefakten führt. Bei Western-Immunoblot entfällt der zweite Equilibrierungsschritt. Die equilibrierten IPG "DryStrips" werden auf dem Sammelgel der A-SDS-PAGE mittels Agaroselösung (Tabelle 5c) fixiert. Eine Probentasche für den vergleichenden Auftrag von synthetischen A-Peptiden oder Mr Markerproteinen wird mittels eines Teflonzahns in der heißen Agarose angelegt. Die Elektrophorese erfolgt entsprechend 3.1.2 3.4

Immunopräzipitation 3.4.1 Material und Reagentien, Antikörper Biochrom KG (Berlin, Deutschland): HEPES (Best.-Nr. L1603), PBS Dulbecco, ohne Ca<sup>++</sup>, ohne Mg<sup>++</sup> (Best.-Nr. L182-50); Merck (Darmstadt, Deutschland): Natriumhydroxid Plättchen p.A. (NaOH, Best.-Nr. 6498); Natriumchlorid (NaCl, Best.-Nr. 1.01540.0500); Fluka (Buchs, Schweiz): Igepal CA 630 (NP 40, Best.-Nr. 56741), Natrium Desoxycholate (Na-DOC, Best.-Nr. 30968); Biomol (Hamburg, Deutschland): Natrium Laurylsulfat ultra rein, 2x cryst. (SDS, Best.-Nr. 51430); Boehringer (Mannheim, Deutschland): Proteinase inhibitor cocktail tablets, complete™ Mini (Best.-Nr. 1836153); Deutsche Dynal GmbH (Hamburg, Deutschland): Dynabeads® M280 Schaf anti-Mouse IgG (Best.-Nr. 112.02); Biometra (Göttingen, Deutschland): Magnetic Separation Stand (MPS); Sigma (Steinheim, Deutschland): Bovines Albumin (BSA, Best.-Nr. A-4378), 2-Mercaptoethanol (Best.-Nr. M-7154), Natrium Azid (Na-Azid, Best.-Nr. A-2002); Paesel+Lorei (Hanau, Deutschland): Tris ultra rein (Best.-Nr. 100840); Schering AG (Berlin, Deutschland): mAb1E8 (Maus IgG1); Senetek PLC Drug Delivery Technologies, Inc. (St. Louis, Mo, USA): mAb 6E10, gereinigter Maus IgG1 (Best.-Nr. 320-02). 3.4.2 Vorbereitung der Dynabeads M-280 (Schaf Anti-Maus IgG) 250µl Suspension (6.7 x 10<sup>8</sup> beads/ml) ohne Schaumbildung gut schütteln und 3 x 5 min. mit 1 ml PBS/BSA (0.15 M NaCl in 0.01 M Na-Phosphat, 0.1 % w/v BSA) waschen. Beads im Magnetic Separation Stand (MSP) der Firma Biometra (Göttingen, Deutschland) immobilisieren und Überstand abnehmen. 3.4.3 Vorbehandlung der biologischen Proben 0.75 Volumeneinheiten Probe werden mit 0.25 Volumeneinheiten Protein-Inhibitor-Cocktail Stammlösung (PI-Stammlsg.) aufgenommen. PI-Stammlsg.: Löse 1 Tabl. Complete™ Mini in 1.5 ml H<sub>2</sub>O. 3.4.4 mAb-Aktivierung der magnetischen Mikropartikel ("beads") mittels der direkten IP-Methode Etwa 1.675 x 10<sup>8</sup> "beads" (250 µl vorbereitete Bead-Suspension, s.o.) werden im MSP in 1.5 ml Eppendorf Cups wandständig magnetisch immobilisiert und mit 7.5 µg mAb 6E10 (Senetek Drug Delivery Technologies, Inc., St. Louis, Mo, USA) oder 10 µg mAb 1E8 (Schering AG, Berlin, Deutschland) in 250 µl PBS/BSA bei 4 °C für 20 h inkubiert. Anschließend für 4 x 30 min. mit 1 ml PBS/BSA gewaschen und am Ende in 250 µl PBS/BSA/0.01% Na-Azid aufgenommen und bei 4 °C bis zum Einsatz für die Immunopräzipitation gelagert. Die so aktivierten Beads können ohne

nennenswerten Kapazitätsverlust bis zu drei Monate gelagert werden. Direkt vor Einsatz in die Immunopräzipitation biologischer Proben werden die aktivierten Beads 3x3 min. mit 250 µl PBS/BSA ohne Zusatz von Na-Azid gewaschen.

### 3.4.5 Immunopräzipitation aus humanem Liquor

ohne Detergentien 25 µl aktivierter DynaBeads (ca.  $1.675 \times 10^7$  beads) werden mit 268 µl Liquor/PI-Stammlsg. (200 µl Liquor + 68 µl PI-Stammlsg.) vermischt und mit 732 µl 50 mM HEPES-Puffer, pH 7.4, in Eppendorf-Cups auf 1 ml gebracht. Die Inkubation erfolgt für 20 h bei 4 °C auf einem Schüttelmixer (ständige Agitation der Probe). Anschließend werden die Beads im MSP-Stand immobilisiert und der Überstand entfernt. Danach werden die Beads 4 x 5 min. bei Raumtemperatur mit 1 ml PBS/0.1%BSA gewaschen. Abschließend werden die Beads 1 x 3 min. bei Raumtemperatur in 1 ml 10 mM Tris/HCl (pH 7.5) gewaschen. Für die A-SDS-PAGE erfolgt die Probenaufnahme der magnetisch immobilisierten Beads mit 25 µl SDS-PB-1 für 5 min. bei 95 °C. Für die A-2D-PAGE wird mit 25 µl IEF-SB oder IPG-SB aufgenommen und für 10 min. bei 37 °C im Ultraschallbad inkubiert. Für die A-SDS-PAGE werden 4 µl Probe aufgetragen, entsprechend der A-Peptidmenge, die in 32 µl Liquorvolumen vorhanden ist. Für die A-2D-PAGE werden 10 µl aufgetragen, entsprechend der A-Peptidmenge die in 80 µl Liquorvolumen vorhanden ist.

b) mit Detergentien (RIPA0.5x-IP) 200 µl Liquor werden mit 200 µl 5fach-konzentriertem RIPA0.5x Puffer (Tabelle 6) vermischt und mit 600 µl H<sub>2</sub>O in Eppendorf Cups auf 1 ml gebracht. Die Durchführung der Immunpräzipitation entspricht der unter A beschriebenen Methode. Der RIPA0.5x-Puffer enthält Proteaseinhibitoren (Tabelle 6).

### 3.4.6 Immunopräzipitation aus humanem Gehirngewebe (RIPA1x-IP)

Gehirngewebe (ca. 50 mg) wird mit 1 ml RIPA1x Puffer (Tabelle 6) in 1.5 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen mittels Ultraschallfinger homogenisiert und anschließend für 5 min. (4°C) bei 20000 g zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und der Proteingehalt des Homogenatüberstands wird auf 3 mg/ml mit RIPA1x Puffer eingestellt und 1 ml Hirnhomogenat zusammen mit 50 µl aktivierten DynaBeads (ca.  $3.35 \times 10^7$  beads) wie unter (a) beschrieben immunpräzipitiert. Der RIPA1.0x-Puffer enthält Proteaseinhibitoren (Tabelle 6).

### 3.4.7 Immunopräzipitation aus Zellkulturüberständen (RIPA0.5x-IP)

400 µl Zellkulturüberstand werden mit 100 µl 5fach-konzentriertem RIPA0.5x Puffer (alternativ: 800 µl Zellkulturüberstand mit 200 µl 5fach-konzentriertem RIPA0.5x Puffer) und 25 µl aktivierten DynaBeads vermischt und wie unter (a) beschrieben immunpräzipitiert. Für die A-SDS-PAGE werden 6 µl Probe aufgetragen, entsprechend der A-Peptidmenge, die in 96 µl Zellkulturüberstandsvolumen vorhanden ist.

## 3.5 Fixierung und Silberfärbung

### 3.5.1 Reagentien

Merck (Darmstadt, Deutschland): Natriumthiosulfat-Pentahydrat pA ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , Best.-Nr. 1.06516.0500), Natriumcarbonat pA ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , Best.-Nr. 1.06392.1000), Glycin Puffersubstanz (Best.-Nr. 1.04169.0250), Formaldehyd min. 37% pA (Best.-Nr. 1.04003.1000), Glutardialdehyd 25%ig (Best.-Nr. 8.20603.0100), Natriumazetat wasserfrei (Best.-Nr. 1.06268.1000); Paesel+Lorei (Hanau, Deutschland): Silbernitrat p.A. (Best.-Nr. 27-100-601); Zentralapotheke der Universität Göttingen: Ethanol 99.9%, vergaellt

### 3.5.2 Durchführung

Nach A-SDS-PAGE oder A-2D-PAGE werden die Peptide und Proteine für 45 min bei Raumtemp. mit Glutardialdehyd in Borat/Phosphatpuffer nach Wiltfang et al. (Wiltfang et al., 1997) fixiert. Die Silberfärbung wurde leicht modifiziert nach Heukeshoven et al. (Heukeshoven and Dernick, 1988) durchgeführt (Tabelle 7)

## 3.6 Western-Immunoblot

### 3.6.1 Material und Reagentien,

Antikörper Paesel+Lorei (Hanau, Deutschland): Tris ultra rein (Best.-Nr. 100840); Sigma (Steinheim, Deutschland): Borsäure (Borsäure, Best.-Nr. B-7901), Natrium Azid (Na-Azid, Best.-

Nr. A-2002); J.T. Baker (Deventer, Holland): Methanol (Best.-Nr. 9263); BioRad Laboratories (Hercules, CA, USA): Filter Paper extra dick (Best.-Nr. 1703960), Non-Fat Dry Milk (Best.-Nr. 170-6404); Millipore Corporation (Bedford, MA, USA): Immobilon-P Transfer Membran (Best.-Nr. IPVH00010); Hoefer Pharmacia Biotech Inc. (San Francisco, CA, USA): SemiPhor semi-dry transfer unit (Best.-Nr. 80-6211-86); Biochrom KG (Berlin, Deutschland): PBS Dulbecco, ohne  $\text{Ca}^{++}$ , ohne  $\text{Mg}^{++}$  (Best.-Nr. L182-50); Schering AG (Berlin, Deutschland): mAb 1E8 (Maus IgG1); Senetek PLC Drug Delivery Technologies, Inc. (St. Louis, Mo, USA): gereinigter mAb 6E10, Maus IgG1 (Best.-Nr. 320-02); Roth (Karlsruhe, Deutschland): Roti-Block (Best.-Nr. A151.1).

### 3.6.2 Durchführung des Western-Immunoblot

Im Anschluß an die A-SDS-PAGE oder A-2D-PAGE erfolgt der Transfer mittels Semidry-Westernblot und einem multiphasischen Puffersystem auf PVDF Nachweismembranen. Die Blotpuffer sind in Tabelle 8 zusammengestellt. Der Aufbau des Blotsandwich von der Anode zur Kathode ist wie folgt: Eine Filterpapierlage mit Puffer A, eine Filterpapierlage und die PVDF-Membran mit Puffer B, Gel und abschließend zwei Filterpapierlagen mit Puffer C. Gele werden unmittelbar im Anschluß an die Elektrophorese für ca. 10 sec. in Puffer C inkubiert. Als Filterpapier wird extrastarkes Filterpapier der Firma BioRad verwendet. Nach Untersuchung von PVDF-Membranen unterschiedlicher Hersteller ergab die Immobilon-P Membran der Firma Millipore, die geringste Hintergrundfärbung und effektivste Immobilisation der A-Peptide, insbesondere von A1-42, innerhalb des Immunoblotprotokolls. Die Immobilon-P Membranen werden entsprechend den Herstellerangaben vor Gebrauch mit Methanol benetzt, anschließend für 1 min. in  $\text{H}_2\text{O}$  inkubiert und dann in Puffer B überführt. Der Transfer erfolgt für A-SDS-PAGE ( $\varnothing$  0.5 mm) für 30 min. oder A-2D-PAGE Gele ( $\varnothing$  1.0 mm) für 45 min. bei Raumtemperatur mit 1 mA/cm<sup>2</sup>. Nach Ende des Western-Blot wird die Immobilon-P Membran für ca. 30 sec. in  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und 3 min. in der Mikrowelle in PBS (ohne Tween-20) gekocht. Der Kochschritt ist essentiell, um die maximale Nachweisempfindlichkeit zu realisieren.

#### 3.6.2.1 Immunoblot-1 (Milchpulver-Blockschritt)

Die für den Immunoblot-1 verwendeten Puffer, Lösungen und Antikörper sind in Tabelle 9a & b zusammengefaßt. Blockschritt: 1 h bei Raumtemperatur in 4 ml PBS-T-M / cm<sup>2</sup> Membran Inkubation mit primärem mAb: 15 h bei 4° C und abschließend 30 min. bei Raumtemp. in einer 1:4000 Verdünnung des mAb 1E8 (Schering AG, Berlin, Deutschland) oder in einer 1:1000 Verdünnung des mAb 6E10 (aufgereinigt: 1 mg/ml; Senetek Drug Delivery Technologies, Inc., St. Louis, Mo, USA) in 0.074 ml PBS-T-M / cm<sup>2</sup> (Einschweißen in Kunststoffolie, hochfrequenter Agitation mit Rotationsmischer) Waschschrift 1: 3x10 min. mit PBS-T (4 ml/cm<sup>2</sup>) bei Raumtemp. Inkubation mit sekundärem mAb: 1 h bei Raumtemp. mit einer 1:3000 Verdünnung des sekundären mAb (biotinylierter anti-Maus IgG, Pferd, H+L; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) in 0.074 ml PBS-T-M / cm<sup>2</sup> Membran (Einschweißen in Kunststoffolie, hochfrequente Agitation mit Rotationsmischer) Waschschrift 2: wie Waschschrift 1 Streptavidin-Avidin Verstärkung: 1 h bei Raumtemperatur mit 1:3000 Verdünnung von "Streptavidin biotinylated horseradish peroxidase complex RPN 1051" (Amersham, Buckinghamshire, England) in PBS-T mit 0.26 ml/cm<sup>2</sup> Membran (Einschweißen in Kunststoffolie, hochfrequente Agitation mit Rotationsmischer) Waschschrift 3: wie Waschschrift 1 ECL-Entwicklung: 5 min. bei Raumtemp. mit 0.1 ml/cm<sup>2</sup> ECLPlus™ Lösung (RPN 2132; Amersham, Buckinghamshire, England) gemäß Angaben des Herstellers. Anschließend Entfernung von überschüssigem Reagenz (5 sec. zwischen 2 Folien Filterpapier) und Einschlagen der feuchten

Membran in Frischhaltefolie. 3.6.2.2 Immunoblot-2 (Roti-Block) Die für den Immunoblot-2 verwendeten Puffer, Lösungen und Antikörper sind in Tabelle 9a & b zusammengefaßt.

Blockschritt: 1 h bei Raumtemperatur in 25ml 1:10 Roti-Block/H<sub>2</sub>O Inkubation mit primärem mAb: 15 h bei 4° C und abschließend 30 min. bei Raumtemp. in einer 1:4000 Verdünnung des mAb 1E8 (Schering AG, Berlin, Deutschland). Der mAb 6E10 ist bedingt durch ein hohes Hintergrundsignal nicht kompatibel mit Roti-Block. Waschschrift 1: 3x10 min. mit PBS-T (4 ml/cm<sup>2</sup>) bei Raumtemp. Inkubation mit sekundärem Ab: 1 h bei Raumtemp. mit einer 1:3000 Verdünnung des sekundären mAb (biotinylierter anti-Maus IgG, Pferd, H+L; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) in 0.074 ml PBS-T/cm<sup>2</sup> Membran (Einschweißen in Kunststoffolie, hochfrequente Agitation mit Rotationsmischer) Waschschrift 2: wie Waschschrift 1 Streptavidin-Avidin Verstärkung: 1 h bei Raumtemperatur mit 1:3000 Verdünnung von "Streptavidin biotinylated horseradish peroxidase complex RPN 1051" (Amersham, Buckinghamshire, England) in PBS-T mit 0.26ml/cm<sup>2</sup> Membran (Einschweißen in Kunststoffolie, hochfrequente Agitation mit Rotationsmischer) Waschschrift 3: wie Waschschrift 1 ECL-Entwicklung: 5 min. bei Raumtemp. mit 0.1 ml/cm<sup>2</sup> ECLPlus™ Lösung (RPN 2132; Amersham, Buckinghamshire, England) gemäß Angaben des Herstellers. Anschließend Entfernung von überschüssigem Reagenz (5 sec. zwischen 2 Folien Filterpapier) und Einschlagen der feuchten Membran in Frischhaltefolie.

3.6.3 Quantifizierung des ECL-Signals mittels densitometrischer Filmauswertung

3.6.3.1 Material und Reagentien Amersham Pharmacia Biotech AB (Buckinghamshire, England): ECLPlus Western Blotting Detection System (Best.-Nr. RPN 2132), Hyperfilm™ ECL™ (Best.-Nr. RPN 2103H); Schleicher und Schuell (Dassel, Deutschland): Gel-Blotting Papier (Best.-Nr. 426690); Tropix (Bedford, MA, USA): Development Folders, 14 cm x 19 cm (Best.-Nr. XF030); Biometra (Göttingen, Deutschland): BioDoc software Epson Deutschland GmbH (Düsseldorf, Deutschland): Laserscanner Epson GT 9000

3.6.3.2 ECL-Entwicklung Nach dem letzten Waschschrift in PBS-T wird die PVDF-Membran auf eine Teflonunterlage gelegt und überschüssiger Waschpuffer durch Auflegen einer Lage KIMWIPES® Lite 200 Laborwischtücher entfernt. Es folgt eine Inkubation für 5 min. bei Raumtemperatur mit 0.1 ml/cm<sup>2</sup> ECLPlus™ Lösung. Um überschüssige ECLPlus™ Lösung zu entfernen, wird die Membran zwischen zwei Lagen Gel-Blotting Papier gelegt und zur Signaldetektion in einen "Development Folder" überführt, der eine optimale Detektion gewährleistet und das Austrocknen der Membran verhindert.

3.6.3.3 Quantifizierung Aufgetragen wurden jeweils 8 µl Liquorprobe. Jedes Gel führte eine Verdünnungsreihe eines Gemisches synthetischer A-Peptide 1-40 und 1-42 (A1-42: 5,10,15,25 pg; A1-40: 20, 50, 75, 100 pg). Die Messungen wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Berechnung der A-Peptid Konzentrationen erfolgte für jedes Gel anhand seiner Eichreihe. Anschließend wurde der Mittelwert (n=3) und Variationskoeffizient (VK) berechnet. Der Intraassay-Variationskoeffizient wurde anhand der drei Einfachbestimmungen berechnet, die auf jeweils getrennten Gelen im gleichen Experiment unter Verwendung identischer Stammlösungen bestimmt wurden. Der Interaassay-Variationskoeffizient wurde anhand der A1-42 Mittelwerte bestimmt, die in unabhängigen Experimenten (d.h. Untersuchungstagen) ermittelt wurden. Mittels Dreifachbestimmung ermittelte Ausreißer wurden bei Berechnung beider Variationskoeffizienten nicht eliminiert, d.h. alle technisch auswertbaren A-Peptidbanden gingen in die Berechnung ein. Zusätzlich wurden für A1-40, A1-42 und A1-38 die Rohwerte (Flächeneinheiten) der drei Banden

pro Spur erfasst und als Quotienten aufeinander bezogen (A1-42/A1-40, A1-42/A1-38). Die ECL-Detektion nach Western-Immunoblot (primärer mAb: 1E8) erfolgte mittels Belichtung von Hyperfilm™ über 5 min. Die densitometrische Auswertung erfolgte mittels Laserscanners (Epson GT 9000) und Auswertesoftware (Fa. Biometra, BioDoc software).

### 3.6.4 Quantifizierung des ECL-Signals mittels CCD-Kamera

#### 3.6.4.1 Materialien und Geräte

Bio-RAD Laboratories (Hercules, CA, USA): Fluor-S MAX Multimager System (Best.-Nr. 170-7720); Quantity One Software (Best.-Nr. 170-8601)

#### 3.6.4.2 ECL-Entwicklung

Die ECL-Entwicklung wurde wie unter 3.6.3.2 beschrieben durchgeführt.

#### 3.6.4.3 Durchführung

Aufgetragen wurden jeweils 10 µl Liquorprobe. Jedes Gel führte eine Verdünnungsreihe eines Gemisches der synthetischen A-Peptide 1-37, 1-38, 1-39, 1-40 und 1-42 (A1-37: 5, 10, 20, 40, 80 pg; A1-38: 15, 30, 60, 90, 120 pg; A1-39: 5, 10, 20, 30, 60 pg; A1-40: 25, 50, 100, 200, 300 pg; A1-42: 5, 10, 20, 40, 80 pg). Die ECL-Detektion mittels CCD-Kamera erfolgte bei einer Auflösung von 80x80µm mittels serieller Expositionszeiten für 5, 20, 60 und 120 Sekunden. Für die Quantifizierung der Gele relativ zu ihrer jeweiligen Eichreihe wurde die Auswertesoftware "Quantity One" (Fa. Bio-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA) eingesetzt. Die Messungen wurden als Vierfachbestimmung durchgeführt. Die Berechnung der A-Peptid Konzentrationen erfolgte für jedes Gel anhand seiner Eichreihe. Anschließend wurde der Mittelwert (n=4) und Variationskoeffizient (VK) berechnet. Der Intraassay-Variationskoeffizient wurde anhand der vier Einfachbestimmungen berechnet, die auf jeweils getrennten Gelen im gleichen Experiment unter Verwendung identischer Stammlösungen bestimmt wurden. Der Interaassay-Variationskoeffizient wurde anhand der Mittelwerte bestimmt, die in unabhängigen Experimenten (d.h. Untersuchungstagen) ermittelt wurden. Mittels Vierfachbestimmung ermittelte Ausreißer wurden bei Berechnung beider Variationskoeffizienten nicht eliminiert, d.h. alle technisch auswertbaren A-Peptidbanden gingen in die Berechnung ein.

## 3.7 Telenzephal

#### Primärkultur des Hühnereies

der Hühnerrasse White Leghorn werden bei 37°C im Brutschrank über 10 Tage bebrütet. Am 10. Tag wird der Hühnerembryo unter sterilen Bedingungen entnommen und das Gehirn freipräpariert. Die vorderen Hirnbläschen werden abgetrennt, von den anliegenden Meningen befreit und in HEPES-gepuffertem DMEM aufgefangen. Das so gewonnene Gewebe wird über 15 Minuten einem Trypsinverdau unterzogen und nach dreimaligem Waschen mit DMEM mehrfach durch eine Kanüle aufgezogen. Nach fünfminütiger Zentrifugation des Homogenats bei 550g wird der Überstand dekantiert, das Pellet in Kultivationsmedium (DMEM +5% Fetales Kälberserum + 5% Hühnerserum) aufgenommen und erneut durch eine Kanüle aufgezogen. Im Anschluß an eine Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer wird die Zelldichte der Suspension auf 1.5 Mio. Zellen/ml eingestellt und diese in die Kultivationsgefäße ausplattiert, so dass sich eine Zelldichte von 375.000 Zellen/cm<sup>2</sup> ergibt. Zur Verbesserung der Zellanheftung wurden die Kultivationsgefäße zuvor über 24 Stunden mit einer Poly-L-Lösung (0,1mg/ml Poly-L-Lysin in 0,1M Borat/NaOH-Puffer, sterilfiltriert, pH 8,4) beschichtet. Am 2. Kultivationsstag erfolgt ein 50%iger Mediumwechsel, am 5. Kultivationsstag ein 100%iger Medienwechsel unter gleichzeitiger Zugabe der zu untersuchenden Testsubstanz. Die Inkubationszeiten können bis zu 48 Stunden betragen.

## 3.8 Gewinnung von Liquor

Drei bis 10 ml lumbaler Liquor wurde mittels lumbaler Liquorpunktion gewonnen und in Polypropylen Probengefäßen aufgefangen. Nach Zentrifugation (1000g, 10 min, 4° C) wurden die Proben innerhalb von 24 Stunden in Aliquots von 150 µl bis zur Bestimmung bei -80°C in

Polypropylengefäßen (Eppendorf, 1.5 ml) gelagert. Die Proben dürfen nicht mehrfach eingefroren und aufgetaut werden.

3.9 Patienten Insgesamt wurde der lumbale Liquor bei 130 Patienten untersucht. Bei fünf dieser Patienten wurden A-Peptide zusätzlich im Blutplasma gemessen. Die Patienten verteilten sich auf die beiden diagnostischen Obergruppen Neuropsychiatrische Erkrankungen ausschließlich Alzheimer-Demenz ("neuropsychiatric disease controls", NDC) und Patienten mit klinisch wahrscheinlicher (sporadischer) Alzheimer-Demenz (AD). Methodisch bedingt wurden mehrere NDC- und AD-Gruppen mit jeweils unterschiedlichen Patienten untersucht, wobei zusammengehörige Patientengruppen durch eine fortlaufende arabische Nummerierung gekennzeichnet sind (z.B. NDC-1, AD-1). Die Kollektive NDC-1 und NDC-2 enthalten auch Patienten mit dementiellen Erkrankungen anderer Genese als AD. Das Kollektiv NDC-3 enthält nur Patienten mit nicht-dementiellen neuropsychiatrischen Erkrankungen. Dieses Kollektiv wurde differenziert in Patienten mit chronisch entzündlichen Erkrankungen des ZNS ("chronic inflammatory CNS disease", CID-3) und den verbleibenden Patienten mit anderen neuropsychiatrischen Erkrankungen ("other neuropsychiatric diseases", OND-3). Innerhalb der OND-3 und der AD-3 Gruppe wurde weiter in Abhängigkeit des ApoE 4-Genotypus differenziert. Fig. 1 gibt einen Überblick über die Patientengruppen und ihre hierarchische Zuordnung. Tabelle 10a-d nennt die Patienten, die sich gleichzeitig in mehreren Patientengruppen befinden. Die klinische Diagnostik erfolgte gemäß ICD-10. Die Diagnose einer Alzheimer Demenz wurde gemäß den international überwiegend verwendeten Kriterien der "Work Group of the National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke (NINCDS)" und der Richtlinien des "Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (ARDA)" vorgenommen (McKhann et al., 1984). Die Proben wurden ausschließlich innerhalb der klinischen Routinediagnostik gewonnen. Für die hier vorgestellten Messungen wurde kein zusätzliches Liquorvolumen gewonnen. Entsprechend konnte die retrospektive Untersuchung nur erfolgen, wenn nach abgeschlossener Routinediagnostik noch aliquotierter Liquor zur Verfügung stand.

3.9.1 NDC-1 und AD-1 A-Peptide wurden im lumbalen Liquor bei 65 Patienten mittels A-SDS-PAGE/Immunoblot-1 und densitometrischer Filmauswertung quantifiziert. Die Probenaufnahme der zuvor nach Liquorpunktion und Zentrifugation nativ eingefrorenen Proben folgte gemäß 3.2.2a. Die Diagnosen und Meßwerte der Patienten sind in Tabelle 12 dargestellt und in Tabelle 13 zusammengefaßt. Patienten die gleichzeitig in anderen Kollektiven vertreten sind finden sich in Tabelle 10a und 10c. NDC-1: n = 30, Alter =  $59.2 \pm 12.6$  (MW  $\pm$  SD), Geschlecht: 19/11 (weiblich/männlich). AD-1: n = 35, Alter =  $69.7 \pm 8.8$  (MW  $\pm$  SD), Geschlecht: 18/17 (weiblich/männlich). Zehn der AD-1 und 20 der NDC-1 Patienten wurden vergleichend mittels Immunopräzipitation (mAb 6E10, IP ohne Detergentien) und A-SDS-PAGE/Immunoblot-1 untersucht (vergl. Tabelle 12 und 13). Alle Patienten des Kollektivs AD-1 wurden vergleichend mit einem kommerziellem ELISAA1-42 untersucht (vergl. Tabelle 13).

3.9.2 NDC-2 KP Bei zehn Patienten wurde die Konzentration von A1-40 und A1-42 im lumbalen Liquor in Abhängigkeit der Probenvorbehandlung mittels A-SDS-PAGE/Immunoblot-1 und densitometrischer Filmauswertung untersucht. Dabei wurde das Ausmaß der kältepräzipitationsbedingten Erniedrigung (KP) von A-Peptiden untersucht. Die Proben der Patienten wurden nach Liquorpunktion und Zentrifugation aliquotiert. Ein Aliquot wurde vor dem Einfrieren mit SDS-/Hitzenaturierung gemäß 3.2.2a vorbehandelt, im folgenden A1-40SDS oder A1-42SDS genannt. Das andere Aliquot wurde ohne Vorbehandlung bei -80° C

eingefroren, im folgenden A1-40nativ oder A1-42nativ genannt. Die Diagnosen und Meßwerte der Patienten sind in Tabelle 16a und 16b zusammengefaßt. Patienten die gleichzeitig in anderen Kollektiven vertreten sind finden sich in Tabelle 10a. NDC-2KP: n = 10, Alter =  $45.8 \pm 13.4$  (MW  $\pm$  SD), Geschlecht: 6/4 (weiblich/männlich).

3.9.3 NDC-3 und AD-3 mit Untergruppen

Bei 49 Patienten des Kollektivs NDC-3 und 12 Patienten des Kollektivs AD-3 wurde die Konzentration der A-Peptide im lumbalen Liquor mittels A-SDS-PAGE/Immunoblot-2 und CCD-Kamera untersucht. Die Probenaufnahme der nach Liquorpunktion und Zentrifugation nativ eingefrorenen Proben folgte gemäß 3.2.2a. Die Diagnosen und Meßwerte der Patienten sind in Tabelle 19 dargestellt und in Tabelle 20 zusammengefaßt. Patienten die gleichzeitig in anderen Kollektiven vertreten sind finden sich in Tabelle 10b, c und d. NDC-3: n = 47, Alter =  $45.2 \pm 15.8$  (MW  $\pm$  SD), Geschlecht: 19/28 (weiblich/männlich). AD-3: n = 12, Alter =  $73.0 \pm 7.9$  (MW  $\pm$  SD), Geschlecht: 9/3 (weiblich/männlich). Innerhalb des Kollektivs NDC-3 wurden in Abhängigkeit von Art der Probe und Probenvorbehandlung weitere Untergruppen gebildet: Gepaarte Liquor- und EDTA Plasmaproben wurden bei fünf der NDC-3 Patienten gewonnen. Diese Proben wurden mittels Immunopräzipitation (RIPA-IP, 1E8) untersucht und werden nachfolgend IP-CSF-3 und IP-Plasma-3 genannt. Vergleichend wurden die Konzentrationen der ohne vorherige Immunopräzipitation gemessenen A-Peptide für die letztgenannten fünf Patienten als das Kollektiv SDS-CSF-3 zusammengefaßt (vergl. Tabelle 20). Bei 27 der NDC-3 Patienten wurde die Konzentration von A1-42 im Liquor vergleichend mit einem kommerziellem ELISA (Hulstaert et al., 1999) bestimmt. Innerhalb des Kollektivs NDC-3 wurde zwischen Patienten mit chronisch entzündlichen ZNS-Erkrankungen ("chronic inflammatory CNS disease", CID) und Patienten mit anderen neuropsychiatrischen Erkrankungen ("other neuropsychiatric disease", OND) differenziert. OND-3: n=37, Alter =  $45.3 \pm 16.4$  (MW  $\pm$  SD), Geschlecht: 15/22 (weiblich/männlich). CID-3: n=10, Alter =  $44.9 \pm 14.2$  (MW  $\pm$  SD), Geschlecht: 4/6 (weiblich/männlich). Das CID-3 Kollektiv setzte sich aus fünf Patienten mit Multipler Sklerose und fünf Patienten mit unklarer Ätiologie des chronisch entzündlichen ZNS-Prozesses zusammen. Das Kollektiv OND-3 wird in Abhängigkeit des ApoE 4 Genotypus weiter in die Gruppen OND-34plus (n=6) und OND-34minus (n=30) differenziert. Patienten der Gruppe OND-34plus haben ein oder zwei Allele 4, Patienten der Gruppe OND-34minus fehlt dieses Allel. Da 11/12 AD-3 Patienten ein oder zwei ApoE 4 Allele tragen, kann der Einfluß des 4 Allels auf das Liquormuster der A-Peptide nicht eliminiert werden, aber 4 unabhängige und daher mehr AD-spezifische Effekte wurden durch den Vergleich der Patientengruppen AD-34plus (n=11) und OND-34plus (n=6) ermittelt. Die Werte zu den MMSE Testergebnissen der Patienten, Häufigkeiten der ApoE 4 Allele, sowie absolute and relative A-Peptid Liquorkonzentrationen sind für die Gruppen NDC-3, AD-3, IP-plasma-3, IP-CSF-3, and SDS-CSF-3 in Tabelle 20 zusammengefaßt.

3.9.4 NDC-3KP und AD-3KP

Bei 15 Patienten der Gruppe NDC-3 und 9 Patienten der Gruppe AD-3 wurde die kältepräzipitationsbedingte Erniedrigung (KP) von A1-42 im lumbalen Liquor vergleichend mittels A-SDS-PAGE/Immunoblot-2 und CCD-Kamera untersucht. Die Kollektive werden im folgenden NDC-3KP und AD-3KP genannt. NDC-3KP ist vollständig Teilkollektiv von NDC-3. AD-3KP (n=11) enthält neben neun Patienten von Kollektiv AD-3 zusätzlich zwei weitere Patienten (NP69, NP197). Die Probenvorbereitung für die Bestimmung von A1-42nativ und A1-42SDS erfolgte wie für das Kollektiv NDC-2KP beschrieben. Die Diagnosen und Meßwerte der Patienten sind in Tabelle 21



zusammengefaßt. Patienten die gleichzeitig in anderen Kollektiven vertreten sind finden sich in Tabelle 10b, c und d. NDC-3KP: n=15, Alter =  $44.6 \pm 15.0$  (MW $\pm$ SD), Geschlecht: 5/10 (weiblich/männlich). AD-3KP: n = 11, Alter =  $70.9 \pm 9.0$  (MW $\pm$ SD), Geschlecht: 9/2 (weiblich/männlich).

### 3.10 Statistik

Die Testung auf signifikante Differenzen zwischen unabhängigen Stichproben erfolgte über den Mann-Whitney U-Test und für abhängige (gepaarte) Stichproben über den Wilcoxon-Test. Die nicht-parametrische Regressionsanalyse erfolgte nach Spearman (Korrelationskoeffizient rho oder R). Als Statistiksoftware wurde Statistika (Version 5.0) eingesetzt. Die iterative Berechnung von diagnostischer Spezifität und Sensitivität für die Diagnosestellung AD in Abhängigkeit unterschiedlicher A-Peptidgrenzwerte wurde über eine "receiver operating characteristic (ROC) curve" vorgenommen (Metz, 1978). Das zweiseitige Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0.05$  festgelegt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Auftrennung und Nachweis von sAPPa und A-Peptiden

#### 4.1.1 A-SDS-PAGE

Mittels A-SDS-PAGE lassen sich folgende synthetische A-Peptide durch harnstoffinduzierte Konformationsänderung von kathodisch (oben) nach anodisch (unten) trennen: 1-33 / 1-34 1-35 1-37 1-38 1-39 1-42 / 2-40 / 3-40 2-42 / 3-42 3p-42\* / 3p-40\* \* p = Pyroglutamatderivate; A-Peptide mit fehlender oder nur partieller Trennung stehen in einer Zeile. Der Nachweis erfolgte mittels Silberfärbung der Trenngele. Mittels A-IPG-2D-PAGE können die A-Peptide 2-40 / 3-40 von 1-42 getrennt werden, da das Fehlen von Aspartat den isoelektrischen Punkt um eine pH-Einheit von 5.37 nach 6.37 verschiebt (vergl. Fig. 2a&c und Fig. 24a). Der gleiche pH-Sprung zeigt sich für die A-Peptide 2-42 / 3-42 in Bezug auf 1-42. Zwischen 2-40/2-42 und 3-40/3-42 kann über die N-terminal selektiven mAbs 1E8 und 6E10 differenziert werden (vergl. 3.1.2). Bemerkenswert ist, dass N- und C-terminale Veränderungen der A-Peptide, die zu einem erhöhtem Aggregationsverhalten führen (N-terminal: Fehlen von Aspartat und Pyroglutamatbildung; C-terminal: Verlängerung um hydrophobe Aminosäuren) auch zu einer erhöhten elektrophoretischen Mobilität im harnstoffhaltigen Trenngelsystem führen. Damit besteht eine Analogie zwischen den Struktur-Aktivitätsfunktionen in vitro und in vivo.

Vergleichsweise geringfügige Veränderungen der Trenngelmatrix (Polyacrylamid Porengröße, Molarität des Harnstoffs, pH-Wert, Temperatur und Ionenstärke) und der kathodischen SDS-Konzentration verändern signifikant das absolute und relative Laufverhalten der A-Peptide. Veränderungen der Gesamtkonzentration an Acrylamidmonomer (T%) oder des Anteils an Bisacrylamid an der Gesamtkonzentration (%C) um nur 1-2% bei sonst konstanten Bedingungen sind dafür ausreichend. Gleichfalls führt die selektive Reduktion der Harnstoffkonzentration von 8 auf 7 Mol/L oder die Reduktion der kathodischen SDS-Konzentration von 0.25% (w/v) auf 0.1% zu einer veränderten Auftrennung. Mittels A-SDS-PAGE wird im oberen (kathodischen) Kompartiment im harnstoffhaltigem Trenngel sAPP aufgetrennt, dass mittels Western-Immunoblot-1/2 (mAb 1E8) nachgewiesen werden kann (vergl. Fig. 3). Bedingt durch die Molmasse von  $> 100000$  werden sAPP Isoformen im Vergleich zu den A-Peptiden weniger effektiv und mit wesentlich höherer Varianz aus den kleinporigen harnstoffhaltigen Trenngelen auf die Nachweismembran geblottet (Intraassay-Variationskoeffizient im Liquor  $> 20\%$ ). Blotteffizienz und Auftrennung der sAPP Isoformen können aber wesentlich verbessert werden, wenn das harnstoffhaltige Trenngelsystem mit einem kathodischen nichtharnstoffhaltigem Trenngelkompartiment höherer Porengröße aber sonst gleicher Pufferszusammensetzung kombiniert wird (10 T%, 5 C%, kein Harnstoff). Bei unveränderter Trenngellänge des harnstoffhaltigen Kompartiments wird die Qualität der A-

Peptidauftrennung nicht beeinträchtigt, da die A-Peptide das großporige Kompartiment noch konzentriert innerhalb der "moving boundary" durchlaufen. Die Quantifizierung von sAPP mittels A-SDS-PAGE/Immunoblot-2 und CCDKamera erscheint für die neurochemische Demenzdiagnostik vielversprechend, da sAPP bei AD im Liquor erniedrigt gefunden wurde und den -Sekretase Schnitt abbildet. Damit erlaubt der A-SDS-PAGE/Immunoblot die Berechnung von sAPP/A-Peptid Quotienten, die ein Maß für das Verhältnis von -Sekretase zu -/Sekretaseaktivität darstellen.

#### 4.1.2 Western-Immunoblot-1/2

Der mAb 1E8 zeigt im Western-Immunoblot-1/2 eine erstaunlich hohe N-terminale Spezifität, da im unteren pg-Bereich (<200 pg) nur A-Peptide nachweisbar sind, die N-terminal maximal um eine Aminosäure (Aspartat) verkürzt sind. Entsprechend werden die A-Peptide 3-40, 3p-40, 3-42 und 3p-42 mittels des mAb 1E8 nicht nachgewiesen. Hier gelingt der Nachweis mittels des N-terminal spezifischen mAb 6E10, der kommerziell erhältlich ist, aber in Abhängigkeit der Blotbedingungen etwa zehn- bis dreißigfach weniger empfindlich detektiert. Die Nachweisempfindlichkeit des Western-Immunoblot-1 (Milchpulver-Block, mAb 1E8) liegt bei 1 pg (A1-40) bis 2 pg (A1-42) bei Filmexposition und bei 3 pg (A1-40) bis 6 pg (A1-42) bei Signalaufnahme mit der CCD-Kamera. Die Nachweisempfindlichkeit des Western-Immunoblot-2 (Roti-Block, mAb 1E8) liegt bei 0.3 pg (A1-40) bis 0.6 pg (A1-42) bei Filmexposition und bei 1 pg (A1-40) bis 2 pg (A1-42) bei Signalaufnahme mit der CCD-Kamera. Durch Entwicklung des Western-Immunoblot-2 konnte die im Vergleich zur Filmexposition etwa dreifach geringere Empfindlichkeit der CCD-Kamera kompensiert werden. Die Nachweisempfindlichkeit des kommerziell erhältlichen N-terminal selektiven mAb 6E10 liegt bei Western-Immunoblot mit Milchpulver-Block bei 10 pg (A1-40) bis 20 pg (A1-42) bei Filmexposition und bei 30 pg (A1-40) bis 60 pg (A1-42) bei Signalaufnahme mit der CCD-Kamera. Der mAb 6E10 kann nicht mit Rotiblock verwendet werden. Damit konnte die Nachweisempfindlichkeit gegenüber dem mAb 1E8 um bis zu 30-fach gesteigert werden. SDS-PAGE Trenngelsysteme mit 8 M Harnstoff können unabhängig von den verwendeten Geldimensionen mit maximal etwa 5 µl Liquor pro mm<sup>2</sup> Geloberfläche beladen werden, wenn bei nahezu allen Patientenproben eine optimale elektrophoretische Trennung realisiert werden soll. Dabei handelt es sich um nativ eingefrorenen und anschließend SDS-/Hitzenedenaturierten Liquor oder um Liquor, der vor dem Einfrieren SDS-/Hitzenedenaturiert wurde. 5 µl pro mm<sup>2</sup> entsprechen bei dem verwendeten Minigelsystem einem Liquorvolumen von etwa 10 µl. Damit ergibt sich Empfindlichkeit von 200 pg/ml für den Nachweis von A1-42 im humanen Liquor mittels A-SDS-PAGE/Immunoblot-2 und CCD-Kamera. Eine Nachweisempfindlichkeit von mindestens 200 pg/ml ist Voraussetzung für die neurochemische Demenzdiagnostik der AD mittels Bestimmung der A-Peptide im Liquor und kann beispielsweise mit dem kommerziell erhältlichen mAb 6E10 nicht realisiert werden. Bei Kombination von Immunopräzipitation (RIPA-Detergentien, mAb 1E8) mit A-SDS-PAGE/Immunoblot-2 und CCD-Kamera steigt die Empfindlichkeit für den Nachweis von A1-42 auf < 10 pg/ml. Dies ist Voraussetzung für die Quantifizierung von A-Peptiden im Plasma mittels A-SDS-PAGE/Immunoblot. Die Intra- und Interassay-Variationskoeffizienten für den A-SDS-PAGE/Immunoblot-1 mit densitometrischer Filmauswertung finden sich in Tabelle 11. Die entsprechenden Variationskoeffizienten für den A-SDS-PAGE/Immunoblot-2 mit CCD-Kamera finden sich in Tabelle 18a und b. Für die Quantifizierung von 20 pg A-Peptid wurden Intra- und Interassayvariationskoeffizienten von jeweils weniger als 10% ermittelt. Die Quantifizierung mittels

CCD-Kamera bietet erhebliche Vorteile gegenüber der Filmexposition. Das Lichtsignal kann hier über 3.8 Zehnerpotenzen linear aufgenommen werden und zusätzlich kann die Zeitdauer der Signalaufnahme über einen weiten Bereich exakt gesteuert werden. Entsprechend können APP-Metabolite mit großer Differenz ihrer Signalintensität, wie z.B. sAPP und A1-42, über zwei Messzeiten (z.B. 10 s und 3 min) quantifiziert werden.

#### 4.2 Patientenproben

Bisher war bekannt, dass A1-40 und A1-42 regelhaft und in höherer Konzentration im humanem Liquor vorkommen. Sowohl bei Direktauftrag nach SDS-/Hitzenaturierung als auch nach vorheriger Immunopräzipitation unter Verwendung N-terminal selektiver Antikörper kann dagegen mittels A-SDS-PAGE/ Immunoblot-1/2 regelhaft ein charakteristisches A-Peptidquintett im humanen lumbalen Liquor nachgewiesen werden (Fig. 3). Oberhalb (kathodenseitig) von A1-40 kommen drei weitere A-Peptide zur Darstellung, die initial als A1-xa, A1-xb und A1-xc bezeichnet wurden und mittels A-IPG-2D-PAGE/ Immunoblot mit Komigration synthetischer A-Peptide als A1-37/38/39 identifiziert werden konnten (Fig. 2). Die A-Peptide 1-37, 1-38 und 1-39 sind bei carboxyterminal selektiver Immunopräzipitation gegen 1-40 und 1-42 im Liquor mittels A-SDS-PAGE/Immunoblot nicht nachweisbar. Neben den A-Peptiden 1-33, 1-34 und 1-35 konnten die A-Peptide 1-37/38/39 im humanem Liquor mittels MALDI-TOF nachgewiesen werden. Die A-Peptide 1-33/1-34 und 1-35 sind im A-SDS-PAGE/Immunoblot oberhalb (kathodenseitig) von 1-37 bei den Patienten im Liquor in der Regel nur an der Nachweisgrenze detektierbar oder nicht nachweisbar. Die A-Peptide 1-37, 1-38, 1-39, 1-40 und 1-42 sind hochgradig und signifikant korreliert, wie aus Fig. 10 entnommen werden kann. Dies spricht für eine enge enzymatische Regulation ihrer Entstehung. Die synthetischen A-Peptide 1-37, 1-38 und 1-39 standen bei Untersuchung der ersten Patientenkollektive (NCD-1, AD-1, NDC-2KP) noch nicht zur Verfügung. Daher wurde hier das Verhältnis A1-42 zu A1-38 über den Quotienten der densitometrisch ermittelten Flächeneinheiten der jeweiligen Banden einer Gelspur ermittelt. Zum Vergleich wurde auch der Quotient A1-42/A1-40 über die Flächeneinheiten ausgedrückt. Da A1-38, A1-40 und A1-42 bei gleicher Konzentration und gleichen Bedingungen im Western-Immunoblot eine unterschiedliche Intensität des ECL-Signals zeigen, können die Quotienten der Flächeneinheiten nicht mit den entsprechenden Quotienten der über die Eichgrade ermittelten A-Peptidkonzentrationen gleichgesetzt werden. Bei einem Teil der Patienten mit AD wird unterhalb (anodisch) von A1-42 mittels A-SDS-PAGE/Immunoblot-2 und CCD-Kamera eine zusätzliche Bande mit dem Retentionsfaktor (Rf) von A2-42 nachweisbar (Fig. 23a). Diese Bande konnte im Liquor bei AD nach vorheriger Immunopräzipitation (RIPA-IP, mAb 1E8) mittels A-IPG-2D-PAGE/Immunoblot-2 und CCD-Kamera als A2-42 identifiziert werden (Fig. 24 b). Bei nicht-dementen Kontrollpatienten konnte A2-42 bisher nicht nachgewiesen werden. A2-42 ist auch mit typischer hirnregionaler Verteilung bei Patienten mit sporadischer AD intrazerebral massiv erhöht (vergl. 4.2.5). Für die Bestimmung von A-Peptiden im Liquor bei den unter 3.9 genannten Patientenkollektiven stand noch kein synthetisches A2-42 zur Verfügung. Entsprechend liegen für diese Patienten keine quantitativen Daten zu A2-42 vor. Zwischenzeitlich wurde aber ein weiteres Patientenkollektiv Patienten gemessen, das unter 3.9 noch nicht aufgeführt ist. Bei einigen der Patienten mit AD-4, bei einigen Patienten mit anderen dementiellen Erkrankungen als AD (nAD-4) und bei einigen Patienten mit nicht-dementiellen Erkrankungen (NDC-4) war A2-42 nachweisbar. Zusätzlich war der Quotient A1-42/A1-40 bei den A2-42 positiven Patienten im Vergleich zu den übrigen

Patienten signifikant erniedrigt. 4.2.1 NDC-1 und AD-1 Tabelle 12 gibt die klinischen Daten und individuellen Meßwerte der Patienten und Tabelle 13 faßt die statistischen Kennwerte der Patientenkollektive AD-1 und NDC-1 zusammen. Die Analyse der Liquorproben erfolgte mittels A-SDS-PAGE/Immunoblot-1 und densitometrischer Filmauswertung. Die signifikante Erniedrigung von A1-42 in humanem lumbalen Liquor bei Patienten mit AD-1 im Vergleich zu NDC-1 geht aus Fig. 4 hervor. A1-40 ist bei AD-1 gleichfalls signifikant erniedrigt, aber nicht in dem Ausmaß wie dies für A1-42 deutlich wird (vergl. Tabelle 14). Entsprechend ist auch der Quotient A1-42/A1-40 hochsignifikant erniedrigt (Fig. 5, Tabelle 14). Bisher nicht beschrieben wurde die gleichfalls hochsignifikante Erniedrigung des Quotienten A1-42/ A1-38 (Fig. 6, Tabelle 14). Die Grenzwerte für den Gruppenvergleich AD-3 versus NDC-3 wurden für A1-42 und die beiden letztgenannten A-Peptidquotienten über die jeweiligen "receiver operating characteristics (ROC)" ermittelt (Tabelle 15). Die Differenzierung der Patientenkollektive AD-1 versus NDC-1 bei einem Grenzwert von 802.5 pg/ml A1-42 war mit einer Spezifität von 74% und einer Sensitivität von 87% durchführbar. Der Quotient A1-42/A1-40 hat eine diagnostische Spezifität von 71% und eine Sensitivität von 93% für die Differenzierung der Kollektive AD-1 versus NDC-1. Die entsprechende Spezifität und Sensitivität für den Quotienten A1-42/A1-38 beträgt 84% und 0.86%. Vergleichend wurde A1-42 nach Immunopräzipitation (IP ohne Detergenz, mAb 6E10) und A-SDS-PAGE/Immunoblot-1 mit densitometrischer Filmauswertung untersucht. Wie aus Fig. 7 und Tabelle 14 hervorgeht, differenziert A1-42 nach vorheriger IP weniger gut die Patientenkollektive AD-1 und NDC-1. Die nach Immunopräzipitation und A-SDS-PAGE/Immunoblot-1 mit densitometrischer Filmauswertung ermittelte Konzentration von A1-42 im Liquor bei einem Teilkollektiv der Patienten mit AD-1 stimmt gut mit der Konzentration überein, die mittels des kommerziellen ELISAA1-42 (Hulstaert et al., 1999) bei AD-1 ermittelt wurde (Tabelle 13). Gleichzeitig stimmt der ELISA Mittelwert bei AD-1 (412 pg/ml) gut mit dem ELISA Medianwerten bei AD (428 und 487 pg/ml) überein, die in einer internationalen Multizenterstudie ermittelt wurden (Hulstaert et al., 1999). Der Vergleich der Konzentrationen von A1-42 im Liquor in Abhängigkeit der Meßmethodik (SDS-/Hitzenaturierung mit A-SDS-PAGE/Immunoblot-1 versus Immunopräzipitation mit A-SDS-PAGE/Immunoblot-1 oder ELISAA1-42) macht deutlich, dass mittels SDS-/Hitzenaturierung wesentlich mehr A1-42 aus dem Liquor extrahiert werden kann als über die Antikörper-abhängigen Verfahren (Immunopräzipitation und ELISA). Im Vergleich zur Immunopräzipitation (IP ohne Detergenz, mAb 6E10) werden nach SDS-/Hitzenaturierung im Mittel 2.3-fach und im Vergleich zum ELISA (ohne Detergenz) 1.8-fach höhere Konzentrationen von A1-42 im Liquor bei AD gemessen. Weiter unten wird gezeigt, dass diese Differenz zwischen ELISA und A-SDS-PAGE/Immunoblot bei NDC-Patienten noch höher ausfällt (vergl. NDC-3).

4.2.2 NDC-3 und AD-3 Tabelle 19 gibt die klinischen Daten und individuellen Meßwerte der Patienten und Tabelle 20 faßt die statistischen Kennwerte der Patientenkollektive AD-1 und NDC-1 zusammen. Die Analyse der Liquorproben erfolgte mittels A-SDS-PAGE/Immunoblot-2 und CCD-Kamera.

4.2.2.1 Abhängigkeit der A-Peptid Konzentration im Liquor von der Art der Probenvorbereitung Bei fünf Patienten des NDC-3 Kollektivs wurden Aliquots von Liquor vergleichend mit vorheriger Immunopräzipitation (RIPA-IP, mAb 1E8) bzw. mit direkter Probenaufnahme (SDS-/Hitzenaturierung) untersucht (vergl. Tabelle 20). Nach SDS-/Hitzenaturierung ergeben sich etwas höhere A-Peptid Konzentrationen. Dieser Effekt ist betont für A1-38 und A1-42, erreicht aber nicht das Signifikanzniveau. Entsprechend

werden mit beiden Methoden der Probenvorbehandlung vergleichbare A-Peptidspiegel im Liquor gemessen, wenn die Immunopräzipitation mit Detergentien durchgeführt wird. Im Gegensatz dazu wird bei 27 der NDC-3 Patienten mit dem kommerziellen ELISAA1-42 (ohne Detergenz) im Vergleich zu SDS-/Hitzedenaturierung und A-SDS-PAGE/ Immunoblot-2 mit CCD-Kamera ein ca. 3-fach tieferer Spiegel für A1-42 gemessen. Weiter oben wurde für Patienten des AD-1 Kollektivs nachgewiesen (vergl. 4.2.1), dass mit Immunopräzipitation (mAb 6E10) und A-SDS-PAGE/ Immunoblot-1 deutlich tiefere und mit dem ELISAA1-42 vergleichbare Konzentrationen gemessen werden, wenn die Immunopräzipitation ohne Detergenz durchgeführt wird. Damit ergibt sich der Hinweis, dass A1-42 im humanen Liquor in einer Fraktion vorliegt, die monoklonalen Antikörpern ohne vorherige Behandlung mit Detergentien nur zum Teil zugänglich ist. Die eingesetzten Detergentien können Peptide aus nicht-kovalenten Protein-Peptidbindungen - beispielsweise bedingt durch hydrophobe Wechselwirkung - freisetzen. Entsprechend sind die höheren Liquorspiegel von A1-42 nach Einsatz von Detergentien (SDS-Hitzedenaturierung, RIPA-IP) im Vergleich zu Verfahren ohne Einsatz von Detergentien (IP ohne Detergenz, ELISAA1-42) wahrscheinlich durch hochaffine Bindung und Epitopmaskierung von A1-42 an andere Proteine oder A-Peptidaggregate bedingt. Bei Verwendung von Detergentien ist erwartungsgemäß der Einsatz des ionischen Detergenz SDS bei höheren Konzentrationen (0.5% w/v) und Temperatur (95°C) noch effektiver als der RIPA-Detergentienmix. Weiter unten wird nachgewiesen, dass A1-42 im Vergleich zu A1-40 besonders kältepräzipitationsempfindlich ist und krankheitsspezifisch ein unterschiedliches Kältepräzipitationsverhalten bei Patienten mit AD und NDC zeigt (vergl. 4.2.4). Synthetisches A1-42 mit vergleichbarer Konzentration in Wasser gelöst zeigt dagegen eine deutlich geringere Kältepräzipitation. Damit wird wahrscheinlich, dass die kältepräzipitationsbedingte Reduktion von A1-42 im humanen Liquor überwiegend auf den Aggregat-gebundenen Anteil des Peptids entfällt. Im Fall vergleichsweise hydrophober Aggregate - beispielweise Lipoprotein-haltiger Komplexe - wäre ein Verlust durch Kältepräzipitation nicht überraschend. In diesem Zusammenhang wird weiter unten gezeigt (4.2.4), dass 4-positive Patienten des NDC-3KP Kollektivs eine besonders hohe Rate von KP-bedingter Erniedrigung von A1-42 zeigen und annähernd gleich tiefe Liquorspiegel wie 4-positive AD-3KP Patienten haben. Annähernd gleich tiefe A1-42 Liquorspiegel werden weiter unten auch für Patienten der Gruppen OND-34plus und AD-34plus nachgewiesen.

#### 4.2.2.2 A-Peptide im Plasma

Mittels Immunopräzipitation und A-SDS-PAGE/Immunoblot mit CCD-Kamera konnte das A-Peptidquintett auch im Plasma nachgewiesen werden. Im Vergleich zum Liquor sind die Konzentrationen im Plasma 30 bis 60-fach geringer und beide Kompartimente zeigen jeweils spezifische Muster der prozentualen A-Peptidanteile. Besonders das Verhältnis A1-42/A1-38 ist ZNS-spezifisch unterschiedlich: Liquor 0.80 (0.79-0.92), Plasma 1.70 (1.69-1.75); Median (Quartil).

#### 4.2.2.3 Krankheitsspezifische A-Peptidmuster im Liquor und Einfluß des ApoE Genotyp

Fig. 8 zeigt in Abschnitt A die Konzentrationen der A-Peptide 1-37/38/39/40/42 im humanen Liquor der Patientengruppen OND-3, CID-3 und AD-3. In Abschnitt B ist der prozentuale Anteil der jeweiligen A-Peptidspecies an der Summe aller A-Peptide dargestellt. Die logarithmische Darstellung wurde gewählt, um die deutlich unterschiedlichen Liquorspiegel vergleichend darstellen zu können. Bei den Liquorkonzentrationen der A-Peptide fällt auf, dass das zweithäufigste A-Peptid im humanen Liquor nach A1-40 nicht A1-42 ist, sondern A1-38. Weiter ist bei AD-3 A1-42 erniedrigt. Die A-

Peptidgesamtkonzentration der untersuchten Gruppen ist weitgehend identisch. Wesentlich deutlichere Unterschiede zwischen den Kollektiven werden dagegen bei Betrachtung der prozentualen A-Peptidanteile deutlich: CID-3 und AD-3 zeigen erhöhte Anteile von A1-38% und A1-39% im Vergleich zu OND-3 A1-40% ist hochsignifikant bei AD-3 erhöht A1-42% ist hochsignifikant bei AD-3 erniedrigt und differenziert die Patienten mit AD deutlich besser als die zugehörige A-Peptidkonzentration Aus der Literatur ist bekannt, dass bei familiären AD-Formen mit APP-Punktmutationen in Nähe der -Sekretaseschnittstelle vermehrt A1-40 und A1-42 überexprimiert werden, dagegen bei Mutationen in Nähe der -Sekretaseschnittstelle vermehrt A1-42 anfällt und das Verhältnis A1-42 zu A1-40 deutlich ansteigt. Es kann daher angenommen werden, dass bei Betrachtung der prozentualen Anteile der A-Peptide vermehrt krankheitsspezifische Veränderungen der -Sekretaseaktivität abgebildet werden. In Fig. 9 A und B werden wie unter Fig. 8 beschrieben die Untergruppen OND-34minus, OND-34plus und AD-34plus verglichen. Damit kann zwischen 4- und AD-abhängigen Effekten auf das A-Peptid Muster im Liquor unterschieden werden. Bei OND-34plus im Vergleich zu OND-34minus sind tendentiell alle A-Peptide im Liquor erniedrigt und entsprechend auch die A-Peptidgesamtkonzentration (Abb 9A). Innerhalb des A-Peptidquintetts ist die Erniedrigung von A1-42 besonders deutlich. Bei AD-34plus ist dagegen selektiv A1-42 erniedrigt, allerdings in dem gleichen Ausmaß wie bei OND-34plus. Die A-Peptidgesamtmenge ist hier nicht erniedrigt (Fig. 9A). Damit können die 4-positiven NDC-3 Patienten nicht über die alleinige Bestimmung von A1-42 im Liquor von den 4-positiven AD-3 Patienten getrennt werden. Dies ist jedoch über die prozentualen A-Peptidanteile möglich (Fig. 9B). Bedingt durch die selektive Erniedrigung von A1-42 bei AD-34plus ist hier A1-42% besonders stark erniedrigt und das Kollektiv AD-34plus kann über diesen Parameter ohne Überschneidung von den Gruppen OND-34plus und OND-34minus getrennt werden. Gleichzeitig ist der prozentuale Anteil von A1-40 bei AD-34plus besonders stark erhöht. Wie aus der Korrelationsmatrix in Fig. 10 hervorgeht ist das A-Peptidquintett im Liquor eng miteinander korreliert und die prozentualen Anteile der A-peptide and ihrer Gesamtkonzentration haben für biologische Parameter erstaunlich geringe Variationskoeffizienten. Diese Befunde legen eine enge enzymatische Regulation der Konzentration der fünf A-Peptide durch - und -Sekretase nahe. In diesem Zusammenhang wird weiter unten nachgewiesen (4.5.2), dass neben A1-40 und A1-42 besonders stark ausgeprägt die Entstehung der carboxyterminal verkürzten A-Peptide durch synthetische Inhibitoren der - und -Sekretase reduziert wird.

#### 4.2.2.4 Krankheitsspezifische Muster der prozentualen A-Peptidanteile: Einzelfalldarstellung der Patientenkollektive

Aus Fig. 11-13 kann entnommen werden, dass über A1-38%, A1-40% und A1-42% Patienten mit AD-3 und CID-3 von OND-3 Patienten differenziert werden können. Fig. 11 weist eine signifikante negative Korrelation zwischen A1-38% und A1-42% für AD-3 Patienten nach. Der AD-3 Patient 143 wurde bei der Berechnung der Regressionsgerade nicht berücksichtigt und wird hier, wie auch nachfolgend (vergl. Fig. 12 & 13), als Ausreißer identifiziert. Klinisch zeigte dieser Patient ein Frühstadium der AD (MMSE 27/30). Differentialdiagnostisch war in der Vorgeschichte eine depressive Pseudodemenz diskutiert worden. In Richtung der Pfeilspitze der Regressionsgraden nimmt der Schweregrad der Demenz zu. Auf den Zusammenhang zwischen den prozentualen A-Peptidanteilen und Schweregrad der Demenz wird weiter unten näher eingegangen (vergl. Fig. 14 & 15). Bei einer Grenzkonzentration von A1-42% = 8.5 kann ohne Überschneidung das AD-3

Kollektiv von den Gruppen CID-3 und OND-3 getrennt werden. Der spezifische Zusammenhang zwischen A1-38% und A1-42% bei AD legt aber nahe, dass Patienten mit AD noch besser über eine Funktion ähnlich wie die Regressionsgerade zwischen A1-38% und A1-42% differenziert werden können. Dies hat unmittelbare Relevanz für die neurochemische AD-Diagnostik, denn über die Regressionsgerade als Grenzlinie würde beispielsweise ein Patient mit A1-42% = 9.5 noch als AD erkannt, wenn gleichzeitig sein Wert für A1-38% 13.5 beträgt, wie von der Regressionsgerade vorhergesagt (vergl. Fig. 11). Entsprechendes gilt für den weiter unten gezeigten Zusammenhang zwischen den Quotienten A1-30/A1-40 und A1-42/A1-38 (Fig. 16). Die Grenzkonzentrationen für die Differenzierung des CID-3 Kollektivs lauten: A1-38% = 15.5 und A1-42% = 9.6%. Auf diese Weise werden fälschlich sechs Patienten als CID-3 klassifiziert. Diese Patienten sind durch ihre Codierung identifiziert. Bemerkenswert ist, dass bei genauer Analyse der klinischen Befunde bei einigen dieser Patienten (3/6) retrospektiv ein chronisch-entzündlicher Prozeß wahrscheinlich wird. Fig. 12 zeigt A1-40% in Abhängigkeit von A1-42%. Eine AD-spezifische Korrelation zwischen diesen Parametern ist zwar signifikant (ohne Patient 143) aber weniger eng. Der Schweregrad der Demenz steigt in Pfeilrichtung. Die Grenzwertkonzentrationen für AD-3 sind: A1-40% = 63 und A1-42% = 8.5. Fig. 13 zeigt A1-40% in Abhängigkeit von A1-38%. Die Grenzwertlinien A1-38% = 15.5 und A1-40% = 60.0 beziehen sich auf das Kollektiv CID-3. Eine AD-spezifische Korrelation zwischen diesen Parametern ist signifikant (ohne Patient 143). Der Schweregrad der Demenz steigt in Pfeilrichtung. Die Grenzwertlinien A1-38% = 16.0 und A1-40% = 63 definieren AD-3 Patienten mit schwerer Demenz. Bemerkenswert ist hier, dass kein NDC-3 Patient oberhalb von A1-40% = 63 liegt und der Schnittpunkt dieser Grenzwertlinie mit der Regressionsgeraden, gleichzeitig die Grenzwertlinie A1-38% = 16 vorhersagt. Aus Fig. 14 wird deutlich, dass AD-3 Patienten mit A1-38% < 16.0 oder A1-40% > 63 überwiegend eine schwere Demenzausprägung zeigen (MMSE 10), andernfalls einen mittleren bis leichtgradigen Schweregrad der Demenz (MMSE > 10). Besonders ausgeprägt ist dieser Zusammenhang bei Patienten, die gleichzeitig beide Grenzwerte unter- bzw. überschreiten (Fig. 14; vergl. auch Fig. 13). Die Korrelationsmatrix für den Zusammenhang zwischen den prozentualen A-Peptidanteilen und Schweregrad der Demenz ist in Fig. 15 dargestellt. Signifikante Zusammenhänge finden sich für A1-37% und A1-40%. Auffällig ist, dass die Gruppe der carboxyterminal verkürzten A-Peptide im Gegensatz zu A1-40% positive Korrelationskoeffizienten für den letztgenannten Zusammenhang zeigt. Zwischen den absoluten Konzentrationen der A-Peptide im Liquor und dem Schweregrad der Demenz wurde kein signifikanter Zusammenhang gefunden, d.h. auch hier werden krankheitsspezifische Zusammenhänge erst bei Betrachtung der prozentualen A-Peptidanteile deutlich.

#### 4.2.2.5 Krankheitsspezifische Muster von A $\beta$ -Peptidquotienten:

Einzelfalldarstellung der Patientenkollektive Die A-Peptidquotienten A1-38/A1-40, A1-42/A1-38 und A1-42/A1-40 erlauben eine Differenzierung zwischen den Kollektiven AD-3, CID-3 und OND-3. Dies hat den Vorteil, dass jetzt nur drei A-Peptide quantifiziert werden müssen, um die drei Patientenkollektive zu differenzieren, führt aber zu einem gewissen Verlust an diagnostischer Trennschärfe. Damit bietet sich an, für die neurochemische Demenzdiagnostik und Identifizierung von Patienten mit chronisch entzündlichen ZNS-Erkrankungen ein ELISA-Triplett zu entwickeln (A1-38, A1-40, A1-42). Dieser Ansatz sollte mit einer detergentien-abhängigen Probenvorbereitung kombiniert werden (vergl. 4.2.4). Fig. 16 zeigt A1-38/A1-40 in Abhängigkeit

von A1-42/A1-38. Es besteht ein signifikanter und spezifischer Zusammenhang zwischen diesen beiden Parametern bei AD. In Richtung der Pfeilspitze der Regressionsgeraden nimmt die Schwere der Demenz zu (vergl. Fig. 18). Über die Grenzwertlinie  $A1-38/A1-40 = -0.5$  ( $A1-42/A1-38$ ) + 0.52 wird erneut Patient 143 als Ausreißer identifiziert. Die übrigen AD-3 Patienten werden korrekt klassifiziert und kein NDC-3 Patient wird fälschlich dem Kollektiv AD-3 zugeordnet. Die Grenzwertlinien  $A1-38/A1-40 = 0.26$  und  $A1-42/A1-38 = 0.57$  beziehen sich auf das CID-3 Kollektiv. Fig. 17 zeigt A1-38/A1-40 in Abhängigkeit von A1-42/A1-40. Es besteht ein signifikanter und spezifischer Zusammenhang zwischen diesen beiden Parametern bei AD. In Richtung der Pfeilspitze der Regressionsgeraden nimmt die Schwere der Demenz zu (vergl. Fig. 18). Über die Grenzwertlinie  $A1-42/A1-40 = 0.14$  werden alle AD-3 Patienten korrekt klassifiziert und kein NDC-3 Patient fälschlich der AD-3 Gruppe zugeordnet. Die Grenzwertlinien  $A1-38/A1-40 = 0.26$  und  $A1-42/A1-40 = 0.16$  beziehen sich auf das CID-3 Kollektiv. Fig. 18 macht deutlich, dass AD-3 Patienten mit einem Quotienten von A1-38/ A1-40 von weniger als 0.26 im Mittel eine schwere AD zeigen ((MMSE 10), sonst dagegen einen mittleren bis leichtgradigen Schweregrad der Demenz aufweisen (MMSE > 10).

#### 4.2.3 NDC-2KP

Die im Liquor erniedrigte Konzentration von A1-42 bei Patienten mit AD wurde bisher in zuvor bereits eingefrorenen Proben gefunden. Es wurde daher zunächst an Patienten des Kollektivs NCD-2KP untersucht, ob A1-42 im Liquor im Vergleich zu anderen A-Peptiden besonders empfindlich für Kältepräzipitation ist. In diesem Zusammenhang wurde frisch gewonnener Liquor aliquotiert. Ein Aliquot wurde unbehandelt bei -80° C eingefroren. Mit dem anderen Aliquot wurde der als Trockensubstanz in Eppendorf Probengefäßen vorgelegte SDS-SB aufgenommen. Dieses Aliquot wurde nach SDS-/Hitzenaturierung eingefroren. Mindestens 24 Stunden nach Lagerung bei -80° C erfolgte dann die vergleichende Analyse mittels A-SDS-PAGE/Immunoblot-1 und densitometrischer Filmauswertung. Es wurden zehn neuropsychiatrische Kontrollpatienten ohne Alzheimer-Demenz untersucht. Bei neun dieser Patienten konnten A1-40 und A1-42 bestimmt werden. Bei einem Patienten konnte lediglich A1-40 ausgewertet werden. Tabelle 16a macht deutlich, dass selektiv betont für A1-42 mit hoher interindividueller Varianz kältepräzipitationsbedingt ein Anteil des Peptids verloren geht. Der prozentuale Anteil von A1-42 im nativ eingefrorenen Liquor, der verloren geht, wenn die Kältepräzipitation nicht durch Vorbehandlung mit SDS-/Hitzenaturierung vermindert wird, wurde wie folgt berechnet:  $\%A1-42 = (\phi A1-42_{\text{nativ}}! \text{conc.} - \phi A1-42_{\text{SDS}}! \text{conc.}) / \phi A1-42_{\text{SDS}}! \text{conc.} \times 100$ . Ein Wert für %A1-42 von "-10" bedeutet beispielsweise, dass A1-42 durch Einfrieren von nativem Liquor kältepräzipitationsbedingt um 10% im Vergleich zur "protektiven" Vorbehandlung mit SDS-/Hitzenaturierung reduziert wurde. Da die Proben nicht vor dem Einfrieren gemessen werden konnten, kann nicht ausgeschlossen werden, dass in den Proben durch Kältepräzipitation ein zusätzlicher Anteil von A1-42 verloren geht, der auch durch die Vorbehandlung mit SDS-/Hitzenaturierung nicht verhindert werden kann. Tabelle 16b macht deutlich, dass A1-42 nach Einfrieren von nativem Liquor KP-bedingt im Mittel um etwa 30% reduziert wird ( $A42\%: -29.9 \pm 10.9$ , MW  $\pm$  SD;  $p=0.005$ ). Die maximal beobachteten absoluten und prozentualen Abfälle für A1-42 betragen -798.3 pg bzw. -44.5%. Der leichte Abfall von A1-40 ( $A40\%: -3.5 \pm 6.3$ ; MW  $\pm$  SD;  $p=n.s.$ ) ist dagegen nicht signifikant, entsprechend aber das Verhältnis A1-42/A1-40 ( $A42/40\%: -27.0 \pm 10.2$ ; MW  $\pm$  SD;  $p=0.008$ ).

#### 4.2.4 NDC-3KP und AD-3KP

Anschließend wurde anhand der Patientenkollektive NDC-3KP und AD-3KP untersucht, ob sich im Liquor krankheitsspezifische



Unterschiede in der Kältepräzipitation von A1-42 zeigen. Die Quantifizierung von A1-42 im Liquor erfolgte mittels A-SDS-PAGE/Immunoblot-2 und CCD-Kamera. Die differentielle Probenvorbehandlung erfolgte wie für das Kollektiv NDC-2KP ausgeführt. Die Konzentrationen für A1-42 in Abhängigkeit der Probenvorbehandlung sind für die beiden Patientenkollektive in Tabelle 21 zusammengefaßt. In Fig. 19 ist die Konzentrationen von A1-42 nach Einfrieren von nativem Liquor in Abhängigkeit (A1-42<sub>nativ</sub>) von der Kältepräzipitation dargestellt. Durch die Bestimmung von A1-42 im nativ eingefrorenem Liquor können die Patientenkollektive NDC-3KP und AD-3KP signifikant getrennt werden ( $p=0.0013$ ). Dennoch besteht nach Fig. 19 eine deutliche Überschneidung der beiden Patientenkollektive. Demnach haben 6/15 Patienten des NDC-3KP Kollektivs A1-42 Liquorspiegel unterhalb der Grenzkonzentration (2100 pg/ml) des AD-3KP Kollektivs. Bei zusätzlicher Berücksichtigung der Grenzkonzentration von A1-42% (-17% bis -20%) wird dagegen nur noch ein NDC-3KP Patient fälschlich dem AD-3KP Kollektiv zugeordnet. Gleichzeitig werden alle Patienten des AD-3KP Kollektivs korrekt zugeordnet. Die mittlere kältepräzipitationsbedingte Erniedrigung von A1-42 beträgt bei NDC-3KP  $-24.6\% \pm 18.8$  (MW  $\pm$  SD), was gut mit dem oben genannten Daten für die NDC-2KP Patienten übereinstimmt ( $-29.9 \pm 10.9$ , MW  $\pm$  SD). Dabei wird erneut bei den NDC-3KP Patienten eine erhebliche interindividuelle Varianz für das Ausmaß der kältepräzipitationsbedingten Erniedrigung von A1-42 im Liquor deutlich. Dabei wird das Ausmaß der kältepräzipitationsbedingten Erniedrigung von A1-42 bei NDC-3KP Patienten anscheinend wesentlich durch das Vorliegen des ApoE 4 Allels bestimmt: Von den 4 Patienten mit der höchsten KP-bedingten Erniedrigung von A1-42 (A1-42% < -40%) tragen 3 Patienten ein ApoE 4 Allel (vergl. Fig. 19) AD Patienten zeigen dagegen keine nennenswerte kältepräzipitationsbedingte Erniedrigung von A1-42 und aus Fig. 19 geht hervor, dass die %A1-42 Werte hier um die Null-Achse streuen ( $-1.6 \pm 10.2$ , MW  $\pm$  SD). Entsprechend ist der Gruppenvergleich NDC-3KP versus AD-3KP für A1-42% signifikant ( $p=0.0025$ ). Bemerkenswert ist, dass die KP-bedingte Erniedrigung von A1-42 bei AD-3KP fehlt, obwohl 9/11 Patienten 4-positiv sind. Bei zwei AD-3KP Patienten ist der ApoE Genotypus nicht bekannt. Weiter fällt auf, dass AD-3KP und NDC-3KP Patienten mit mindestens einem 4 Allel etwa gleich tiefe A1-42 Liquorspiegel haben. Dieser Zusammenhang wurde weiter oben auch bei dem Vergleich der A1-42 Liquorspiegel der Kollektive OND-34plus und AD-34plus deutlich (vergl. 4.2.2.3). Gleichzeitig unterscheiden sich diese beiden Patientenuntergruppen besonders deutlich in ihrer KP-bedingten Erniedrigung von A1-42. Diese ist besonders stark bei den 4-positiven NDC-3KP Patienten und fehlt fast vollständig bei den 4-positiven AD-3KP Patienten. Demnach haben die 4-positiven Patienten aus dem AD-3KP Kollektiv im Gegensatz zu den 4-positiven Patienten aus dem NDC-3KP Kollektiv tiefe Liquorspiegel von A1-42 trotz "protektiver" SDS-/Hitzedenaturierung vor dem Einfrieren. Entsprechend sollten sich die beiden Patientenkollektive AD-3KP und NDC-3KP nach Vorbehandlung mit SDS-/Hitzedenaturierung über die Bestimmung von A1-42 im Liquor (A1-42<sub>SDS</sub>) wesentlich besser differenzieren lassen. Fig. 20 bestätigt diese Annahme: Die KP-bedingte Erniedrigung von A1-42 wird um den Anteil vermindert, der durch die "protektive" SDS-/Hitzedenaturierung verhindert werden kann, wodurch die NDC-3KP Patienten jetzt im Mittel deutlich höhere A1-42 Liquorspiegel (A1-42<sub>SDS</sub>) haben. Die A1-42 Liquorspiegel bei AD-3KP bleiben dagegen weitgehend unverändert tief. Entsprechend verbessert sich das Signifikanzniveau des Gruppenvergleichs NDC-3KP versus AD-3KP bei Differenzierung der

Kollektive über A1-42SDS deutlich ( $p=1.81 \times 10^{-6}$ ). Alle NDC Patienten (15/15) und nur ein AD Patient (1/11) liegen jetzt oberhalb der Grenzkonzentration von A1-42SDS = 2100 pg/ml. Wie oben ausgeführt, ist dieser Effekt bei den Trägern von 4 Allelen innerhalb des NDC-3KP Kollektivs besonders stark ausgeprägt. Fig. 19 und 20 machen aber deutlich, dass dieser Effekt nicht ausschließlich über das Vorliegen des 4 Allels bestimmt wird. Einzelne Patienten mit beispielsweise dem ApoE Genotypus 3/3 zeigen gleichfalls eine ausgeprägte KP-bedingte Erniedrigung von A1-42, die durch SDS-/Hitzedenaturierung vor dem Einfrieren vermindert werden kann.

Zusammenfassend lassen sich folgende A-Peptidgrenzwerte angeben: A1-42nativ = 2100 pg/ml & %A1-42 = -17%: Alle AD Patienten (11/11) werden richtig und ein NDC-Patient (1/15) wird falsch klassifiziert. A1-42nativ = 2300 pg/ml & %A1-42 = -20%: Alle AD Patienten (11/11) werden richtig und zwei NDC-Patienten (2/15) werden falsch klassifiziert. Und A1-42SDS = 2100 pg/ml & %A1-42 = -17%: 10/11 AD-3KP Patienten werden richtig und kein NDC-3KP Patient (0/15) wird falsch klassifiziert. A1-42SDS = 2300 pg/ml & %A1-42 = -20%: Alle AD Patienten (11/11) werden richtig und zwei NDC-Patienten (2/15) werden falsch klassifiziert. Die Bestimmung von %A1-42 zusätzlich zu A1-42SDS wird voraussichtlich die neurochemische AD-Diagnostik weiter verbessern: Bei einem A1-42SDS Grenzwert von 2300 pg/ml statt 2100 pg/ml werden drei NDC Patienten (3/15) falsch und alle AD Patienten korrekt klassifiziert. Wird zusätzlich der Grenzwert %A1-42 = -20% berücksichtigt, werden nur zwei NDC Patienten (2/15) falsch und alle AD Patienten korrekt klassifiziert. Damit kann die A1-42SDS Schwellenkonzentration um 200 pg/ml steigen, ohne dass sich gleichzeitig die diagnostische Spezifität verringert. Zusammenfassend können aus den oben genannten Befunden zur KP-bedingten Erniedrigung von A-Peptiden folgende Hypothesen abgeleitet werden: A1-42 liegt im humanen Liquor im Vergleich zu A1-40 vermehrt in einer Fraktion vor, die KP-abhängig reduziert werden kann. Durch Einsatz von Detergentien kann A1-42 zumindest partiell aus dieser Fraktion freigesetzt werden und die KP-bedingte Erniedrigung reduziert werden. Bei dieser A1-42 bindenden Fraktion handelt es sich wahrscheinlich um vergleichsweise hydrophobe höhermolekulare Komplexe unter Beteiligung von A1-42 und wahrscheinlich anderer Proteine (z.B. Lipoproteine). (Anmerkung: Durch Analyse von Fraktionen aus der Gelfiltration (SEC-FPLC) von humanem Liquor mittels A-SDS-PAGE/Immunoblot konnte gezeigt werden, dass selektiv betont für A1-42 ein beträchtlicher Anteil in einer hochmolekularen Fraktion transportiert wird). Bei AD - im Gegensatz zu NDC- lässt sich A1-42 auch durch starke Detergentien kaum aus dieser Fraktion verdrängen, was auf eine AD-spezifische Zusammensetzung dieses Komplexes hinweist. In diesem Fall wäre zu erwarten, dass A1-42 im Liquor bei AD auch dann spezifisch erniedrigt wäre, wenn die Proben nach Detergentienbehandlung direkt gemessen würden, d.h. ohne vorheriges Einfrieren. Damit könnten die Proben nach Detergentienbehandlung bei Raumtemperatur in Anwesenheit von SDS und Proteaseinhibitoren (3.1.3.1b, SDS-SB-3) bis zur Messung gelagert werden, da diese sehr effektiv vor Autoaggregation, Präzipitation, unspezifischer Proteaseaktivität und Keimbesiedlung geschützt wären. Alternativ kann angenommen werden, dass die Erniedrigung von A1-42 bei AD im wesentlichen dadurch bedingt ist, dass der Liquor bei AD insgesamt weniger A1-42 enthält. Bei hochaffiner detergentien-stabiler Bindung von A1-42 an einen Komplex wird das Peptid in dieser Bindung vermehrt dem enzymatischem Katabolismus entzogen. Damit stellt dieser Komplexes auch ein Target für die Entwicklung von Medikamenten gegen die Alzheimer-Demenz dar, da

Substanzen die mit der Bindung von A-Peptiden an diesen Komplex konkurrieren, A-Peptide vermehrt dem enzymatischen Katabolismus zuführen könnten. Die Reduktion von A1-42 im Liquor bei einem Teil der Patienten mit Creutzfeldt-Jakob-Demenz, einer weiteren Amyloidose oder Proteinfaltungskrankheit des ZNS, legt nahe, dass dieser Komplex bei beiden Erkrankungen ein vergleichbare Zusammensetzung aufweisen könnte. Die oben genannten Befunde sind auch für die Frühdiagnostik oder präklinische Diagnostik der AD relevant. Hier stellt sich die Frage, ob Patienten, die trotz "protektiver" SDS-/Hitzenaturierung (A1-42SDS) tiefe A1-42 Liquorspiegel zeigen und gleichzeitig durch eine geringe KP-bedingte Abnahme von A1-42 (A1-42%) auffallen, ein besonders hohes Risiko für die Entwicklung einer AD tragen. Diese Fragestellung könnte durch eine prospektive Untersuchung bei Patienten mit leichten kognitiven Störungen (ICD10 F06.7) beantwortet werden, da diese Patienten in bis zu 30% der Fälle innerhalb von zwei Jahren eine AD entwickeln. Hier wäre eine einmalige Liquorpunktion mit anschließender Verlaufsbeurteilung (Klinik, Neuropsychologie, Bildgebung) ausreichend, da der prädiktive Wert der Parameter retrospektiv bestimmt werden könnte. Damit liegt nahe, prinzipiell bei jedem Patienten ein A- (nativ eingefroren) und B-Aliquot (SDS-/Hitzenaturierung vor dem Einfrieren) der Liquorprobe zu gewinnen. Gegebenenfalls reicht es aus, die Proben unter Kontrolle der Temperatur der individuellen Probe standardisiert auf beispielsweise 0° C abzukühlen. Allgemein wird man die oben dargestellte differentielle Probenvorbereitung auch mit ELISA-Methoden oder Einsatz der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) für die Bestimmung von A1-42 im Liquor kombinieren können. Die Nachweisempfindlichkeit des ELISA der Firma BioSource für die Bestimmung von A1-42 im humanen Liquor liegt beispielsweise bei 10 pg/ml. Diese Nachweisempfindlichkeit erlaubt bei Auftrag von 100 µl Probe, den SDS-/Hitzenaturierten Liquor vor der Messung mindestens fünfmal zu verdünnen. Die resultierende Konzentration von 0.1% SDS (w/v) beeinträchtigt nach eigenen Ergebnissen nicht die in diesem ELISA im ersten Schritt verwendeten N-terminalen Fangantikörper. Analog kann dies auch für die innerhalb der RIPA-IP eingesetzten N-terminal selektiven Antikörper 1E8 und 6E10 belegt werden. Bei der FCS mit Kreuzkorrelation unter Verwendung von Fluoreszenz-markierten N-terminal und C-terminal selektiven Antikörpern ist die Signalintensität proportional der innerhalb solcher Aggregate gebundenen A-Peptide. Die Sensitivität der Methodik erlaubt auch hier eine Verdünnung der Probe nach SDS-/Hitzenaturierung auf SDS-Konzentrationen von beispielsweise 0.1% w/v. Sollte A1-42 selektiv bei AD detergentien-stabil an höhermolekulare Aggregate gebunden vorliegen wird durch Vorbehandlung der Liquorproben mit Detergentien die Spezifität der Messung erhöht, da die A-Peptide bei den NDC Patienten im Gegensatz zu den AD Patienten aus den höhermolekularen Aggregaten freigesetzt werden. Die verminderte Reduktion des Fluoreszenzsignals der FCS (Kreuzkorrelation) nach Detergentienbehandlung bei Patienten mit AD im Vergleich zu Patienten mit NDC könnte damit für die neurochemische AD Diagnostik relevant werden.

#### 4.2.5 Hirnhomogenate von Patienten mit AD, frontotemporaler Demenz, Lewy-Körperchen-Demenz und Kontrollen

Hirngewebe (frontotemporaler Cortex, Cerebellum) von Patienten mit AD, frontotemporaler Demenz (FTD), Lewy-Körperchen-Demenz (LBD) und nicht-dementen Kontrollen wurde in Anwesenheit von RIPA Detergenzienpuffer homogenisiert (3.4.6). Anschließend wurde eine Immunopräzipitation in Anwesenheit von RIPA durchgeführt. In der RIPA-Detergenz extrahierbaren Fraktion der A-Peptide ließen sich A1-38, A1-40, A1-42 und

A2-42 nachweisen (Fig. 21a,b). A2-42 wurde durch MALDI-TOF Analyse direkt von der Blotmembran (Daten nicht gezeigt), A-SDS-PAGE/Immunoblot-2 (Fig. 23b) und A-IPG-2D-PAGE/Immunoblot-2 (Fig. 24c) identifiziert. A2-42 wird auch in Liquorproben bei AD (Fig. 23a) und in Zellkulturüberständen nachgewiesen (Fig. 23a, Fig. 28a,b). Patienten mit AD waren im Vergleich zu nicht-dementen Kontrollen und Patienten mit FTD durch einen massiven Anstieg von A1-42 und A2-42 gekennzeichnet. Dieser Anstieg war im frontotemporalen Kortex weitaus ausgeprägter als im Zerebellum (Fig. 22). Patienten mit LBD zeigten Anstiege von A1-42 und A2-42 in Abhängigkeit der Anzahl zusätzlich vorliegender Alzheimer-typischer -Amyloidplaques, die über die CERAD Klassifikation erfasst werden (Fig. 21b): Patienten mit LBD CERAD A hatten deutlich weniger A1-42 und A2-42 als Patienten mit LBD CERAD C. Bei Alzheimer-Demenz fielen vergleichsweise hohe Konzentrationen von A1-38 auf (Fig. 21a,b). Gleichzeitig war eine gewebspezifische Expression von A1-38 bei AD auffällig, da im Zerebellum relativ zum frontotemporalen Kortex A1-38 deutlich geringer war oder nicht nachweisbar war und zusätzlich bei einigen Patienten eine bisher nicht charakterisierte Bande unterhalb von A1-38 meßbar wurde (Fig. 22). Da der carboxyterminale Schnitt durch -Sekretase(n) erfolgt, ergibt sich damit ein Hinweis auf eine ggf. gewebspezifisch unterschiedliche Expression von -Sekretase(n). Da sich im Zerebellum im Vergleich zu anderen Hirnregionen bei AD bekanntlich wenig Alzheimer-typische neuropathologische Veränderungen zeigen, könnte dieser Befund pathophysiologisch relevant sein. Die extrem hohen Konzentrationen von A2-42, zum Teil in Höhe von A1-42, in einer RIPA-etrahierbaren Hirnpräparation wurde bisher nicht beschrieben. Bei einigen Patienten war zusätzlich A1-40 vergleichsweise stark erhöht. Damit kann der A-SDS-PAGE/Immunoblot für die neuropathologische Differentialdiagnostik dementieller Erkrankungen eingesetzt werden und ggf. über eine biochemische Phänotypisierung zur Differenzierung von Subgruppen der sporadischen AD beitragen.

#### 4.3 Cisternaler Liquor von Kaninchen und Meerschweinchen.

Auch im cisternalen Liquor des adulten Meerschweinchens (Fig. 25a) und Kaninchens (Fig. 25b) sind A1-37/38/39 neben A1-40 und A1-42 nachweisbar. Die Varianz der Meßwerte wird deutlich reduziert, wenn analog zu den Patientenproben vor dem Einfrieren der Proben die SDS-/Hitzedenaturierung durchgeführt wird. Diese Probenvorbehandlung ist für Wirkstofffindungsprojekte unter Einsatz von Meerschweinchen oder Kaninchen als Tiermodell relevant, da bestimmte Substanzeffekte (z.B. Sekretaseinhibition) auf diese Weise schon mit deutlich weniger Tieren pro Behandlungs- und Kontrollgruppe nachgewiesen werden können.

#### 4.4 Hippokampale Gewebeschnitte des adulten Meerschweinchens mit Kurzzeitkultur

In Kurzzeitkulturen hippokampaler Gewebeschnitte des adulten Meerschweinchens werden A1-37/38/39 neben A1-40 und A1-42 in den Überstand sezerniert und sind auch intrazellulär nachweisbar (Fig. 26).

#### 4.5 Zellkultur

##### 4.5.1 Primäre telencephale Hühnchenkultur

Da die A-Peptid Aminosäuresequenz des Hühnchens und die humane Sequenz übereinstimmen, wurde ein primär neuronales Zellkultursystem aus den Vorderhinbläschen von Hühnerembryonen etabliert (vergl. 3.7). Dabei ergab sich, dass neben A1-40 und A1-42 die C-terminal verkürzten A-Peptide 1-37/38/39 in die Zellkulturüberstände freigesetzt werden, und die relative Verteilung der A-Peptide gut mit der im humanen Liquor übereinstimmt.

##### 4.5.2 Transgene APP751Sw Neuroglioma Zelllinie

Vergleichend wurde das A-Peptidmuster in Neuroglioma-Zellen (H4) untersucht, die mit humanAPP751Sw transfiziert wurden. Fig. 28a&b zeigt, dass auch hier neben A1-40 und A1-42, die C-terminal verkürzten A-

Peptide 1-37/38/39 in die Zellkulturüberstände freigesetzt werden. Zusätzlich kann A2-42 identifiziert werden. Nach Behandlung mit Inhibitoren der  $\gamma$ -Sekretasen (Calpain-Inhibitor I&II, Calpeptin, MG132, Leupeptin) werden neben A1-40 und A1-42 auch die C-terminal verkürzten A-Peptide 1-37/38/39 und das N-terminal verkürzte A2-42 reduziert (Fig. 28a,b). Fig. 28b zeigt die dosisabhängige Reduktion unter Calpaininhibitor-1. Entsprechend kann angenommen werden, dass die A-Peptide 1-37/38/39, wie für 1-40/42 bekannt, auch durch den kombinierten  $\gamma$ -Sekretaseschnitt entstehen. Die Reduktion von 2-42 kann durch Hemmung von  $\gamma$ -Sekretaseaktivität bedingt sein, oder durch vermindertes Substratangebot (A1-42) für eine nachgeschaltete N-terminale Aminopeptidase (siehe aber unten). Aus Fig. 29a&b geht hervor, dass die C-terminal verkürzten A-Peptide 1-37, 1-38 und 1-39 mit einer anderen Kinetik gehemmt werden als A1-40 und A1-42. Der Unterschied in der Kinetik ist besonders ausgeprägt für A1-37. Dieser Befund zeigt an, dass über das A-Peptidmuster eine Heterogenität der  $\gamma$ -Sekretaseaktivität abgebildet werden kann, was für die Wirkstofffindung selektiver  $\gamma$ -Sekretaseinhibitoren relevant ist. Weiter ist bemerkenswert, dass der aus der Literatur bekannte paradoxe Anstieg von A1-42 bei niedrigen Inhibitorkonzentrationen nicht mit einem Anstieg von A2-42 korreliert ist. Dies spricht gegen eine sekundäre Entstehung von A2-42 aus A1-42. Für die Entstehung von A1-37 muß eine weitere Alternative berücksichtigt werden. Kürzlich wurde beschrieben, dass die Neutrale Endopeptidase (NEP) durch den kombinierten Schnitt 10/11 und 37/38 am Katabolismus von A-Peptiden wesentlich beteiligt ist (Iwata et al., 2000). Damit könnte A1-37 auch durch die Kombination BACE-Schnitt und NEP-Schnitt 37/38 entstehen. Liste der Abkürzungen :A- -Amyloid AD- Alzheimer Demenz APP- Amyloidvorläuferprotein FAD- familiäre AD, d.h. genetisch bedingt PS-1- Presenilin 1 PS-2- Presenilin 2, Bis- N, N'-Methylenbisacrylamide Bicin- N,N'-bis- $\phi$ 2-Hydroxyethyl-Glycin %T- Gesamtacrylamid Monomer Konzentration (w/v) %C- Anteil von Bis an der Gesamtmenge des Acrylamid Monomers(w/w) A-SDS-PAGE- -Amyloid Natrium Laurylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese A-2D-PAGE- -Amyloid-zweidimensionale-Polyacrylamidgelelektrophorese IPG- immobilisierter pH Gradient A1-n- A1-n5. LiteraturGörg A., Boguth G., Obermaier C., Posch A. and Weiss W. (1995) Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (IPG-Dalt): the state of the art and the controversy of vertical versus horizontal systems. *Electrophoresis* 16, 1079-86. Görg A., Obermaier C., Boguth G., Csordas A., Diaz J.J. and Madjar J.J. (1997) Very alkaline immobilized pH gradients for two-dimensional electrophoresis of ribosomal and nuclear proteins. *Electrophoresis* 18, 328-37. Heukeshoven J. and Dernick R. (1988) Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* 9, 28-32. Hulstaert F., Blennow K., Ivanoiu A., Schoonderwaldt H.C., Riemenschneider M., De Deyn P.P., Bancher C., Cras P., Wiltfang J., Mehta P.D., Iqbal K., Pottel H., Vanmechelen E. and Vanderstichele H. (1999) Improved discrimination of AD patients using beta-amyloid(1-42) and tau levels in CSF. *Neurology* 52, 1555-62. Ida N., Hartmann T., Pantel J., Schroder J., Zeffass R., Forstl H., Sandbrink R., Masters C.L. and Beyreuther K. (1996) Analysis of heterogeneous A4 peptides in human cerebrospinal fluid and blood by a newly developed sensitive Western blot assay. *J Biol Chem* 271, 22908-14. Klafki H., Abramowski D., Swoboda R., Paganetti P.A. and Staufenbiel M. (1996) The carboxyl termini of beta-amyloid peptides 1-40 and 1-42 are generated by distinct gamma-secretase activities. *J Biol Chem* 271, 28655-9. Klafki H.W.,

Wiltfang J. and Staufenbiel M. (1996) Electrophoretic separation of betaA4 peptides (1-40) and (1-42). *Anal Biochem* 237, 24-9. Kuo Y.M., Emmerling M.R., Woods A.S., Cotter R.J. and Roher A.E. (1997) Isolation, chemical characterization, and quantitation of A beta 3- pyroglutamyl peptide from neuritic plaques and vascular amyloid deposits. *Biochem Biophys Res Commun* 237, 188-91. Laemmli U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685. McKhann G., Drachman D., Folstein M., Katzman R., Price D. and Stadlan E.M. (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 34, 939-44. Metz C.E. (1978) Basic principles of ROC analysis. *Semin Nucl Med* 8, 283-98. O'Farrell P., Goodman H. and O'Farrell P. (1977) High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* 12, 1133-41. O'Farrell P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250, 4007-21. Righetti P.G. and Bossi A. (1997) Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: recent analytical and preparative developments. *Anal Biochem* 247, 1-10. Russo C., Saido T.C., DeBusk L.M., Tabaton M., Gambetti P. and Teller J.K. (1997) Heterogeneity of water-soluble amyloid beta-peptide in Alzheimer's disease and Down's syndrome brains. *FEBS Lett* 409, 411-6. Schagger H. and von Jagow G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166, 368-79. Tamaoka A., Sawamura N., Fukushima T., Shoji S., Matsubara E., Shoji M., Hirai S., Furiya Y., Endoh R. and Mori H. (1997) Amyloid beta protein 42(43) in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 148, 41-5. Thome J., Kornhuber J., Munch G., Schinzel R., Taneli Y., Zielke B., Rosler M. and Riederer P. (1996) A new hypothesis on etiopathogenesis of Alzheimer syndrome. Advanced glycation end products (AGEs)!. *Nervenarzt* 67, 924-9. Thome J. M.G., Schinzel R., Kornhuber J., Blum-Degen D., Sitzmann L., Rösler M., Heidland A., Riederer P. (1996) Advanced glycation endproducts- associated parameters in the peripheral blood of patients with Alzheimer's disease. *Life Sci.* 59, 679-685. Wiltfang J., Arold N. and Neuhoff V. (1991) A new multiphasic buffer system for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of proteins and peptides with molecular masses 100,000-1000, and their detection with picomolar sensitivity. *Electrophoresis* 12, 352-66. Wiltfang J., Smirnov A., Schnierstein B., Kelemen G., Matthies U., Klafki H.W., Staufenbiel M., Huther G., Ruther E. and Kornhuber J. (1997) Improved electrophoretic separation and immunoblotting of beta-amyloid (A beta) peptides 1-40, 1-42, and 1-43. *Electrophoresis* 18, 527-32. Wiltfang J., Otto M., Ruther E., Kornhuber J. (1998) Klinisch-chemische Früh- und Differentialdiagnostik der Alzheimer Demenz, *psycho* 24, 726-31. Wiltfang J., Esselmann H., Smirnov A., Maler M.J., Bleich S., Otto M., Bibl M., Ruther E., Kornhuber J. (2000) Therapieansätze in der Alzheimer-Demenz, *Notfallmedizin* 26, 246-51. Zusammenstellung der Kollektive mit Schnittmengen gemeinsamer Patienten. NDC-3KP ist vollständig Teilkollektiv von NDC-3. AD-3KP ist weitgehend Teilkollektiv von AD-3

Tabelle 5a) NDC1 (n=30) NDC-2KP (n=10) Schnittmenge (n=2): NP55, NP57 Tabelle 5b) NDC-3 (n=47) NDC-3KP (n=15; Teilmenge von NDC-3) Schnittmenge (n=15): NP213, NP344, NP345, NP352, NP355, NP356, NP364, NP374, NP402, NP412, NP419, NP421, NP457, NP490, NP 526 Tabelle 5c) AD-1 (n=35) AD-3 (n=12) Schnittmenge (n=3): NP37, NP52, NP66 AD-3KP (n=11) Schnittmenge (n=3): NP52, NP66, NP69 Tabelle 5d) AD-3 (n=12) AD-3KP (n=11; Schnittmenge plus

NP69/NP197) Schnittmenge ( $n=9$ ): NP45, NP52, NP58, NP66, NP111, NP143, NP190, NP319, NP320

简体中文网页