

Aus dem Institut für Pathobiochemie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Charakterisierung verschiedener monoklonaler Antikörper zur
Immunodetektion der Metalloprotease Meprin β im Gehirn**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von
Lukas Donald Schmülling
aus Recklinghausen

Mainz, 2026

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Philipp Drees

Tag der Promotion: 29. Mai 2026

Nachnutzungslizenz:

- Namensnennung, Weitergabe unter gleichen Bedingungen (CC-BY-SA-4.0)

Inhaltverzeichnis

I.	Abkürzungsverzeichnis	9
II.	Abbildungsverzeichnis	11
III.	Tabellenverzeichnis	12
1.	Einleitung und Zielsetzung	13
2.	Literaturdiskussion	14
2.1	Die Alzheimer Erkrankung	14
2.1.1	Epidiologie	14
2.1.2	Risikofaktoren	15
2.1.3	Protektive Faktoren	17
2.1.3	Genetische Faktoren	18
2.1.4	Pathophysiologie und Klinik	18
2.1.4.1	Extrazelluläre A β -Plaques	19
2.1.4.2	Tauopathie	19
2.1.4.3	Neurodegeneration	20
2.1.5	Diagnostik	21
2.1.5.1	Klinische Diagnostik	21
2.1.5.2	Laborchemische Diagnoseverfahren	22
2.1.5.3	Bildgebende Verfahren	23
2.1.6	Therapie	23
2.2	Die Prozessierung des Amyloid Precursor Protein (APP)	24
2.2.1	Synthese	25
2.2.2	Struktur	25
2.2.3	Prozessierung	26
2.3.	Die Metalloprotease Meprin β	27
2.3.1	Molekulare Struktur von Meprin β	27
2.3.2	Meprin β und das Amloid Precursor Protein (APP)	28
2.3.3	Physiologische Funktionen	29
2.3.4	Regulation	31
2.4	Monoklonale Antikörper	32
2.4.1	Molekulare Struktur und physiologischer Hintergrund	33
2.4.2	Herstellung monoklonaler Antikörper	33
3.	Material	35

3.1 Eukaryotische Zellen	35
3.2 Plasmide	35
3.2.1 Expressionsplasmide zur Zelltransfektion	35
3.3 Antikörper	35
3.3.1 Primäre Antikörper	35
3.3.2 Sekundäre Antikörper	36
3.4 Reagenzien	36
3.4.1 Chemikalien	36
3.4.2 Zellkulturmedium	37
3.4.3 Antibiotika	37
3.4.4 Reagenzienzusätze (Kits)	37
3.5 Software	37
3.6 Geräte und Laborhilfsmittel	37
3.7 Verbrauchsmaterialien	38
3.8 Puffer und Lösungen	39
3.8.1 Lösungen und Medien für die Zellkultur	39
3.8.2 Puffer und Lösungen für die Polyakrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot	39
3.8.2 Puffer und Lösungen für die Proteinbiochemie	40
4. Methoden	42
4.1 Zellbiologische Methoden	42
4.1.1 Kultur eukaryotischer Zellen	42
4.1.1.1 Auftauen und Kulturanlage von eukaryotischen Zellen nach Lagerung in flüssigem Stickstoff	42
4.1.1.2 Passagieren von eukaryotischen Zellen	43
4.1.1.3 Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen	44
4.1.1.4 Bestimmung der Zellzahl in einer Kultur mithilfe der Neubauerkammer	45
4.2 Proteinbiochemische Methoden	46
4.2.1 Zelllyse	46
4.2.2 Herstellung von Gewebelysaten aus Niere und Gehirn von Mäusen	47
4.2.3 Proteinkonzentrationsbestimmung	47
4.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	49
4.2.4.1 Gießen von Polyacrylamidgelen	49
4.2.4.2 Probenvorbereitung für die SDS-Gelelektrophorese	51

4.2.4.3 SDS-Gelelektrophorese	51
4.2.5 Westernblotanalyse	52
4.2.5.1 Western Blot und Naß-Blot-Verfahren	52
4.2.5.2 Anfärben der Proteine mit Ponceau S	52
4.2.5.3 Blockierung unspezifischer Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran	53
4.2.5.4 Immunodetektion	54
4.2.5.5 Chemiluminiszenznachweis	55
4.3 Molekularbiologische Methoden	56
4.3.1 Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen	56
5. Ergebnisse	59
5.1. Bindungsfähigkeit der Antikörper an Meprin β	59
5.2 Einzelergebnisse der monoklonalen Einzelzellklone im Western Blot	62
5.2.1 8D5	62
5.2.2 19F5	62
5.2.3 7D10	63
5.2.4 18A6	63
5.2.5 17E7	64
5.2.6 9BP	64
5.2.7 6H11	65
5.2.8 1YFS	65
5.2.9 7D2	66
5.2.10 10G12	66
5.2.11 7H1	67
5.2.12 8E3	67
5.2.13 2C3	68
5.2.14 19DS	68
5.2.15 12F9	69
5.2.16 6E7	69
5.2.17 18C7	70
5.2.18 16D4	70
5.2.19 14D5	71
5.2.20 21FS	71
5.2.21 9G3	72

5.2.22 1SE4	72
6. Diskussion	73
7. Zusammenfassung	75
8. Literaturverzeichnis	77
Lebenslauf	110

I. Abkürzungsverzeichnis

°C *Grad Celsius*
μl *Mikroliter, Mikromliter*
AD *Alzheimer Demenz*
ADAM *A Disintegrin and Metalloprotease*
AMWF *Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften*
APLP *Amyloid Precursor Protein like Protein*
ApoE *Apolipoprotein E*
APOE-ε4 *Apolipoprotein epsilon 4*
APP *Amyloid Precursor Protein*
APPswe *Amyloid Precursor protein swedish wildtyp*
APS *Ammoniumpersulfat*
Aβ *Amyloid Beta*
BACE1 *Beta-Site Amyloid Precursor Protein Cleaving Enzyme 1*
BCA *Bicinchoninsäure*
BSA *Bovinen Serumalbumin*
CRP *C-reaktives Protein*
CSF *Cerebrospinal Fluid*
CT *Computer Tomographie*
Cu *Kupfer*
CuBR *Copper Binding Region*
CuSO₄ *Kupfersulfat*
DMEM *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DNA *Desoxyribonukleinsäure*
DSMO *Dimethylsulfoxid*
EDTA *Ethylendiamintetraessigsäure*
ER *Endoplasmatisches Reticulum*
Fab *Antigen Binding Fragment*
Fc Region *Fragent crytallizable*
FCS *fetales Kälber Serum*
FDP-PET *Fluordesoxyglukose Positronen Emissions Tomographie*
GFLD *growth-factor-like-domain*
GLP-1 *Glucagon-Like-Peptide 1*
GTN *trans Golgi Netzwerk*
h *Stunde*
H₂Odd *doppelt destiliertes Wasser*
HAT Medium *Hypoxantin, Aminopterin, Thymidin Medium*
HEK *Human Embryonal Kidney Cells*
IL-6 *Interleukin 6*
IQWiG *Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen*
KCl *Kalium Chlorid*
kDa *kilo Dalton*
KH₂PO₄ *Kaliumhydrogenphosphat*
KPI *Kunitz-Protease-Inhibitor*
LRP1-Rezeptor *Low-Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1*

mAb *monoclonal antibody*
MCI *Mild Cognitive Impairment*
ml *Mililiter*
mm *Milimeter*
mM *milimol*
MMST *Mini-Mental-Staging-Test*
mRNA *messenger Ribonucleinsäure*
MRT *Magnet Resonanz Tomographie*
NaH₂PO₄ *Natriumhydrogenphosphat*
NaN₃ *Natriumazid*
nm *Nanometer*
NMDA-Rezeptor *N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor*
PBS *Phosphat gepufferte Salzlösung*
PEG *Polyethylenglykol*
PEI *Polyethylenimin*
PET *Positronen Emissions Tomographie*
RIP *Intramembranöse Proteolyse*
RIPA *Radioimmunoprecipitation assay buffer*
SDS *Sodium dodecyl Sulfat*
SDS-PAGE *Natriumdodesulfat-Polyacrylamidelektrophorese*
SNAP25 *Synaptosom-Associated Protein 25*
SYT1 *Synaptogamin*
TBS-T *Tris gepufferte Salzlösung*
TEMED *N,N,N',N'-Tetramethyldiamin*
TNF α *Tumor Nekrose Faktor alpha*
V *Volt*
z.B. *zum Beispiel*

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematische Struktur von Meprin beta, abgewandelt von Areolas et al 2012	28
Abbildung 2 potenzielle Schnittstellen von Meprin β am APP-Protein nach Jefferson et al 2011 abgeändert	29
Abbildung 3 beispielhafte Poncau S Färbung.....	53
Abbildung 4 WesternBlot zur Kontrolle der Transfektion mit Meprin β	58
Abbildung 5 Loadingskontrolle zur Feststellung der Konzentrationsgleichheit der Proben.....	58
Abbildung 6 Western Blot des mAb 8D5	62
Abbildung 7 Western Blot des mAb 19F5.....	62
Abbildung 8 Western Blot des mAb 7D10	63
Abbildung 9 Western Blot des mAb 18A6	63
Abbildung 10 Western Blot des mAb 17E7	64
Abbildung 11 Western Blot des mAb 9BP	64
Abbildung 12 Western Blot des mAb 6H11	65
Abbildung 13 Western Blot des mAb 1YFS.....	65
Abbildung 14 Western Blot des mAb 7D2	66
Abbildung 15 Western Blot des mAb 10G12	66
Abbildung 16 Western Blot des mAb 7H1	67
Abbildung 17 Western Blot des mAb 8E3	67
Abbildung 18 Western Blot des mAb 2C3	68
Abbildung 19 Western Blot des mAb 19DS.....	68
Abbildung 20 Western Blot des mAb 12F9.....	69
Abbildung 21 Western Blot des mAb 6E7	69
Abbildung 22 Western Blot des mAb 18C7	70
Abbildung 23 Western Blot des mAb 16D4	70
Abbildung 24 Western Blot des mAb 14D5	71
Abbildung 25 Western Blot des mAb 21FS	71
Abbildung 26 Western Blot des mAb 9G3	72
Abbildung 27 Western Blot des mAb 1SE4	72

III. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Liste der verwendeten primären Antikörper	36
Tab. 2: Liste der verwendeten sekundären Antikörper	37
Tab. 3: Pipettierschema zur Herstellung des BSA Ansatzes	49
Tab. 4: Pipettierschema für Trenngele	51
Tab. 5: Pipettierschema für Sammelgele	52
Tab. 6: Zusammenfassung der Testergebnisse der Einzelzellklone	63

1. Einleitung und Zielsetzung

Die Alzheimer Erkrankung stellt nach wie vor eine Herausforderung für den klinischen Alltag und die Grundlagenforschung dar.

Die neurodegenerative Erkrankung, welche zur Gruppe der Amyloidosen gezählt wird, entwickelt sich durch die Ablagerung intracerebraler Plaques im Gehirn, bestehend aus dem Amyloid beta (A β). Für deren Entstehung bietet die Amyloid Hypothese nach Selkoe einen Erklärungsansatz (Selkoe und Hardy 2016). Bis heute ist kein kurativer Therapieansatz bekannt.

Es ist bekannt, dass die β -Sekretase BACE1 A β aus dem Amyloid-Precursor-Protein (APP) am N-terminalen Ende herausschneidet und damit ursächlich für die Bildung der A β -Spezies mit einer Länge von 1-40 (A β 1-40) Aminosäuren ist.

Es zeigte sich jedoch, dass neben der, durch BACE1 gebildeten, A β -Molekülen noch andere A β -Spezies, beginnend mit Alanin an der zweiten Stelle (A β 2-40), im Liquor von Alzheimerpatienten gefunden werden konnten, deren Entstehung nicht auf die Aktivität von BACE1 zurückzuführen ist. Es konnte gezeigt werden, dass die Metalloprotease Meprin β nicht nur eine alternative Beta-Sekretase für APP darstellt (Becker-Pauly und Pietrzik 2016), sondern auch, dass sie für die Bildung von A β (2-40/42) verantwortlich ist, sowie A β (1-40) zu generieren (Bien et al. 2012).

Da Meprin β in der Lage ist A β (2-40/42) aus APP zu generieren, liegt die Vermutung nah, dass die Zinkprotease auch eine Rolle in der Pathogenese der Alzheimer Erkrankung spielt. Vorherige Untersuchungen belegen eine Expression von Meprin β auf mRNA Ebene im Gehirn (Bien et al. 2012). Ein direkter Nachweis des Proteins mithilfe eines monoklonalen Antikörpers in der Immunfluoreszenz gelang bisweilen jedoch nicht.

Um Meprin β im Gehirn nachweisen zu können, wurden mit Hilfe von Professor Doktor [REDACTED] von der Universität Düsseldorf, monoklonale Antikörper aus Hybridoma Einzelzellklonen. Deren Funktionalität, in Bezug auf die spezifische Bindung an Meprin β , zeigte sich bei einigen Einzelzellklonen in der Zellkultur (Nancy Uhlig 2013b).

Ziel der Promotionsarbeit ist es die Fähigkeit dieser monoklonalen Antikörper zur Detektion von Meprin β im Gehirn zu untersuchen. Hierfür werden Gewebelysate von Hirn und Niere, wobei die Niere eine hohe Expression von Meprin β aufweist und sich damit zur Positivkontrolle eignet, aus Wildtyp Mäusen und Knock-out Mäusen für Meprin β in der Gelelektrophorese aufgeteilt und mithilfe des Nassblotverfahrens auf einer Membran fixiert. Die Membran wird dann mit dem zu untersuchenden Antikörper inkubiert und sein Bindungsverhalten durch Immunfluoreszenz sichtbar gemacht.

Als weitere Kontrollgruppe werden zusätzlich transient transfizierte HEK293T mit einer Überexpression von Meprin β und rekombinant hergestelltes Meprin β demselben Untersuchungsprozess unterzogen, da hier sicher davon ausgegangen werden kann, dass Meprin β in einer hohen Konzentration vorliegt.

Ein immunologischer Nachweis von Meprin β im Gehirn ermöglicht nicht nur den definitiven Beweis für das Vorhandensein des Enzyms im Gehirn, sondern kann der erste Schritt in Richtung einer zielgerichteten Therapie der Alzheimer Erkrankung darstellen, sofern diese monoklonalen Antikörper in der Lage wären, die Metalloprotease Meprin β zu inaktivieren.

2. Literaturdiskussion

2.1 Die Alzheimer Erkrankung

2.1.1 Epidemiologie

Die Erkrankung wurde erstmalig im Jahre 1906 von ihrem Namensgeber, Alois Alzheimer, beschrieben (Alois Alzheimer 1906). Seine damals 50jährige Patientin, Auguste Deter, zeigte die heute charakteristischen neurologischen und psychiatrischen Veränderungen, welche er aufgrund ihres Alters als präsenile Demenz bezeichnete.

Die Alzheimer Erkrankung ist die häufigste Form der Demenzen und stellt mit Ihrer steigenden Inzidenz eine zunehmende epidemiologische und gesundheitsökonomische Herausforderung dar. Laut der Global Burden Disease Study wird sich die Zahl der Demenzfälle, wovon die Alzheimer Demenz ca. 60-70% ausmacht, von 57,4 Millionen Erkrankten aus dem Jahr 2019 auf rund 152,8 Millionen im Jahr 2050 erhöhen (Nichols E. 2022).

Die steigende Lebenserwartung scheint dabei die treibende Kraft hinter diesem massiven Zuwachs zu sein (Mayeux und Stern 2012; Nichols E. 2022).

In Deutschland zeigen aktuelle Daten, dass im Jahr 2024 etwa 1,8 Millionen Erkrankte in Deutschland leben (Blotenberg et al. 2023). Auch hier wird ein deutlicher Anstieg der Inzidenz für das Jahr 2050 vorhergesagt. Man rechnet dabei mit 2,3 -2,7 Millionen Betroffenen unter Menschen im Alter über 65 Jahren (Blotenberg et al. 2023). Parallel dazu hat sich die Zahl, der an Alzheimer verstorbenen Patienten in den letzten 20 Jahren nahezu verdoppelt (Statistisches Bundesamt 2023).

2.1.2 Riskofaktoren

Im Laufe der Zeit konnte der Einfluss diverser weiterer Risikofaktoren auf die Genese der Alzheimererkrankung nachgewiesen werden.

So trägt eine positive Raucheranamnese zur Steigerung des cholinergen Metabolismus und Erhöhung der nikotineren Acetylcholinrezeptoren im Gehirn und der verstärkten Ausschüttung des Neurotransmitters bei (Richard Doll, Richard Peto, Jillian Boreham, Isabelle Sutherland 2000; Whitehouse et al. 1988). Zwar verbessert dies die Aufmerksamkeit und Informationsverarbeitung, jedoch stellt der entstehende oxidative Stress einen weiteren Risikofaktor dar (Catherine A. Rotkamp, *Akihiko Nunomura, Arun K. Raina, †Lawrence M. Sayre, George Perry, and Mark A. Smith 2000; Perry et al. 2002). Freie Sauerstoffradikale führen zu Inflammation und Phagozytose (Traber et al. 2000). Neuere Studien legen nahe, dass aktuelles Rauchen das Risiko auf eine Demenzentwicklung fördert, wobei ein Rauchstopp es verringert (Jeong et al. 2023).

Cerebrovaskuläre Erkrankungen treten oft gemeinsam mit der Alzheimer Demenz auf (Schneider und Bennett 2010). Hierbei spielen kardiovaskuläre Risikofaktoren wie ein nicht eingestellter arterieller Hypertonus (Lena Kilander et al. 2000; Lenore J. Launera,*, G. Webster Rossb,c, Helen Petrovitshc, Kamal Masakic, Dan Foley, Lon R. Whitec, Richard J. Havlika 2000; Chuanshen Wua,*, Dongfeng Zhoua, Chen Wenb, Lin Zhangc, Peter Comoc, Youlin Qiaob 2003; Elias et al. 2003; R.A. Whitmer et al. 2005; Hughes et al. 2020) und der Diabetes mellitus Typ II (Jose A. Luchsinger, Ming-Xin Tang, Yaakov Stern, Steven Shea, and Richard Mayeux 2001; Jose A. Luchsinger et al. 2004; Rita Peila, Beatriz L. Rodriguez, and Lenore J. Launer) eine wichtige Rolle. So wird vermutet, dass beim Diabetes mellitus Typ II die A β -Akkumulation beeinflusst ist, da er die Funktion des Insulin-degrading-enzyme,

welches A β abbaut, beeinflusst und somit die A β -Clearance einschränkt (Selkoe 2000; Tian et al. 2023). Übermäßiges Fettgewebe, welches prädisponierend für einen Diabetes mellitus Typ II sein kann, bewirkt durch die Produktion von Adipokinen und Zytokinen (Tumornekrosefaktor α (TNF α), Interleukin 6 (IL-6)) Hyperinsulinämie und Insulinresistenz, welche direkt oder indirekt die Genese des Morbus Alzheimer beeinflusst (M. E. TRUJILLO & P. E. SCHERER 2005; Yu und Ginsberg 2005).

Somit ist spielt ein erhöhtes Körpergewicht, aber ebenfalls ein niedriger Body-Mass-Index eine wichtige Rolle (Faxén-Irving et al. 2005; Kang et al. 2021). Einige prospektive Studien stellen im Kontrast dazu auch das Über- wie Untergewicht, sowie eine starke Gewichts Zu- bzw. Abnahme als Risikofaktor dar (Nourhashémi et al. 2003; Deborah Gustafson et al. 2003; Brubacher et al. 2004; A.S. Buchman et al. 2005; Robert Stewart et al. 2005).

All diese Erkrankungen zählen unter anderen zu den kardiovaskulären und cerebrovaskulären Risikofaktoren, welche das Risiko für einen Apoplex signifikant erhöhen. Sie koexistieren oft beim Vorliegen einer Alzheimererkrankung (Schneider und Bennett 2010) wobei annähernd 7% aller Patienten mit einer neu aufgetretenen Alzheimerdemenz einen Apoplex in ihrer Vorgeschichte aufwiesen (Pendlebury und Rothwell 2009; Behl et al. 2024). Man vermutet hierbei eine erhöhte Ablagerung von A β in Form von Plaques und vaskulären Veränderungen (Blennow et al. 2006), welche eine Hypoperfusion des Hirngewebes bewirken. Diese Hypoperfusion erhöht die Prozessierung von A β durch eine Überexprimierung von p25 und cdK5 der BACE1 (β -Sekretase) ((Yi Wen^{1,+}, W. Haung Yu^{1,+}, Bryan Maloney², Jason Bailey², Junrong Ma², Isabelle Marié³, Thomas Maurin¹, Lili Wang¹, Helen Figueroa¹, Mathieu Herman¹, Pavan Krishnamurthy¹, Li Liu¹, Emmanuel Planel¹, Lit-Fui Lau⁴, Debomoy K. Lahiri², and Karen Duff^{1,*} 2008).

Auch traumatische Hirnverletzungen in der Vorgeschichte steigern das Risiko für AD. Besonders bei Patienten mit dem APOE- ϵ 4 Allel (Koponen et al. 2004). Nach einer traumatischen Hirnverletzung kommt es zu einer erhöhten Ablagerung von A β (Iwata et al. 2002) und eine intraneurale Hyperphosphorylierung des Protein Tau (Smith et al. 2003). Somit kommt es zu einer erhöhten Konzentration von A β im Liquor (Emmerling et al. 2000; Franz et al. 2003).

2.1.3 Protektive Faktoren

Neben diesen gängigen Risikofaktoren sind auch protektive Faktoren bekannt. Lange Zeit wurde angenommen, dass ein hoher Bildungsgrad die Ausbildung einer klinischen Alzheimerdemenz verzögere. Mehrere Studien belegen jedoch keinen Zusammenhang zwischen Bildungsgrad und der Entwicklung einer AD (Hall et al. 2000; Chandra et al. 2001; Liu et al. 2024), wohl aber ein geringeres Risiko für Demenzen im Allgemeinen (Evans et al. 1993; Evans et al. 1997; White et al. 1994; Qiu et al. 2001).

Alles in allem lässt sich annehmen, dass ein Patient mit höherem Bildungsgrad die cerebralen Veränderungen länger kompensiert und die Erkrankung erst später klinisch apparent wird.

Großen Einfluss haben die Einbindung in ein soziales Gefüge (Fratiglioni et al. 2004; Morganti und Negri 2025) und eine kreative Gestaltung des Alltags (Verghese et al. 2003; X Zhang 1, C Li, M Zhang 1999). Andere Studien belegen allerdings Gegenteiliges, wonach Menschen mit hohem Bildungsgrad und differenzierten beruflichen Fähigkeiten schneller an der Erkrankung versterben (Stern et al. 1999).

Wie bereits beschrieben wirken sich Ernährungszustand und kardiovaskuläre Erkrankungen negativ in Bezug auf die Entstehung einer AD aus. Somit lag es nahe, dass bestimmte Ernährungsformen einen positiven Einfluss nehmen könnten. Es besteht ein Zusammenhang zwischen erhöhten Blutcholesterinwerten und dem Risiko für eine AD (Sparks et al. 2000). Auch ungesättigte Transfette haben einen negativen Einfluss, wohingegen eine hohe Aufnahme von n-6 mehrfach ungesättigten Fettsäuren das AD Risiko senkt (Morris et al. 2003). Ebenfalls reduziert die Aufnahme von Ω -3 Fettsäuren und Fisch das Risiko (Morris et al. 2003; Sparks et al. 2000; Chávez-Castillo et al. 2025). Vielen Vitaminen wird eine neuroprotektive Wirkung zugesprochen. In Bezug auf die AD konnte ein positiver Effekt durch eine hohe Aufnahme von Vitamin D detektiert werden (Engelhart et al. 2002; Morris et al. 2002). Widersprüchliche Aussagen finden sich zu bestimmten B Vitaminen und Folsäure (Mayeux und Stern 2012). Die mediterrane Küche (viel Olivenöl, wenig Fleisch, viel Fisch, weniger Alkohol) reduziert das Erkrankungsrisiko (Scarmeas et al. 2006).

Einige Tierstudien zeigen, dass sportliche Aktivität Lernprozesse anregt (van Praag et al. 1999), neuronale Plastizität aktiviert und neuronale Netze remodelliert (Cotman

und Berchtold 2002), die Vaskularisation im Gehirn fördert (Black et al. 1990) und die Neurogenese stimuliert (van Praag et al. 1999; Yau et al. 2025). Es wird vermutet, dass dies das Überleben und die Widerstandsfähigkeit von Neuronen gegenüber Schlaganfällen erhöht (Carro et al. 2001), das Level neuronaler Wachstumsfaktoren im Gehirn erhöht (Cotman und Berchtold 2002), die Genexpression Plastizität fördernder Genprofile begünstigt und die Konzentration von CRP und IL-6 reduziert (Ford 2002; Reuben et al. 2003). Eine Cochrane Review zeigte, dass acht von elf randomisiert kontrollierten Studien mit älteren Menschen ohne kognitive Beeinträchtigung, sportliche Aktivität und aerolische Übungen mit einer Verbesserung der kognitiven Funktion einhergehen (Angevaren et al. 2008).

2.1.3 Genetische Faktoren

Neben dem sporadischen Typ der Alzheimer Erkrankung sind ebenfalls vererbare, familiäre Formen der Erkrankung bekannt. Ihre Entdeckung unterstrich die zentrale Rolle von A β -Peptiden in der Pathogenese. Relativ betrachtet sind erbliche Ursachen der Erkrankung selten und betreffen das Presenilin 1 Gen (Goate et al. 1991; Levy-Lahad et al. 1995; Rogaev et al. 1995) und das Preseinilin 2 Gen (Sherrington et al. 1996; Sherrington et al. 1995). Kleinere Deletionen stellen hier den Großteil der Mutationen, wobei Insertionen eher eine Minderheit darstellen. Dabei sind 182 alzheimerassoziierte Mutationen für Presenilin 1 und nur 14 Mutationen für Presenilin 2 (Mayeux und Stern 2012) bekannt. Presenilin Mutationen verändern die γ -Sekretase vermittelte Spaltung von APP und führen dadurch zu einem erhöhten Verhältnis von A β_{42} zu A β_{40} , zugunsten von A β_{42} , im Rahmen einer loss-of-function oder gain-of-function Mutation (Tanzi 2012). Diese Genmutationen besitzen eine hohe Penetranz durch einen meist autosomal dominanten Erbgang. Da hier die relativen Level von A β_{42} -Peptiden erhöht sind, führt deren vermehrte Aggregation zu früher symptomatischer Erkrankung bereits in der 4.-5. Lebensdekade. Mutationen im Gen für APP auf dem Chromosom 21 stellen weniger als 1% der erblichen Formen der Erkrankung. Dabei beeinflussen alle Missense-Mutationen die Prozessierung bzw. Aggregation von A β , da die kodierenden Exone 16 und 17 für APP die A β -Frequenz betreffen (Athan et al. 2001).

2.1.4 Pathophysiologie und Klinik

Erste Symptome einer Erkrankung stellen eine abnehmende Gedächtnisleistung, Aphasie und Agnosie dar. In einem fortgeschrittenen Stadium kommen Apraxie, Apathie und Inappetenz hinzu (Petry et al. 1988; Artaso Irigoyen et al. 2004).

Ursache dieser Symptome sind eine bis zu 60%ige Hirnatrophie (Callen et al. 2001) und ein neuronaler Untergang in Neocortex, Hippocampus und Hirnstamm (Sisodia 1999).

2.1.4.1 Extrazelluläre A β -Plaques

Des Weiteren finden sich in den Gehirnen der Betroffenen A β enthaltende extrazelluläre Plaques, welche sich über das gesamte Gewebe verteilen und intrazelluläre Knäule aus Tau-Protein (Arnold et al. 1991; Montine et al. 2012). Diese beiden Proteine gelten in der Amyloid Theorie nach Selkoe als die pathophysiologischen Hauptursachen für die Entstehung der Alzheimer Erkrankung (Selkoe und Hardy 2016; Selkoe 2000). Neben der Amyloidhypothese gibt es auch andere Pathomechanismen, die ein Erklärungsmodell für die Erkrankung bieten können (Knopman et al. 2021; Herrup 2015; Gorelick et al. 2011). Diese sind jedoch nicht Teil der hier vorliegenden Arbeit.

A β ist ein Derivat des Amyloid Precursor Protein (APP), einem Transmembranprotein, welches hauptsächlich in Neuronen vorkommt (Haass und Selkoe 2007). Nach seiner Produktion wird A β als Monomer in den Extrazellularraum sezerniert (Holtzman et al. 2011). Zwar produzieren fast alle Zellen A β , jedoch steigt seine Produktion bei synaptischer Aktivität und wird auch durch diese reguliert (Cirrito et al. 2005), unterliegt einer circadianen Rhythmik (Kang et al. 2009) und wird im Schlaf durch das glymphatische System abtransportiert (Boespflug und Iliff 2018). Vor allem A β -Monomere sind toxisch. Ihre Toxizität erklärt sich aus einer Interaktion mit dem metabotropen Glutamaterezeptor 5 und dem NMDA-Rezeptor (Spires-Jones und Hyman 2014; Benarroch 2018), sowie dem α -7 nikotinergischen Acetylcholinrezeptor und dem Insulinrezeptor (Knopman et al. 2021). Damit spielt A β in Rahmen der Entstehung von Neurotoxizität eine wichtige Rolle.

2.1.4.2 Tauopathie

Das Tau Protein ist mikrotubuliassoziiert und kommt normalerweise im Zytoplasma von Axonen vor (Gallardo und Holtzman 2019), ist aber auch in prä- und postsynaptischen Kompartimenten sowie der nukleären Membran zu finden (Pooler et al. 2014; Eftekharzadeh et al. 2018). Hauptfunktion von Tau ist die Stabilisierung von Mikrotubuli. Durch eine hohe Anfälligkeit für posttranslationale Modifikation neigt es zur Aggregation (Eftekharzadeh et al. 2018; Pooler et al. 2014). Hyperphosphoryliert aggregiert es auch im Zellkörper und Dendriten (Knopman et al. 2021). Wie auch bei A β , steigt seine Ausschüttung in den Interzellularraum bei

synaptischer Aktivität und wird durch postsynaptische Neurone und Gliazellen wieder aufgenommen (Yamada et al. 2014; Wu et al. 2016).

Modifikationen an Tau können die differenzierte Aufnahme in die postsynaptischen Neurone und Gliazellen ermöglichen, es weiter prozessieren, aber auch zum Aggregieren bringen (Knopman et al. 2021). Die posttranslationale Modifikation beeinflusst nachhaltig die Progression der Alzheimer Krankheit (Dujardin et al. 2020; Shi et al. 2017; Gratuze et al. 2020). Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass ApoE, TREM2 (REF) und Mikroglia eine wichtige Rolle bei der Tau-vermittelten Neurodegeneration spielen (Shi et al. 2019).

Histopathologisch erscheint Tau als neurofibrilläre Verwicklungen (intrazelluläre Tau Aggregate, neuropil threads) und dysmorphen Neuronen. Diese Neuronen zeigen degenerierte Axone und Dendriten, enthalten Tau und sind von A β -Plaques umgeben (Knopman et al. 2021).

2.1.4.3 Neurodegeneration

Beide beschriebenen Pathomechanismen tragen zur Neurodegeneration bei. Dabei kommt es durch die Akkumulation von A β zu einer Störung der Calcium Regulation, was die neuronale Konnektivität vermindert und Neuroinflammation und das Einwandern von Mikrogliazellen steigert (Huang et al. 2006; Koffie et al. 2009). Tau ist im hyperphosphorylierten Zustand weniger bindungsaffin zu den Mikrotubuli. Es aggregiert und führt so einen beschleunigten Zelltod herbei (Mizuno 2012; Götz et al. 2001).

Synaptische Veränderungen stellen einen wichtigen Aspekt zum Verständnis des Zusammenhangs zwischen A β und Tau Neurotoxizität und den, für die Alzheimer Krankheit typischen, morphologischen Läsionen und der kognitiven Beeinträchtigung dar (Spires-Jones und Hyman 2014; Palop und Mucke 2016). Synaptischer Verlust korreliert stark mit der Kognition bei den Patienten (Terry et al. 1991; DeKosky und Scheff 1990). A β -Plaques sind umgeben von einem, ca. 50 μ m messenden, Ring aus A β -Oligomeren. Dieser Ring ist gekennzeichnet durch den Verlust von synaptischen Verbindungen (Spires-Jones und Hyman 2014; Spires et al. 2005).

Zusätzlich zum Verlust synaptischer Konnektivität legen verschiedene Untersuchungen an Tier- und Labormodellen nahe, dass auch die synaptische Dysfunktion eine Rolle im Pathomechanismus der Erkrankung spielt (Busche et al. 2008; Kuchibhotla et al. 2008). Zum Beispiel ließ sich ein hyperaktiver Calciumfluss

in und um A β -Plaques nachweisen, welcher mithilfe von BACE-Inhibitoren unterbunden werden konnte (Keskin et al. 2017; Chaudhary et al. 2025; Zhang et al. 2022). Auch neuere Untersuchungen legen nahe, dass auch Meprin β Einfluss auf die neuronale Plastizität und Neurodegeneration hat (Keller et al. 2025).

Eine Veränderung bzw. der Verlust synaptischer Verbindungen begünstigt die Ablagerung fehlgefalteter Proteine (Calignon et al. 2012). Solche Ablagerungen können durch den LRP1-Rezeptor wieder in Neuronen, Astrozyten und Mikroglia aufgenommen werden (Rauch et al. 2020). Dieser Rezeptor interagiert ebenfalls mit APP und ApoE und beeinflusst ggf. auch die Vermehrung von Tau (Kounnas et al. 1995; Rebeck et al. 1993).

Translationale und neuroanatomische Untersuchungen bewiesen eine starke Interkonnektivität zwischen dem entorhinalen Cortex, dem initialen Lokus cerebraler neurofibrillärer Ablagerungen, und Assoziationsarealen im temporalen, parietalen und frontalem Isocortex (Delacourte et al. 1999; Braak und Braak 1991).

Untersuchungen mittels Funktions-MRT stützen diese Aussage bei gesunden Patienten und konnten die Dysfunktion dieser Signalwege bei Alzheimerpatienten nachweisen (Knopman et al. 2021).

Die Verteilungsmuster der neuronalen Läsionen spiegeln sich auch in der Klinik der Patienten wider. So reicht die klinische Erscheinung der Krankheit von einer leichten Beeinträchtigung bestimmter funktionaler Domänen, wie Erinnerung, Sprache und exekutiver Funktion, bis hin zu einem beinahe kompletten Ausfall einer oder vieler Funktionen. Neuropsychiatrische Symptome treten oft mit, oder im Rahmen eines kognitiven Defizits auf, wobei Angst, Depression und sozialer Rückzug eher bei milder Erkrankung anzutreffen sind. Wahnvorstellungen, Halluzinationen, emotionaler Kontrollverlust und Aggressivität sind daher eher im fortgeschrittenen Stadium zu beobachten (D'Onofrio et al. 2012).

2.1.5 Diagnostik

2.1.5.1 Klinische Diagnostik

Am Anfang des diagnostischen Prozesses steht die Eigen- und Fremdanamnese. Meist werden Betroffene durch ihre Angehörigen ärztlich vorgestellt, denen eine kognitive Beeinträchtigung des Patienten auffällt. Neben einer ausführlichen Anamnese wird ebenfalls ein psychopathologischer Befund erhoben (Knopman et al. 2021; Dubois et al. 2007). Neuropsychologische Test (Mini-Mental-Staging-Test

(MMST), DemTect, Uhrentest) stellen ein weiteres wichtiges Diagnoseinstrument dar, da sie zudem in der Lage sind die Ergebnisse der Anamnese zu objektivieren (McKhann et al. 1984).

Die vorläufige Diagnose muss nun gefestigt werden. Dabei ist auch ein Ausschluss anderer, ggf. reversibler Ursachen für die kognitive Beeinträchtigung unabdingbar (Knopman et al. 2021). Depressionen, Medikamente, obstruktive Schlafapnoe, Hirnläsionen und Neoplasien, aber auch Hypothyreose und Vitamin B12-Mangel, um nur ein Paar zu nennen, zählen zu Auslösern des MCI (Clarfield 2003).

2.1.5.2 Laborchemische Diagnoseverfahren

Der Nachweis bestimmter Befundkonstellationen von A β ₄₂, APP und Tau im Liquor sind das am meisten validierte und in vielen europäischen Ländern verwendete Nachweisverfahren zur laborchemischen Diagnose des Morbus Alzheimer (Shaw et al. 2018; Molinuevo et al. 2018). A β ₄₂ ist ein biologischer Marker der bei allen Schweregraden der Erkrankung, wie auch bei asymptomatischen Patienten, die aber erst später Symptome entwickeln, nachgewiesen werden kann. Da der Wert stark variieren kann, lassen sich mit Hinzunahme der Bestimmung von A β ₄₀ oder phosphorylierten Tau (p-Tau) bessere Ergebnisse erzielen (Hansson et al. 2007; Wiltfang et al. 2007). Weitere Tau Spezies wie p-Tau 181 und t-Tau sind weitere Kandidaten zur Verbesserung der laborchemischen Diagnostik (Mattsson et al. 2009; Skillbäck et al. 2015). Weitere Forschung zur Identifikation neuer Biomarker im Liquor sind derzeit Gegenstand verschiedener Arbeiten. Zu diesen, bisher experimentellen Markern zählen CSF neurofilament light chain (Olsson et al. 2019; Zetterberg und Bendlin 2021), Neurogranin (Tarawneh et al. 2016), synaptosom-associated protein 25 (SNAP25) und Synaptogamin (SYT1) (Knopman et al. 2021).

Zum Ausschluss diverser anderer Ursachen für das MCI lassen sich diverse bekannte Blutbiomarker heranziehen. Blutwertbasierte Marker zur Diagnose der Alzheimererkrankung sind jedoch der noch in der Versuchsphase. Bisherige Analysen wiesen jedoch eine zu geringe Effektstärke auf und konnten statistisch keine Überlegenheit gegenüber liquorbasierten Markern nachweisen. Sie spielen daher diagnostisch bisher keine wichtige Rolle im Diagnoseprozess (<https://www.alzforum.org/alsbiomarker>).

2.1.5.3 Bildgebende Verfahren

In den deutschen Leitlinien von 2025 wird zuzüglich zur Labordiagnostik auch ein bildgebendes Verfahren zum Ausschluss reversibler oder anderer Ursachen empfohlen (AWMF S3 Leitlinie Demenzen DGPPN und DGN 2025).

CT, FDP-PET und MRT stellten die ersten bildgebenden Verfahren dar. Sie zeigten jedoch eine geringe Sensitivität und Spezifität für die Alzheimer Erkrankung. Die Einführung des A β -PET unterstrich jedoch die Bedeutung des FDG-PET und des MRT als Marker zur Darstellung von Neurodegeneration (Klunk et al. 2004). Im IQWiG Evidenzbericht von 2020 findet sich kein Nachweis über den Nutzen von bildgebender Diagnostik zur Diagnose des Morbus Alzheimer (IQWiG 2020).

Die derzeitige, nach AWMF-Leitlinie, regelrechte Diagnostik besteht aus dem klinischen Befund, dem Nachweis einer kognitiven Beeinträchtigung, z.B. MMST und dem Nachweis im Liquor (AWMF S3 Leitlinie Demenzen DGPPN und DGN 2025).

2.1.6 Therapie

Therapeutisch stehen derzeit zur Behandlung milderer Formen der Erkrankung Cholinesterasehemmer wie Donezpil, Rivastigmin und Galantamin zur Verfügung (Fink et al. 2018). Für moderate bis schwere Formen der NMDA-Rezeptor Antagonist Memantin. Diese Präparate ermöglichen es die Symptomprogression um etwa 6 Monate zu verzögern (Fink et al. 2018; Mohs et al. 2001). So empfiehlt die deutsche Leitlinie zuerst den Einsatz von Cholinesterasehemmern (Kaduszkiewicz et al. 2005; Gesamtbundesausschuss (GBA) 2023). Memantin soll erst ab moderater Erkrankung eingesetzt werden (McShane et al. 2019; Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen 2011). Für eine Kombinationstherapie aus beiden Wirkstoffgruppen findet sich jedoch keine Evidenz (Tsoi et al. 2019).

Bis 2020 konnte keine Wirkung für monoklonale Antikörper, welche gegen A β gerichtet sind, belegt werden (Panza et al. 2019).

Jüngst konnte jedoch die Wirksamkeit der beiden Amyloid-Antikörper Lecanemab und Donanemab bewiesen werden. So ist Lecanemab in der Lage ein Fortschreiten der Erkrankung um ca. vier Jahre zu verzögern (van Dyck et al. 2023) und Donanemab um drei Jahre (Sims et al. 2023). Sie ermöglichen den Abbau von A β und verlangsamen so den Abfall der Kognition. In ihrer Arbeit haben van Dyck et al zudem herausgearbeitet, dass Lecanemab eine hohe Affinität zu löslichen A β -Protofibrillen, mit einem wesentlichen höheren neurotoxischen Potenzial als A β -

Monomere oder Fibrillen, besitzt. Des Weiteren wirkt sich ein früher Therapiebeginn und eine geringe Tauopathie positiv auf die Prognose aus (van Dyck et al. 2023). Seit dem 1. September 2025 ist Lecanemab auch in Deutschland zugelassen (Paul Ehrlich Institut 2025).

Neben den bereits genannten Wirkstoffen sind auch andere Pharmaka Gegenstand aktueller Forschung zur Therapie der Alzheimererkrankung. Cummings et al. haben diese in ihrer Arbeit zusammengefasst (Cummings et al. 2025b). Zu aussichtsreichen Wirkstoffen zählt auch das GLP-1 Analogon Semaglutid, was bisher in der Therapie des Diabetes mellitus Typ II Anwendung findet (Cummings et al. 2025a).

Wie schon in der Zulassungsstudie von Lecanemab dargelegt, trägt ein früher Therapiebeginn zu einer Verbesserung der Prognose bei (van Dyck et al. 2023). Aktuell wird die Krankheit jedoch erst im symptomatischen Stadium, also einem fortgeschrittenen Stadium, erst erkannt (Kusoro et al. 2025; Kamatham et al. 2024). Es ist anzunehmen, dass neuropathologische Veränderungen bereits Jahrzehnte vor der klinischen Manifestation auftreten (Kang et al. 2023). Neben der Entwicklung kausaler Therapieansätze ist auch die Etablierung einer suffizienten Früherkennung von großer Bedeutung.

2.2 Die Prozessierung des Amyloid Precursor Protein (APP)

Das Proteinablagerungen eine mögliche Ursache für die Entstehung der Alzheimererkrankung darstellen könnten, war schon recht früh bekannt (Glenner und Wong 1984). Jedoch erst zehn Jahre später gab es klinische Studien, die diese Theorie stützten und APP und A β in die Pathogenese mit einschlossen (Beyreuther und Masters 1991; Hardy und Allsop 1991; Selkoe 1991; Hardy und Higgins 1992). Mutationen in den Genen Presenilin 1 und 2 und für APP scheinen die proteolytische Prozessierung von APP zu verändern und das relative Level von A β ₄₂ und A β ₄₃ zu erhöhen (Scheuner et al. 1996). Die Ablagerung seniler Plaques beginnt schon viele Jahre vor dem Auftreten ersten Symptome (Villemagne et al. 2013).

APP scheint also eine zentrale Rolle in der Genese der Erkrankung zu spielen. Das etwa 100kDa große Protein gehört zu den Typ 1 Transmembranproteinen mit einer längeren, n-terminalen, extrazellulären Domäne (E1 und E2), sowie einer kürzeren, c-terminalen, zytosolischen Domäne. Die transmembranöse Domäne E3 zählt dabei zum längeren Teil (Dyrks et al. 1988).

2.2.1 Synthese

Gebildet wird, das auf dem Chromosom 21 kodierte Protein, im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und wird dann über den Golgi-Apparat und dem trans-Golgi-Netzwerk (GTN) in sekretorischen Vesikeln an die Zelloberfläche transportiert (Mihov et al. 2015). Auch A β entsteht bereits bei diesen Transportprozessen. An der Zelloberfläche kann APP dann weiter prozessiert, oder über endosomale/lysosomale Internalisierung wieder abgebaut werden (Cho et al. 2020). Neuere Studien belegen, dass in Neuronen neben dem klassischen clathrin-abhängigen Weg auch clathrin-unabhängige Mechanismen für die Internalisierung von APP existieren. Diese alternativen Wege sind insbesondere im somatodendritischen Kompartiment aktiv und beeinflussen die Verfügbarkeit von APP für die Verarbeitung durch β - und γ -Sekretasen in Endosomen (Aow et al. 2023).

Durch „alternet splicing“ existieren drei Isoformen, die sich in Ihrer Länge unterscheiden: APP695 (695 Aminosäuren) und APP751 und APP770 (751 und 770 Aminosäuren) (Goate et al. 1991; Stakos et al. 2020). Während APP751 und APP770 auf der Zelloberfläche nahezu jedes Zelltypen vorkommen, findet sich APP695 hauptsächlich auf und in Neuronen (Rohan de Silva et al. 1997; Kang und Müller-Hill 1990). Es gibt Untersuchungen, die nahelegen, dass APP Isoformen, welche einen Kunitz-Protease-Inhibitor Anker (KPI Anker) besitzen, in den Gehirnen von Alzheimerpatienten erhöht sind. Zu solchen Isoformen Zählen auch APP751 und 770 (Menéndez-González et al. 2005). Verlängerte Aktivierung des extrasynaptischen NMDA-Rezeptors kann einen Shift von APP695, ohne KPI-Anker, hin zu einer vermehrten Expression KPI tragender APP-Isoformen bewirken und somit zu einer erhöhten Produktion von A β führen. Somit wäre auch die Dysregulation der Splicingprozesse ein Teil der Pathogenese (Bordji et al. 2010).

2.2.2 Struktur

In seiner extrazellulären Domäne E1 und E2 besitzt APP eine Kupferbindende Region (CuBR) (Kong et al. 2008; Dahms et al. 2012; Baumkötter et al. 2014), sowie eine growth-factor-like-domain (GFLD) in E1 (Baumkötter et al. 2014). Mit seinen Homologen APP-like-protein 1 und 2 (APLP1 und APLP2), welche der gleichen Proteinfamilie angehören (Wasco et al. 1992; Wasco et al. 1993; Coulson et al. 2000), ist APP imstande an der Zellmembran Homo- oder Heterodimere in cis- wie in trans-Formation zu bilden (Baumkötter et al. 2012; Isbert et al. 2012; Kaden et al. 2012). Während die cis-Dimerisierung einen Einfluss auf die Prozessierung von APP

hat (Kaden et al. 2008; Eggert et al. 2009; Schmidt et al. 2012), fördert die Interaktion in trans-formation die Zelladhäsion (Soba et al. 2005).

2.2.3 Prozessierung

Die Prozessierung von APP an der Zelloberfläche kann nun über zwei Wege erfolgen (Dyrks et al. 1988). Beim nicht amyloidogenen Weg wird kein A β gebildet (O'Brien und Wong 2011). Die α -Sekretase, auch ADAM10 genannt, schneidet innerhalb der A β Sequenz des APP-Moleküls und löst damit das lösliche amyloid precursor protein alpha (sAPP α) aus der Aminosäurekette (Sisodia 1992). Mittels regulierter intramembranöser Proteolyse (RIP) spaltet nun die Aspartat Protease γ -Sekretase aus der Transmembrandomäne von APP das 3kDa große p3 Peptid heraus (Ling et al. 2003). Da bei diesem Weg der APP Prozessierung kein A β gebildet wird, stellt er für die Plaquebildung keine Relevanz dar.

Im amyloidogenen Weg der APP Prozessierung wird A β freigesetzt. Dies geschieht durch die β -Sekretase auch beta-amyloid-cleaving-enzyme (BACE1) genannt (Gandhi et al. 2004; Ulku et al. 2023). Die Aspartyl-Protease ist vor allem an der Endosomenmembran aktiv (Yan und Vassar 2014; Sinha et al. 1999; Vassar et al. 1999). Der Schnitt des Enzyms durch APP695 bei Methionin 596 und Aspartat 597 (Vassar 2002) und spaltet es so in das N-terminale sAPP β - und das C-terminale, 10kDa große C99 Fragment, welches auch den A β -Anteil enthält (Vassar et al. 1999).

Mithilfe regulierter intramembranöser Proteolyse (RIP) wird das, in der Membran verbliebene, C99 durch die γ -Sekretase, auch eine Aspartyl-Protease (Wolfe et al. 1999), gespalten (Edbauer et al. 2003). Die γ -Sekretase kann C99 an zwei Loci schneiden, woraus ein intrazelluläres C-terminales Fragment (ICD) sowie die A β -Spezies A β ₁₋₄₀ und A β ₁₋₄₂ entstehen (Zhao et al. 2004). A β ₁₋₄₀ und A β ₁₋₄₂ werden etwa im Verhältnis 9:1 gebildet. Das Verhältnis kann aber bei Formen der familiären Alzheimererkrankung stark verändert sein (Kuperstein et al. 2010).

Ein Großteil der produzierten A β -Spezies wird durch BACE1 gebildet (Sinha et al. 1999; Vassar 2002; Hussain et al. 1999; Yan et al. 1999). Interessanterweise zeigten jedoch einige Untersuchungen, dass durch die Hemmung der A β _{1-x} produzierenden BACE1 der Anteil von A β -Peptiden mit alternativen N-Termini zunahm (Haass et al. 1995; Schrader-Fischer und Paganetti 1996; Takeda et al. 2004; Schieb et al. 2010; Mattsson et al. 2012).

Meprin β wurde später als alternative β -Sekretase identifiziert, welche in der Lage ist APP zu schneiden und N-terminal trunkierte A β -Moleküle zu bilden (Bien et al. 2012; Schönherr et al. 2016; Becker-Pauly und Pietrzik 2016).

2.3. Die Metalloprotease Meprin β

2.3.1 Molekulare Struktur von Meprin β

Die 145 kDa große Zink-abhängige Metalloprotease Meprin β wird zur Familie der Astacine gezählt, welche zur Gruppe der Multidomain Metallopeptidasen gehört (Gomis-Rüth et al. 2012; Linnert et al. 2021). Meprin wurde erstmals im Jahr 1982 von Sterchi et al. Beschrieben und in Darm- und Nierenepithelien von Menschen, Ratten und Mäusen entdeckt (Sterchi et al. 1982). Meprin α und Meprin β werden dieser Gruppe zugerechnet. Beide sind in der Zellmembran verankert (Sterchi et al. 2008). Die monomeren Peptidasen sind in der Lage sich mithilfe von Disulfidbrücken zu Dimeren beziehungsweise Multimeren zusammenzuschließen (Bond und Beynon 1995).

Dabei bildet Meprin β ein membrangebundenes Homodimer aus. Dieses kann jedoch von ADAM 10 und 17 von der Membran abgelöst werden (Jefferson et al. 2013; Linnert et al. 2021; Armbrust et al. 2024b).

Meprin α dagegen besitzt eine zusätzliche I-Domäne (I für inserted) welches den, sich bis zu Oligomeren zusammenlagernden, Heterodimeren die Möglichkeit gibt sich von der Zellmembran abzulösen und so in den Extrazellularraum sezerniert zu werden (Bertenshaw et al. 2003).

Arolas et al. stellten in ihrer Arbeit zur X-Ray Kristallstrukturanalyse die molekulare Struktur von Meprin β und seinem inaktiven Vorgänger, ProMeprin β , visuell dar. Aus dieser Arbeit geht hervor, dass Meprin β erst durch die Abspaltung eines Propeptids am N-Terminus aktiviert wird (Arolas et al. 2012; Linnert et al. 2021).

Meprin β nutzt neben anderen membrangebundenen Signalproteinen auch APP als Substrat (Jefferson et al. 2011). Am Beispiel von APP soll hier kurz die Struktur und der Vorgang der Proteinprozessierung erläutert werden.

Jedes Meprin β Monomer besitzt einen Kanal, welcher durch mehrere Kohlenhydrate gebildet wird, den so genannten „Sugar Channel“. APP wird als Ektoprotein an seinem distalen N-Terminus an diesen Kanal des Monomers 1 hineingezogen. Weiter läuft die Substratkette auf der Oberfläche des Enzyms entlang, bis sie

zwischen den katalytischen Domänen der beiden Monomere einliegt (Arolas et al. 2012). In dieser katalytischen Domäne findet die Spaltung des APP statt.

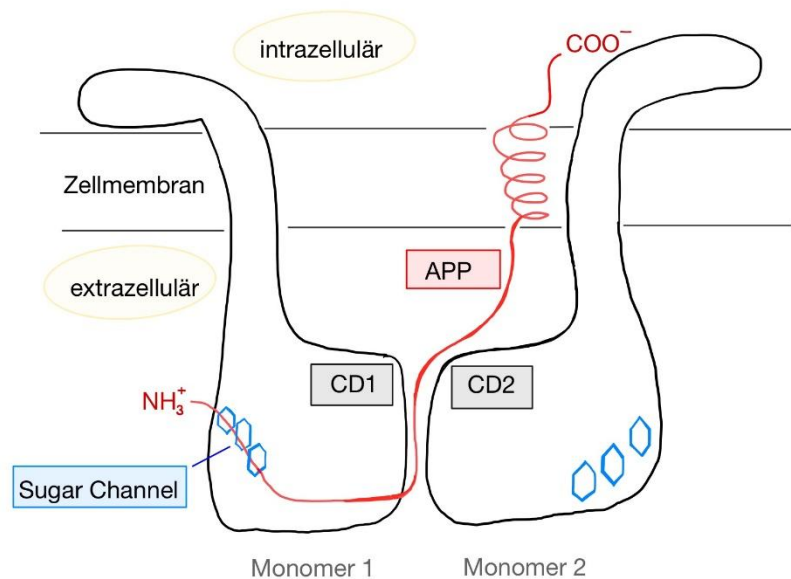


Abbildung 1 Schematische Struktur von Meprin beta, abgewandelt von Arolas et al 2012

2.3.2 Meprin β und das Amyloid Precursor Protein (APP)

2012 zeigten Bien et. al (Bien et al. 2012), dass APP neben BACE1 auch Meprin β als Substrat im amyloidogenen Weg dient.

Meprin β schneidet APP an den zwei extrazellulären Domänen E1, E2 und der transmembranösen E3 des APP (siehe Abbildung). Im Rahmen dieses Prozesses wird auch das N-terminal-trunkierte $A\beta_{2-x}$ Peptid gebildet. (Schönherr et al. 2016).

Hierbei zeigt Meprin β korrelierend mit BACE1 die Fähigkeit APP in P1' Position (Nomenklatur nach Schechter und Berger, 1967) in Domäne E3 zu schneiden und dabei die Aminosäuren Glutamat und Aspartat zu bevorzugen. Des weiteren schneidet Meprin β APP ebenfalls an der P2 Position bei Alanin (Schönherr et al. 2016). Damit kann erklärt werden, warum Meprin β in der Lage ist $A\beta$ -Moleküle zu bilden, welche verschiedene N-Termini besitzen ($A\beta_{1-x}/A\beta_{2-x}$) (Bien et al. 2012). Zuletzt schneidet die γ -Sekretase an der gleichen Stelle wie bei der Entstehung der $A\beta$ -Spezies, welche durch die β -Sekretase gebildet werden. Diese Vorgänge geschehen hauptsächlich während der Endozytose. Die $A\beta_{2-40}$ Varianten besitzen im Vergleich zu $A\beta_{1-40}$ eine höhere Neigung zu aggregieren und scheinen ebenfalls die

Aggregation von A β_{1-40} zu stimulieren. Jedoch ist Meprin β interessanterweise nicht in der Lage N-terminal trunkierte A β -Spezies bei Vorliegen der Schwedischen Mutation von APP (APP^{swe}) zu generieren (Schönherr et al. 2016).

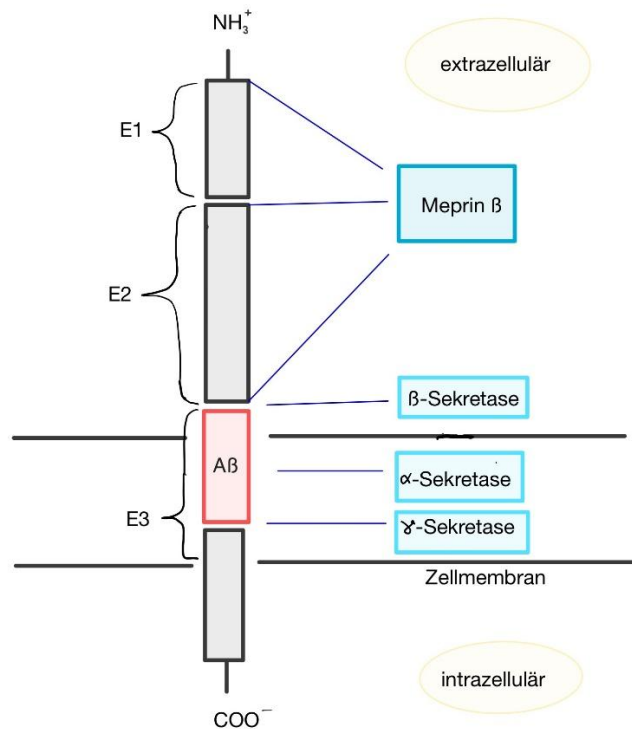


Abbildung 2 Die Abbildung zeigt schematisch die potenziellen Schnittstellen von Meprin β am APP-Protein. Die Schnittstellen finden im N-terminalen Fragment, welches sich extrazellulär befindet. Am C-terminalen Ende, welches intrazellulär liegt, findet keine Interaktion mit Meprin β statt. Die Abbildung wurde nach Jefferson et al 2011 abgeändert

2.3.3 Physiologische Funktionen

Wie viele andere membrangebundene Enzyme, lässt sich die physiologische Funktion Meprin β allgemein als „protein ectodomain shedding“ bezeichnen. Hierbei werden aus einem membrangebundenen Precursorprotein, wie auch APP eines ist, Fragmente herausgeschnitten, welche unterschiedlichste Funktionen haben können (Blobel 2005; Arribas und Merlos-Suárez 2003).

Durch die Lokalisation an der Zelloberfläche limitiert sich der Wirkungsbereich auf einen autokrinen beziehungsweise juxtakrinen Prozess. Doch trotz dieses begrenzten Wirkungsbereichs betrifft diese Form der Proteolyse viele

posttranslationale Mechanismen, wovon schlussendlich 2-4% der Proteine an der Zelloberfläche betroffen sind (Pandiella et al. 1992).

Peptidasen, die in einen solchen Prozess eingebunden sind, werden auch als Sheddasen bezeichnet. Auch Meprin β wird dazu gezählt (Gomis-Rüth 2003, 2009).

Neben der Expression von Meprin β im Gehirn finden sich eine hohe Expression im intestinalen Epithel und Zellen des proximalen Tubulus in der Niere. Wie auch im Gehirn ist die Expression von Meprin β in Haut und bestimmten Zellen des Immunsystems vergleichsweise niedrig (Broder et al. 2013; Broder und Becker-Pauly 2013a).

In intestinalen Geweben erfüllt Meprin β am apikalen Zellpol der Epithelzelle die Ablösung von Schleim durch das Schneiden von Mucin 2, was eine wichtige Barrierefunktion im Darm (Schütte et al. 2014) und der mucosalen Homöostase darstellt (Werny et al. 2022). Des Weiteren spaltet es Typ 1 Pili an adhären wachsenden *Escherichia coli* Bakterien, was einer Schleimhautbesiedelung entgegenwirkt (Vazeille et al. 2011).

In der Haut erfüllt Kollagen einen essenziellen Beitrag zur Stabilität des Bindegewebes. Hierbei spielt Meprin β vor allem eine Rolle bei der Reifung von Prokollagen I und II (Kronenberg et al. 2010; Prox et al. 2015; Broder et al. 2013).

Diverse Veröffentlichungen in den letzten 20 Jahren legen nahe, dass Meprin β ein wichtiger Faktor in der Funktion und Regulation des Immunsystems übernimmt (Banerjee und Bond 2008; Bylander et al. 2008; Banerjee et al. 2011; Banerjee et al. 2009; Yura et al. 2009; Broder und Becker-Pauly 2013b; Zhang et al. 2015).

Exemplarisch sei hier die Rolle Meprin β als proteolytischer Regulator an der Plasmamembran bei der Aktivierung von Interleukin 1 β (Herzog et al. 2009) und Interleukin 18 (Banerjee und Bond 2008) aufgeführt.

Physiologische Regulation erfordert ein fein abgestimmtes Milieu aus Signalmolekülen wie Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Rezeptoren und Peptidasen. Kommt es bei einem dieser Faktoren zu einem Ungleichgewicht, kann dies die Entstehung von Krankheit begünstigen.

So ist eine Überexpression von Meprin β mit diversen Krankheiten assoziiert. Daher besteht beispielsweise ein Zusammenhang mit fibrotischen Erkrankungen, wie der

Bildung von Keloiden (Kronenberg et al. 2010) und sowie der Ausbildung einer pulmonalen Hypertonie (Biasin et al. 2014).

Wie auch in anderen Geweben festgestellt (Broder und Becker-Pauly 2013b; Becker-Pauly und Pietrzik 2016; Ambort et al. 2010; Huguenin et al. 2008), übernimmt Meprin β auch im Gehirn wichtige Funktionen der Zell-Zell Adhäsion (Jefferson et al. 2011). Gindorf et al. konnten 2021 zeigen, dass die Aktivität von Meprin β Einfluss auf die Integrität der Blut-Hirn-Schranke hat (Gindorf et al. 2021a). Eine veränderte Integrität der Blut-Hirn-Schranke geht unter anderem mit einer Auflösung der Tight Junctions und einer erhöhten parazellulären Permeabilität einher. Diese Veränderung werden bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen, wie dem Morbus Parkinson, Chorea Huntington, der Amyotrophe Lateralsklerose, der Multiplen Sklerose und dem Morbus Alzheimer beobachtet (Jiang et al. 2018; Palmer 2010; Prakash und Carmichael 2015).

2.3.4 Regulation

Meprin β wird als inaktives Zymogen exprimiert, welches erst durch das Abspalten seiner Propeptide seine proteolytische Fähigkeit erhält. Hierfür wurden mehrere tryptische Serinproteasen wie Kallikrein 4,5 und 8 sowie pankreatisches Trypsin identifiziert (Ohler et al. 2010). Hierbei ist Trypsin vor allem im Intestinum von großer Wichtigkeit (Schütte et al. 2014), Kallikrein jedoch in der Haut und Geweben mesenchymalen Ursprungs (Ohler et al. 2010).

Basierend auf der Kristallstrukturanalyse der Ektodomäne humanen Meprin β zeigten Arolas et al. im Jahr 2012, dass die Aktivierungsdomäne an der Aminosäurenposition Arginin 61 (Arg61) große Nähe zur Zelloberfläche aufweist (Arolas et al. 2012).

Becker-Pauly und Pietrzik brachten daher die Vermutung an, dass Meprin β in seinem membrangebundenen Zustand nicht von gelösten Enzymen aktiviert werden kann, da nicht einmal Trypsin dazu in der Lage ist (Becker-Pauly und Pietrzik 2016).

Im Jahr 2015 zeigten Untersuchungen, dass Meprin β durch das membrangebundene Enzym Matriptase 2 in seinen aktiven Zustand überführt werden kann. Dies geht auch mit einer erhöhten Prozessierung von APP einher (Jäckle et al. 2015). Des Weiteren konnte dargestellt werden, dass die Matriptase 2 auch selbst mit APP interagieren und durch es gehemmt werden kann (Beckmann et al. 2016).

Doch nicht nur die Abspaltung des Propeptids scheint Einfluss auf die Aktivität von Meprin β zu haben, sondern auch die Struktur von APP selbst. Posttranslationale Modifikationen können die Prozessierung und die Bildung von A β beeinflussen. Sieben solcher Modifikationen sind bereits bekannt. Eine davon ist Ser-675 (APP695) welche eine Phosphorylierung in der zytoplasmatischen Domäne von APP darstellt. Diese verändert das Gleichgewicht in der APP-Prozessierung und führt zu einer erhöhten Aktivität von Meprin β und einer erniedrigten Aktivität von Meprin α , was zu einer verstärkten Bildung von A β _(2-40/42) führt (Menon et al. 2019; Armbrust et al. 2024a). In Mausmodellen konnte auch verdeutlicht werden, dass ein knock out für Meprin β bei Mäusen zu einer Reduktion der A β Produktion kommt (Marengo et al. 2022). Auch Phosphorylierung am Molekül wirkt sich auf seine Aktivität aus (Armbrust et al. 2021).

Neutralisiert wird Meprin β durch ein bereits wohl bekanntes Molekül, A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10 (kurz ADAM 10), welche auch die α -Sekretase für APP darstellt, löst Meprin β von der Zelloberfläche ab (Jefferson et al. 2013; Scharfenberg et al. 2019). Gelöstes Meprin β ist nicht in der Lage eine β -Sekretase-Funktion auszuüben (Bien et al. 2012).

Als alternative β -Sekretase stellt Meprin β einen wichtigen Faktor in der Pathophysiologie des Morbus Alzheimer dar und macht eine genauere Erforschung seiner Regulation und beeinflussenden Faktoren unabdingbar (Scharfenberg et al. 2019).

So kann die Entwicklung monoklonaler Antikörper sich nicht nur allein gegen Meprin β selbst, sondern auch gegen seine regulierenden Faktoren in der Entwicklung einer Therapie von Vorteil sein.

2.4 Monoklonale Antikörper

Antikörper sind ein integraler Bestandteil der humoralen Immunabwehr. Sie ermöglichen es Antigene hochspezifisch zu erkennen und nicht kovalent zu binden. Die Bindung des Antikörpers macht das Antigen für zelluläre Immunzellen sichtbar, was auch als Opsonierung bezeichnet wird (Behring 1890; Scott et al. 2012; Campbell D. H. et al. 1943). Das Antigen kann dadurch endozytiert und degradiert werden. Ersten Anhalt für ihre Existenz lieferten Behring und Kitasato schon im Jahr 1890 (Behring 1890).

2.4.1 Molekulare Struktur und physiologischer Hintergrund

Die Y-förmigen Proteine werden durch aktivierte B-Zellen produziert (Fagraeus 1948). Ihre molekulare Struktur konnte durch die Arbeit Porter und Edelman beschrieben werden (PORTER 1959; EDELMAN und POULIK 1961). Die Entwicklung der ELISA-Technologie im Jahr 1971 machte es zudem möglich spezifische Antikörper zu identifizieren und ihre Bindungseigenschaften zu untersuchen (Engvall und Perlmann 1971).

Die molekulare, Y-förmige Struktur eines Antikörpers setzt sich aus vier Polypeptidketten zusammen. Jeweils zwei identischen schweren Ketten und zwei leichten. Alle bestehen aus vier Untereinheiten. Die beiden Arme des Y bilden das antigen-binding fragment (Fab), welches die variable Domäne enthält, die an das Antigen binden kann (Han et al. 2025). Den Stamm bildet die Fc Region (fragment crystallizable). Diese bestimmt über die Antikörperklasse bzw. seinen Isotyp. (Moorthy et al.; Abdeldaim und Schindowski 2023) Die Arme, sowie der Stamm sind mittels Disulfidbrücken miteinander verbunden. Durch die Auflösung dieser Brücken zerfällt der Antikörper in seine Ketten und es bildet sich das klassische Muster in der Polyacrylamidelektrophorese aus. Es zeigen sich so zwei Banden bei 50kDa und zwei bei 20kDa. (Roux 1999; Alkan 2004).

2.4.2 Herstellung monoklonaler Antikörper

Monoklonale Antikörper (mAbs) sind labortechnisch hergestellte Moleküle, welche die Fähigkeit besitzen eine Zielstruktur hochspezifisch zu erkennen (Bilal Malik, Abhijeet Ghatol 2024). Sie imitieren damit die Fähigkeit der vom Immunsystem produzierten Antikörper (Danaher Liife Scinces 2024). Ihre Entdeckung revolutionierte die moderne Medizin und findet mittlerweile in vielen Fachbereichen, darunter der Krebsforschung, der Immunologie und der Infektiologie, seine Anwendung (Kothari et al. 2024; Singh et al. 2023; Alkan 2004).

Die Lebenszeit einer Antikörper produzierenden B-Zelle ist begrenzt (Alkan 2004). Daher entwickelten Köhler und Milstein eine Technologie, die nicht nur mAbs in großer Menge produzieren kann, sondern dazu noch immortale Antikörper produzierende Hybridzellen erzeugt (Köhler und Milstein 2005). Bei der Herstellung dieser Hybridomazellen wird in einen Donororganismus, meistens Mäuse, das Antigen injiziert, gegen das man einen Antikörper entwickeln möchte. Durch das Antigen werden in dem Organismus B-Zellen aktiviert und sie beginnen nach einer gewissen Inkubationszeit Antikörper zu produzieren. Vier Tage nach der letzten

Inkubation wird dem Organismus die Milz entnommen und B-Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert.

Als nächstes findet eine Fusion der B-Zellen mit unsterblichen Myelomzellen statt, die entweder chemisch mittel Polyethylenglykol (PEG) oder mittels Elektrofusion durchgeführt wird.

Nach der Fusion entstehen neben stabilen Hybridomazellen auch dysfunktionale Zellen. Diese kann man durch eine Inkubation im HAT Medium selektieren und nur stabile Zellen bleiben übrig. Jedoch nicht jede dieser Hybridomazellen produziert einen Antikörper und noch weniger den gewünschten. Man geht davon aus, dass aus einer Hybridomazellkultur von ca. 10.000 Hybridomazellen nur wenige 100 einen gewünschten Antikörper produzieren können. (Köhler und Milstein 2005). Durch mehrere Verdünnungsschritte werden nun die Zellen vereinzelt und auf ihre jeweilige Antigenspezifität geprüft. Der Antikörper wird von der Zelle in das umliegende Nährmedium sezerniert und kann so gewonnen werden. (James und Bell 1987)

3. Material

3.1 Eukaryotische Zellen

- HEK293T von Cannon und Schrittmacher 1993

3.2 Plasmide

3.2.1 Expressionsplasmide zur Zelltransfektion

- pCMV6-Entry-meprin-beta Origene, Rockwood
- pCMV-Leervektor Fisher Scientific, Schwerte

3.3 Antikörper

3.3.1 Primäre Antikörper

Bezeichnung	Spezies	Typ	Verdünnung	Hersteller/Referenz
Anti α -Tubulin	Maus	monoklonal	1:1000 in 5%iger Milch	ThermoFisher, Darmstadt
Anti-human Meprin β	Ziege	polyklonal	1:1000 in 5%iger Milch	R&D Systems
8D5	Maus	monoklonal	1:10 in TBST	Karsten Korth, AG Pietrzik, Mainz
19F5	Maus	monoklonal	1:10 in TBST	Karsten Korth, AG Pietrzik, Mainz
7D10	Maus	monoklonal	1:10 in TBST	Karsten Korth, AG Pietrzik, Mainz
18A6	Maus	monoklonal	1:10 in TBST	Karsten Korth, AG Pietrzik, Mainz
17E7	Maus	monoklonal	1:10 in TBST	Karsten Korth, AG Pietrzik, Mainz
9BP	Maus	monoklonal	1:10 in TBST	Karsten Korth, AG Pietrzik, Mainz
6H11	Maus	monoklonal	1:10 in TBST	Karsten Korth, AG Pietrzik, Mainz
1YFS	Maus	monoklonal	1:10 in TBST	Karsten Korth, AG Pietrzik, Mainz
7D2	Maus	monoklonal	1:10 in TBST	Karsten Korth, AG Pietrzik, Mainz
10G12	Maus	monoklonal	1:10 in TBST	Karsten Korth, AG Pietrzik, Mainz
7H1	Maus	monoklonal	1:10 in TBST	Karsten Korth, AG Pietrzik, Mainz
8E3	Maus	monoklonal	1:10 in TBST	Karsten Korth, AG Pietrzik, Mainz
2C3	Maus	monoklonal	1:10 in TBST	Karsten Korth, AG Pietrzik, Mainz
19DS	Maus	monoklonal	1:10 in TBST	Karsten Korth, AG Pietrzik, Mainz
12F9	Maus	monoklonal	1:10 in TBST	Karsten Korth, AG Pietrzik, Mainz

6E7	Maus	monoklonal	1:10 in TBST	Karsten Korth, AG Pietrzik, Mainz
18C7	Maus	monoklonal	1:10 in TBST	Karsten Korth, AG Pietrzik, Mainz
16D4	Maus	monoklonal	1:10 in TBST	Karsten Korth, AG Pietrzik, Mainz
14D5	Maus	monoklonal	1:10 in TBST	Karsten Korth, AG Pietrzik, Mainz
21F5	Maus	monoklonal	1:10 in TBST	Karsten Korth, AG Pietrzik, Mainz
9G3	Maus	monoklonal	1:10 in TBST	Karsten Korth, AG Pietrzik, Mainz
1SE4	Maus	monoklonal	1:10 in TBST	Karsten Korth, AG Pietrzik, Mainz

Tab. 1: Liste der verwendeten primären Antikörper

3.3.2 Sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Konjugat	Verdünnung	Hersteller
Anti-Ziege-IgG	HRP	1:10.000 in 5%iger Milch	ThermoFisher, Darmstadt
Anti-Maus-IgG	HRP	1:10.000 in 5%iger Milch	ThermoFisher, Darmstadt

Tab. 2: Liste der verwendeten sekundären Antikörper

3.4 Reagenzien

3.4.1 Chemikalien

- | | |
|----------------------------------|---------------------------|
| - Acrylamid 40%/Bisacrylamid | Roth, Karlsruhe |
| - Ammoniumpersulfat (APS) | Sigma, Deisenhofen |
| - Ammoniumchlorid | Roth, Karlsruhe |
| - DMSO | Roth, Karlsruhe |
| - Ethanol | Roth, Karlsruhe |
| - Ethidiumbromid | Sigma, Deisenhofen |
| - Fötales Kälberserum | Gibco Paisley, Schottland |
| - Igepal (NP40) | Sigma, Deisenhofen |
| - Isopropanol | Roth, Karlsruhe |
| - Magermilchpulver | Ralphs, Kalifornien |
| - Natriumazid (NaN_3) | Merck, Darmstadt |
| - PBS | Gibco Paisley, Schottland |
| - Poliethylenimine (PEI) | |

- | | |
|--------------------------|---------------------------|
| - Poly-L-Ornithin | Merck, Darmstadt |
| - Ponceau S | Roth, Karlsruhe |
| - Protease Inhibitor | Roche, Mannheim |
| - Rinderalbumin (BSA) | Pierce, Bonn |
| - Sodiumdodesulfat (SDS) | BioRad, München |
| - Trypsin/EDTA | Gibco Paisley, Schottland |
| - Tween 20 | Sigma, Deisenhofen |

3.4.2 Zellkulturmedium

- | | |
|------------|---------------------|
| - DMEM | Gibco/BRL, Eggstein |
| - OptiMEM™ | Gibco, Eggstein |

3.4.3 Antibiotika

- | | |
|---------------------------|-----------------------|
| - Penicillin/Streptomycin | Invitrogen, Karlsruhe |
|---------------------------|-----------------------|

3.4.4 Reagenzienzusätze (Kits)

- | | |
|--|------------------|
| - BCA 200 Protein Assay Kit | Pierce, Bonn |
| - Immobilon Western Reagenzien A und B | Merck, Darmstadt |

3.5 Software

- Adobe Photoshop CS4
- ADAP 1.6
- GraphPad Prism 4
- Image Reader LAS-3000
- Image J
- Microsoft Word
- Microsoft Excel

3.6 Geräte und Laborhilfsmittel

- | | |
|--|-----------------------------|
| - Agarose Gelelektrophorese System Agagel Mini Biorad, München | |
| - Aspirator | Starlap, Hamburg |
| - Heracell 240i-Inkubator | Thermo Scientific, Dreirich |
| - Erlenmeyerkolben | Schott, Mainz |
| - Flachbettschüttler Rocky® | Förbel Labortechnik, Lindau |

- Flachbettschüttler Unitwist-RT	UniEquib, Planegg
- Gefrierschrank -80°C	Haraeus, Hanau
- Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Kirchhoff
- Heizblock	Eppendorf, Hamburg
- Kühlschrank +4°C	Liebherr, Kirchhoff
- LAS-3000 FujiFilm	FujiFilm, Fuji, Japan
- LEDetect96 Photometer	Anthos Mikrosysteme, Burkamp
- Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen
- Lichtmikroskop Olympus CKX41	Evident, Hamurg
- Magnetrührer MR 3000D	Heidolph, Schwabach
- Mikrowelle	Medion, Essen
- Mini Protean III Gel und Transblot System	Biorad, München
- Mini Protean III Western Transblot System	Biorad, München
- Mr Frosty™ Gefrierbehälter	ThermoFisher; Darmstadt
- Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe
- Pipetten 1µl-1000µl	Gilson, Limburg-Offheim
- Pipettierhilfe	Thermo Scientific, Dreirich
- Spektrometer	Eppendorf, Hamburg
- Sterilbank Herasafe	Hereaus, Hanau
- Sterilbank Safemate 1.2 Version	Euroclone, Pero, Italien
- Thermocycler T3	Biometra, Göttingen
- Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
- Ultratiefkühlschrank Forma™ -86°C	ThermoFisher, Darmstadt
- Vortexer	VWR, Darmstadt
- Waage Mettler AE160	Mettler Toledo, Gießen
- Waage Denver Instrument XP-1500	Fisher Scientific, Schwerte
- Wasserbad GFL 1056	GFL, Burgwedel
- Zentrifuge Universal 320R	Hettich, Tuttlingen
- Zentrifuge Mikro 200R	Hettich, Tuttlingen

3.7 Verbrauchsmaterialien

- Einmalhandschuhe Kunststoff	Roth, Karlsruhe
- Einmalhandschuhe Latex	Roth, Karlsruhe
- Einmalhandschuhe Nitril	VWR, Darmstadt

- Filterpapier	Schleicher & Schuell Dassel
- Gewebekulturschalen (6cm und 10cm)	TPP, Trasadingen, Schweiz
- Glaspipetten 5-25ml	VWR, Darmstadt
- Kryoröhrchen	Apogent, Wiesbaden
- Nitrocellulosemembran Protan	Schleicher & Schuell, Dassel
- Pipettierspitzen 0,1-1000µl	Starlab, Ahrensburg
- Plastikpipetten 10ml	TPP, Trasadingen, Schweiz
- Eppendorfreaktionsgefäße 1,5 und 2ml	Eppendorf, Hamburg
- Falcon Plastikröhrchen 15 und 50ml	Greiner, Frickenhausen
- Zellspachtel	TPP, Trasadingen, Schweiz

3.8 Puffer und Lösungen

3.8.1 Lösungen und Medien für die Zellkultur

DMEM Komplettmedium für HEK293T

- 500ml DMEM Medium
- 10ml 10%iges Fetales Kälberserum (FCS)
- 5ml Natriumpyrovat
- 100 U/l Penicillin und 100µg Streptomycin

Gepufferte Salzlösung (PBS)

- 137 mM NaCl
- 2,7 mM KCl
- 10 mM NaH₂PO₄
- 1,8 mM KH₂PO₄

Medium für die Kryokonservierung

- 10% (v/v) DMSO mit dem jeweiligem Zellkulturmedium

3.8.2 Puffer und Lösungen für die Polyakrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot

4x Laufpuffer (pH 8,8)

- 1,5M Tris Base

- 0,4% SDS

Sammelpuffer (pH 6,8)

- 0,6M Tris Base
- 0,4% (w/s) SDS

SDS-Page Laufpuffer (pH 8,3)

- 25mM Tris Base
- 192mM Glycin
- 0,1% (w/s) SDS

10x Blotpuffer

- 25mM Tris Base
- 192mM Glycin
- H₂Odd

Poncau S

- 0,2% (w/v) Ponceau S
- 3% (v/v) Trichloressigsäure
- H₂Odd

Blockierungspuffer

- 1x TBS-T
- 5% (w/s) Magermilchpulver

SDS-Probenpuffer

Roti®Load der Firma Carl Roth

- 8% SDS
- 20% β-Mercpto-Ethanol
- 40% Glycerol
- 0,015% Bromophenolblau
- phosphatgepuffert

3.8.2 Puffer und Lösungen für die Proteinbiochemie

10x Tris gepufferte Salzlösung (TBS) pH 7,4

- 1,37 M NaCl
- 27 mM KCl
- 0,25 M Tris-Base
- ddH₂O

Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween20 (TBS-T)

- 1x TBS
- 0,05% (v/v) Tween

NP40-Puffer

- 50 mM Tris
- 150 mM NaCl
- 1% NP40 Lysepuffer
- 0,02% NaN₃

Lysis-Puffer

- NP40-Puffer Lysepuffer
- 1x Protaseinhibitor
- ddH₂O

4. Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

4.1.1 Kultur eukaryotischer Zellen

Die Arbeit an der Zellkultur erfolgt unter aseptischen Bedingungen unter einer Sterilbank. Kulturmedien werden vor dem Benutzen in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt. Dem Kulturmedium (hier DMEM) wurde vor Gebrauch 1% Natriumpyruvat, Penicillin/Streptomycin und 10%iges Fetales Kälberserum (FCS) hinzugefügt.

Im Brutschrank werden die Zelllinien bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Für die Versuche in dieser Arbeit werden Human Embryonal Kidneycells (HEK) 293T verwendet.

Eine Wachstumskontrolle unter dem Mikroskop und ein Wechsel des Kulturmediums erfolgte alle drei Tage.

Alle nicht steril abgepackten Materialien sowie Oberflächen der Sterilbank werden vor und nach Benutzung mit 70%igem Ethanol desinfiziert, um eine Verunreinigung der Kultur sowie des Arbeitsbereiches zu vermeiden.

4.1.1.1 Auftauen und Kulturanlage von eukaryotischen Zellen nach Lagerung in flüssigem Stickstoff

Um Zelllinien über längere Zeit lagern zu können werden diese bei einer Temperatur von -196°C eingefroren. Diese nun, zur weiteren Kultur, aufzutauenden Zellen bedürfen eines bestimmten Auftauprozesses.

- Universal 32 Hettich®
- Wasserbad GFL 1056®
- Aspirator Star Lab Instruments®
- s@fe mate 1.2 vision Bio Air a eurolone® devison
- Heracell 240i CO₂ Incubator – Thermo Scietific®
- Kulturmedium
- HEK293T
- Falcon Gefäße

Das Eppendorf Gefäß wird unter den geltenden Sicherheitsbestimmungen aus dem Stickstofftank entfernt und der Probe einige Milliliter warmen Kulturmediums

hinzugegeben. Durch stetiges Resuspendieren werden die Zellen in Lösung gebracht und Stück für Stück in ein 10ml Falcon Gefäß überführt. Dieses wird nun mit Kulturmedium auf 10ml aufgefüllt.

Anschließend wird das Gefäß für vier Minuten bei 1000 Rotationen pro Minute zentrifugiert. Der Supernatant, in welchem noch Reste des zur Kryokonservierung nötigen Dimethylsulfoxid (DSMO) enthalten sind, werden mithilfe eines Aspirators abgesaugt. Dem verbleibenden Pellet wird 10ml frisches Medium hinzugefügt und so suspendiert, bis der Pellet sich vollständig aufgelöst hat. Die nun im Medium gelösten Zellen werden samt Medium auf eine Gewebekulturschale von 10cm Durchmesser überführt.

Diese wird nun für 24 Stunden im Inkubator bebrütet. Eine Kontrolle des Wachstums der Zellen und ein erster Mediumwechsel erfolgen nach 24h Inkubation.

4.1.1.2 Passagieren von eukaryotischen Zellen

In Abhängigkeit von der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen müssen diese alle zwei bis vier Tage passagiert werden. Eine Prüfung der Notwendigkeit des Passagierens erfolgt optisch mithilfe des Mikroskops.

Zellen können nur bis zu einer bestimmten Dichte in einer Monoschicht wachsen. Durch eine Kontaktinhibition werden diese beeinträchtigt, was bis zum Absterben der Kultur führen kann.

HEK923T bilden zwar adhärente Strukturen zur Oberfläche der Kulturschale aus, jedoch sind diese nicht stark genug, um leichter mechanischer Krafteinwirkung widerstehen zu können. Um einer Beeinträchtigung der Zellen durch das sonst verwendete Trypsin/EDTA zur Auflösung der Zellen von der Oberfläche entgegenzuwirken, wurde hier auf dieses verzichtet. Die Zellen werden durch vorsichtiges Abspülen des Zellrasens mit Phosphat Gepufferter Salzlösung (PBS) von der Oberfläche abgelöst.

- Kulturmedium
- PBS
- Universal 32 Zentrifuge - Hettich®
- Olympus CKX41 – Olympus livescience®
- Aspirator – Star Lab Smart Instruments®
- Falcongefäße
- Kulturschalen (10cm Durchmesser)

- Glas Absaugpipetten
- s@fe mate 1.2 vision Bio Air a eurolone® devison

Das alte Kulturmedium wird mithilfe des Aspirators abgesaugt und Kultur unter leichtem Schwenken mit PBS gewaschen, um totes Zellmaterial aus dem Zellrasen herauszulösen. Anschließend wird 10ml frisches Medium hinzugegeben. Durch resuspendieren wird der Zellrasen nach und nach abgelöst und die Zellen in Lösung gebracht. Diese wird in ein 15ml Falcon Gefäß überführt und vier Minuten mit 1000 Rotationen pro Minute zentrifugiert.

Durch die Zentrifugation bildet sich am Boden des Gefäßes ein Pellet, in dem die Zellen aus der Kultur enthalten sind. Der dabei ebenfalls entstehende Supernatant wird abgesaugt und der Pellet in fünf Milliliter frischem Medium gelöst.

Im Anschluss werden 1 Milliliter dieser Zellsuspension auf eine neue Kulturplatte aufgetragen und die Zellen durch sanftes Schwenken verteilt. Am Ende wird die Kulturplatte auf eine Verdünnung von 1:10 mit frischem Medium aufgefüllt.

4.1.1.3 Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen

Um Zellen über einen längeren Zeitraum lagern zu können, müssen diese in einem Tank mit flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert werden.

- Mr. Frosty™ Gefrierbehälter – ThermoFisher Scientific®
- Forma™ -86°C Ultratiefkühlschrank – ThermoFisher Scientific
- Universal 32 Hettich®
- DMSO
- PBS
- Kulturmedium
- Kryoröhrchen
- Falcon Gefäße

Zunächst wird die Kultur, wie beim Passagieren (siehe Kapitel 4.1.1.2 Passagieren von eukaryotischen Zellen), mit PBS gewaschen und mit frischem Kulturmedium von der Oberfläche der Kulturschale abgelöst.

Die daraus entstehende Zellsuspension wird in ein 15ml Falcon Gefäß transferiert und vier Minuten mit 1000 Rotationen pro Minute zentrifugiert.

Auch hier wird der Supernatant abgesaugt. Um eine hohe Konzentration an Zellen in der einzufrierenden Zellsuspension zu erhalten, wird das Pellet in zwei Millilitern frischen Mediums gelöst.

In das für die Kryokonservierung vorgesehene Kryoröhrchen werden 900µl der Suspension gegeben und 100µl Dimethylsulfoxid (DSMO) hinzugefügt. DSMO verhindert das Entstehen von Eiskristallen und dient somit den Zellen als Frostschutzmittel.

Um die Zellen durch den Einfrierprozess keinen zu großen Schaden zuzufügen, werden sie mithilfe der Kühlbox Mr. Frosty™ von ThermoFisher® Scientific im Eisschrank über 24 Stunden auf -80°C heruntergekühlt. Anschließend erfolgt die Überführung in den Stickstofftank.

4.1.1.4 Bestimmung der Zellzahl in einer Kultur mithilfe der Neubauerkammer

Um eine bestimmte Menge an Zellen auf eine Zellkulturplatte auszusähen, wie es für eine transiente Transfektion (siehe Kapitel 4.3.1 Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen) nötig ist, wurde hier die Methode nach Neubauer angewandt. Dabei wird die Zellkultur in Suspension gebracht und verdünnt. Mithilfe Neubauerkammer können die Zellen in einem Raster gezählt werden und so die Zellzahl der Kultur mathematisch bestimmt werden.

- Neubauerkammer
- 10ml Falcon Gefäß
- 1,5ml Eppendorf Gefäß
- Olympus CKX41 – Olympus livescience®
- s@fe mate 1.2 vision Bio Air a eurolone® deivison

Durch Resuspendieren wird der Zellrasen von der Oberfläche der Zellkulturschale abgelöst und die Zellen im Medium gelöst. Diese Suspension wird in ein 10ml Falcon Gefäß überführt woraus 100µl entnommen werden und in ein Eppendorf Gefäß mit 900µl frischen Mediums transferiert.

Aus diesem Gefäß wird die Neubauerkammer mithilfe einer Pipette befüllt. Zu beachten ist, dass die Neubauerkammer lediglich 0,1µl zu fassen vermag.

Mithilfe des Mikroskops können nun die Zellen in den vier Rastern gezählt und die Zellzahl der Kultur berechnet werden.

Nach folgendem Prinzip wurden die Zellzahlen in den hier durchgeführten Versuchen berechnet:

$$Z \times VF \times V \times 10^4 = \text{Gesamtzahl der Zellen im Gesamtvolumen}$$

Z = Mittelwert der Zellzahlen aus allen vier Rastern

VF = Verdünnungsfaktor (hier VF = 10)

V = Volumen in denen die Zellen gelöst sind (hier 10ml)

10^4 = Kammerfaktor, welcher sich aus dem Fassungsvermögen der Neubauerkammer ergibt (hier 0,1µl).

Das Einbeziehen des Kammerfaktors ermöglicht kann die ermittelte Zellzahl auf einen Milliliter bezogen werden.

4.2 Proteinbiochemische Methoden

4.2.1 Zelllyse

Um Membran- und zytosolische Proteine in der SDS-Gelelektrophorese nach ihrer Größe auftrennen zu können, muss lipidhaltige Membran der Zelle aufgelöst werden.

Dies geschieht mithilfe des hier verwendeten NP40 Lysepuffers. Um die Denaturierung und den Abbau der Proteine durch zytosolische Proteasen zu verhindern, werden fast alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt und ein Proteaseinhibitor hinzugefügt.

- Eiswanne mit Eis
- Zellschaber
- Vortex Mixer - VWR®
- Mikro 200 – Hettich Zentrifugen®
- NP40 Lysepuffer
- Proteaseinhibitor (PI) – Merck®
- PBS
- Waage Mettler AE 160 - Mettler®

Die dicht gewachsene Zellkultur wird auf Eis gelegt und das Medium mit einem Vakuumaspirator entfernt. Um apoptotische Zellen zu entfernen wird zwei Mal mit 500µl eiskalten PBS gewaschen. Unter Zugabe von einem Milliliter PBS wird der Zellrasen mit einem Zellschaber von der Oberfläche der Kulturplatte abgeschabt und

unter wiederholten Resuspendieren in ein Eppendorf Gefäß überführt. Es folgt eine vierminütige Zentrifugation mit 14.000 Rotationen pro Minute bei 4°C.

Der Überstand wird abgesaugt und das verbleibende Pellet mithilfe einer Feinwaage gewogen. Nun wird massenadaptiert der Lysepuffer NP40 (4µl/mg) und Proteaseinhibitor (1/50 des Gesamtgewichts) dem Pellet hinzugefügt. Über 20 Minuten wird auf Eis inkubiert und alle fünf Minuten gevortext. Der hierbei entstehende Überstand enthält nun die freien Proteine. Dieser wird in ein frisches Eppendorf Gefäß überführt und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C eingefroren.

4.2.2 Herstellung von Gewebelysaten aus Niere und Gehirn von Mäusen

Wie schon bei schon im Kapitel 4.2.1 Zell Lyse beschrieben, geht es auch bei der Herstellung von Gewebelysaten und die Auflösung der Membranstruktur der Zelle. Der Arbeitsvorgang ist hier der Zell Lyse recht ähnlich jedoch unterscheidet er sich in einigen Punkten.

Das Organ wird mit einer Feinwaage gewogen, um die zu applizierende Menge Lysepuffer (hier Radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA)) und Proteaseinhibitor berechnen zu können.

Jetzt werden Organ und Pufferlösung in einen manuellen Homogenisierer gelegt und mit einer bestimmten Anzahl von Hüben (Niere 40 Hübe; Gehirn 30 Hübe) homogenisiert. Auch wird über 20 Minuten auf Eis inkubiert und alle fünf Minuten gevortext. Danach wird das Lysat in ein Eppendorf Gefäß überführt und für 20 Minuten mit 14.000 Rotationen pro Minute bei 4°C zentrifugiert.

Der der Überstand wird in ein frisches Eppendorf Gefäß überführt und das zurückbleibende Pellet verworfen. Das Lysat wird bis zur weiteren Benutzung bei -20°C eingefroren.

4.2.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den verwendeten Zell- und Gewebelysaten wurde mithilfe eines BCA-Test-Kits der Firma Pierce ein BCA-Assay nach Smith (P. K. SMITH,* R. I. KROHN, G. T. HERMANSON, A. K. MALLIA, F. H. GARTNER 1985) durchgeführt.

Die auf einer Biuret-Reaktion basierende Methode nutzt die Reduktion von Kupferionen durch Komplexbildung von Proteinen mit Kupferionen im alkalischen

Milieu. Die Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ führt zu einer Komplexbildung mit Bichinolin-4-Carbonsäure (BCA), welche aus je einem Kupferion und zwei Bichilonmolekülen bestehen.

Da so die Proteinkonzentration in proportionalen Zusammenhang mit der Bildung von Chelatkomplexen steht, kann mit einem Photometer aus der Extinktion aus die Proteinkonzentration geschlossen werden.

Eine Eichgerade zur Referenz wird mit Bovinem Serumalbumin (BSA) angelegt. Die entsprechenden Pipettierschemata sind im folgenden Prozessablauf aufgeführt.

- BCA-Test-Kid von Pierce® Reagenz A und B
- Bovines Serumalbumin (BSA)
- dH₂O
- Thermomixer 5436 von Eppendorf®
- Vortex Mixer von VWR®
- Photometer von Atos Mykrosystem GmBh®
- Software: ADAP 1.6 Labtec Instruments

Zuerst wird der BSA-Ansatz nach folgendem Pipettierschema hergestellt:

Endkonzentration [µg/ml]	dH₂O [µl]	BSA-Standard 1mg/ml [µl]
0	50	0
0,1	45	5
0,2	40	10
0,3	35	15
0,4	30	20
0,5	25	25

Tab. 3: Pipettierschema zur Herstellung des BSA-Ansatzes

Die zu untersuchenden Proben werden mit destilliertem Wasser (dH₂O) auf ein Verhältnis von 1:50 verdünnt (5µl Proteinprobe+ 45µ dH₂O).

Zu den Proben wie zu den Proben der BSA-Standartreihe werden je 1ml der Reaktionslösung gegeben. Diese besteht aus dem Reagenz A (BCA) und Reagenz B (4% $\text{CuSO}_4 + 5\text{H}_2\text{O}$) welche im Verhältnis 1:50 zusammengemischt werden.

Nun werden allen Proben für 30 Minuten im Shaker unter leichtem Schütteln bei 60°C inkubiert.

Im Anschluss erfolgt die Bestimmung der Extinktion bei 562nm der Proben im Doppelansatz mithilfe des Photometers.

4.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE nach Lämmli findet bis heute häufige Anwendung in der Analyse von Proteinen. Dabei wird sich das Verhalten der Proteine im elektrischen Feld zu Nutze gemacht.

Durch das im Gel enthaltene Acrylamid und Bisacrylamid entsteht ein feinmaschiges Netz, welches von den Proteinen aufgrund ihrer Größe verschieden gut passiert werden kann. Je höher sein Anteil am Gesamtvolumen des Gels, desto kleiner sind die Maschen und kleine Proteine können das Gel schneller passieren als größere.

Da Proteine durch die Summe der isoelektrischen Punkte seiner Aminosäuren eine eigene Ladung besitzen, ist auch ihre Wanderungsrichtung verschieden. Um diese Ladungsunterschiede zu überdecken, wird SDS (Natriumdodecylsulfat) als anionisches Detergens verwendet. Dieses überdeckt die Eigenladung der Proteine, indem es sich, selbst stark negativ geladen, an die Proteine anlagert. Dadurch wandern alle Proteine in eine Richtung und können so nach ihrer Größe ohne Einfluss der Eigenladung im Gel aufgetrennt werden.

Für alle Versuche wurden Minigelsysteme der Firma BioRad 10% mit 1,5mm Dicke und 15 well verwendet. Die Taschengröße beträgt 40µl/well.

Diese diskontinuierlichen Gele bestehen aus einem großporigen Trenngel (geringer Anteil von Bisacrylamid), in welchem die Proteinproben aufgetragen werden und einem engporigen Trenngel, in welchem sich die Proben nach der Größe im elektrischen Feld auftrennen.

4.2.4.1 Gießen von Polyacrylamidgelen

Um Proteine ihrer Größe nach auftrennen zu können, wurden hier Polyacrylamidgele der Firma Biorad verwendet. Genauere Hintergründe zu SDS-Gelelektrophorese und der Beschaffenheit der Gele finden sie unter dem Kapitel 4.2.4 SDS-Gelelektrophorese.

- Pipetten der Firma Eppendorf Research Plus®
- S1 Pipett Filter von Thermo Scientific®
- 4x Lauf-Puffer (1,5M Tris Base; 0,4% SDS; pH 8,8)
- 4x Sammel-Puffer (0,6M Tris Base; 0,4% SDS; pH 6,8)
- 10% APS (Ammoniumpersulfat)
- TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyldiamin)
- Isopropanol

- Zellstoff
- Gießständer
- Glasplatten mit Spacer
- Taschenkamm
- Falcon Gefäße

Vor Beginn werden alle Materialien mit voll entsalztem Wasser und 70% Ethanol gereinigt und mit Zellstofftüchern getrocknet, um mögliche Verunreinigungen durch vorherige Nutzer zu entfernen.

Danach werden beide Glasplatten in den Gießständer gespannt. Sämtliche folgende Schritte werden unter einem Abzug durchgeführt.

Pipettieren des Trenngels in ein 50ml Falcon Gefäß nach folgendem Schema:

Entsalzenes H ₂ O	5ml
Acrylamid 40% (29:1)	2,5ml
Laufpuffer pH 8,8	2,5ml
APS 10%	100µl
TEMED	10µl

Tab. 4: Pipettierschema für Trenngele

Mit Hinzugabe des TEMED als Polymerisationskatalysator beginnt das Acrylamid zu polymerisieren. Daher ist ein schnelles Pipettieren zwischen die beiden, im Gießständer eingespannten, Glasplatten angezeigt.

Nach einfüllen des Trenngels wird Isopropanol hinzugegeben, um den Rand des Gels zu glätten und so eine gerade Trennung zum Sammelgel, welches später aufgegossen wird, zu erzielen. Nach Einfüllen des Isopropanol lässt man das Gel 15 Minuten polymerisieren.

Danach wird das Isopropanol abgegossen, letzte Reste mit einem Zellstofftuch entfernt und weitere 15 Minuten stehen gelassen.

In dieser Zeit wird das Sammelgel angesetzt und nach Ablauf der Wartezeit auf das Trenngel aufgetragen.

Entsalzenes H ₂ O	1,563ml
Acrylamid 40% (29:1)	312µl
Sammelpuffer pH6,8	625µl
APS 10%	25µl
TEMED	5µl

Tab. 5: Pipettierschema für Sammelgele

Ist das Sammelgel aufgetragen, wird der Kamm aufgesteckt und das ganze für 30 Minuten bei Raumtemperatur polymerisiert. Anschließend wird das Gel in feuchten Zellstoff eingewickelt und in einer Luftdichten Tüte bei 4°C bis zur Benutzung gelagert.

In allen Versuchen wurde das Gel 20h gelagert, damit das Acrylamid voll auspolymerisieren kann.

4.2.4.2 Probenvorbereitung für die SDS-Gelelektrophorese

Um die, aus der Zelllyse und Gewebelyse gewonnen, Proteinlysate in der SDS-Gelelektrophorese nach der Größe aufzutrennen, ist es notwendig, dass sie in ihrer Primärstruktur vorliegen.

Dazu wird ein industriell hergestellter Ladepuffer der Firma Roth verwendet (ROTI®Load). Dieser enthält 4x Sodiumdodecylsulfat (SDS) und β -Mercaptoethanol. Während das β -Mercaptoethanol die Tertiärstruktur des Proteins aufbricht, entfaltet das SDS das Protein weiter bis in seine Primärstruktur und sorgt für eine negative Ladung des Proteins. Neben diesen beiden Stoffen enthält der Puffer Glycerin, welches die Proteine beschwert und so ein Absinken dieser in die Probetasche des Polyacrylamidgels ermöglicht.

Nach Zugabe des Probenpuffers werden die Proben im Thermoschaker Rocky 3D fünf Minuten bei 95°C inkubiert.

Nach Abkühlung werden die Proben entweder direkt in ein Gel geladen, oder bis zur Weiterverwendung bei -20°C eingefroren.

4.2.4.3 SDS-Gelelektrophorese

Um spontaner Proteindegradierung entgegenzuwirken, werden die Proben auf Eis aufgetaut und anschließend mit einem Vortexer (hier: Analog Vortex Mixer 230V®) gemischt, um eine gleichmäßige Verteilung der Proteine in der Lösung zu erreichen.

Danach werden die Proben in das Sammelgel aufgetragen und eine Spannung von 80V angelegt. Diese Spannung wird gehalten, bis die Proben vom Sammelgel in das Trenngel übergetreten sind und sich eine Lauffront bildet. Dieser Vorgang dauert im Durchschnitt 15 bis 20 Minuten. In diesem Schritt wandern die Proteine größenunabhängig durch das Sammelgel. Erst mit dem Übergang in das Trenngel, werden Proteine der Größe nach aufgetrennt. Sind die Proben in das Trenngel

übergetreten, wird die Spannung auf 150V erhöht und solange gehalten, bis die Lauffront das Ende des Gels erreicht hat (meist 50min).

4.2.5 Westernblotanalyse

4.2.5.1 *Western Blot und Naß-Blot-Verfahren*

Das Verfahren des Western Blots beschreibt die Übertragung der in der zuvor Polyacrylamidmatrix aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (W. NEAL BURNETTE 1981). Auch hier wird sich die negative Ladung der Proteine, die durch das Anheften von Sodiumdodecylsulfat (SDS) entstanden ist, zunutze gemacht. Durch hydrophobe Wechselwirkungen finden die Proteine beim Transfer in Richtung Anode Halt auf der Membran. Zusätzlich wird das angelagerte SDS abgetrennt und das Protein liegt nun „nackt“ auf der Membran vor.

- Blotpuffer (25mM Tris; 192mM Glycerin; 10% Methanol; H₂Odd)
- BioRad Power Pac HC®
- Eiswanne
- Zuvor verwendete BioRad Gele

Im Naßblottverfahren werden Gel und Membran, flankiert von zwei Whatmann-Filterpapieren aneinandergelegt. Diese Schichtung erfolgt in einem Bad aus Blotpuffer um eine luftblasenfreie Adaption der Flächen zu gewährleisten, welche für das Ergebnis essenziell ist. In einen Bloteinsatz verpackt werden Gel, Membran und Filterpapiere in die Blotkammer gesetzt und diese mit Puffer aufgefüllt.

Danach wird eine Spannung von 95V über zwei Stunden angelegt. Um einer Schädigung der Proteine und einer Störung des Transfervorgangs aufgrund der starken Wärmeentwicklung entgegen zu wirken, wird die gesamte Blotkammer in eine Eiswanne gestellt

4.2.5.2 *Anfärben der Proteine mit Ponceau S*

Um den Erfolg des Transfers auf die Nitrozellulosemembran zu kontrollieren, wird im Anschluss eine Proteinfärbung mit Ponceau S vorgenommen. Dieses Färbeverfahren färbt unspezifisch alle auf der Membran befindlichen Proteine an (Sander et al. 2019). Mit dem bloßen Auge kann hier eruiert werden ob mögliche Fehler in der Gelelektrophorese oder im Western Blot aufgetreten sind. Bei erfolgreichem Verfahren färben sich die Proteinbanden rötlich.

- Poncau S Lösung (0,2% Ponceau S; 3% Trichloressigsäure; H₂Odd)
- Shaker Rochy 3D®
- H₂Odd
- 1x TBST

Die Membran wird mithilfe einer Pinzette aus dem Bloteinsatz entfernt und in eine mit Ponceau S befüllte Wanne gelegt und eine Minute unter leichtem Schwenken gefärbt. Anschließend wird die Membran entnommen und das überschüssige Ponceau S mit H₂Odd abgespült.

Nach der Erfolgskontrolle wird das Ponceau S mit 1x TBST unter kontinuierlichem Schwenken entfernt. Dies wird 3x für fünf Minuten wiederholt.

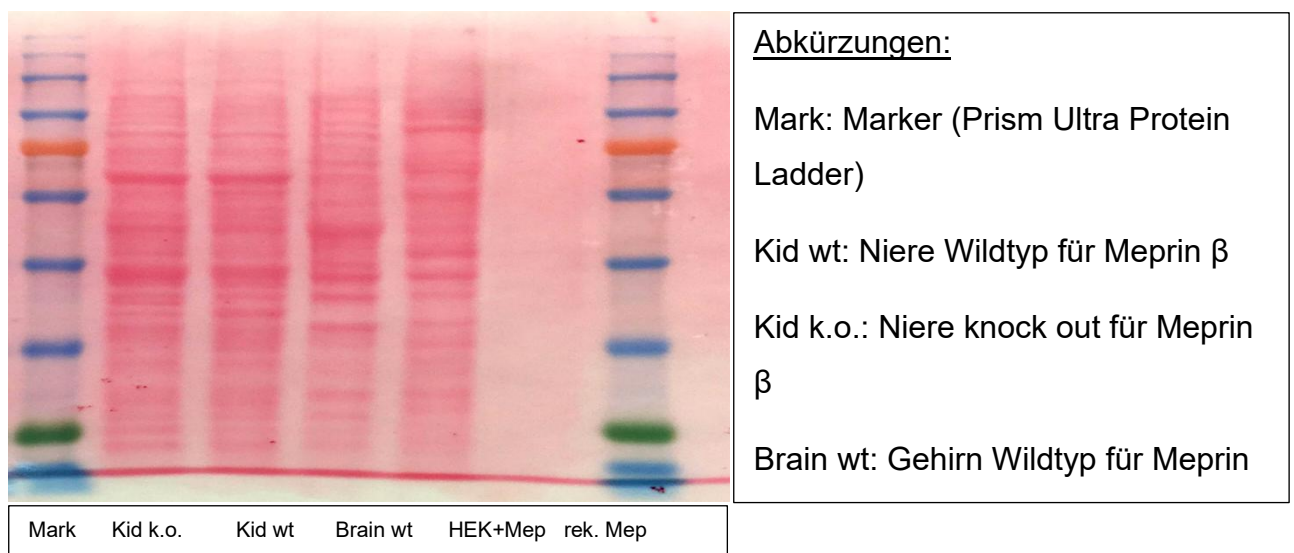


Abbildung 3 beispielhafte Poncau S Färbung

4.2.5.3 Blockierung unspezifischer Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran

Da die Nitrozellulosemembran Proteine binden kann, müssen noch frei Bindungsstellen blockiert werden. Freie Bindungsstellen könnten zu einer unspezifischen Bindung der Antikörper, welche selbst Proteine sind, führen und so das Ergebnis verfälschen. Um dies zu unterbinden wird die Membran mit der Lösung aus TBST und Magermilchpulver inkubiert.

- Schaker Rochy 3D®
- Blocklösung (TBST, 5% Magermilchpulver)
- TBST

Membran wird eine Stunde unter konstantem Schwenken mit der Lösung inkubiert. Anschließend wird überschüssige Lösung mit TBST für drei mal fünf Minuten abgespült.

4.2.5.4 Immunodetektion

In den vorherigen Arbeitsschritten wurden die Proteine aus der Gelelektrophorese aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen.

Diese Proteine und vor allem das gesuchte Meprin β lassen sich jedoch noch nicht mit dem bloßen Auge erkennen.

Dafür nutzt man die Fähigkeit von Antikörpern Strukturen hochspezifisch zu erkennen und an sie zu binden. Ziel dieser Untersuchung ist in diesem Projekt nicht nur das Enzym Meprin β im Gehirn mittels eines Monoklonalen Antikörpers nachzuweisen, sondern eben einen solchen erst zu finden.

Daher wurden in den Versuchen als primäre Antikörper die monoklonalen Einzelzellklone verwendet, die in vorherigen Arbeiten auf Zellkulturebene getestet wurden (Nancy Uhlig 2013a).

Ein Primärer Antikörper (mouse@meprin β) erkennt die Zielstruktur und bindet an diese. Um diese Bindung allerdings sichtbar zu machen wird ein sekundärer Antikörper, welcher den primären Antikörper speziesspezifisch bindet (donkey@mouse), verwendet, welcher mit einem Enzym an seinem F_c-Fragment gekoppelt ist. Dieses Enzym ist in der Lage eine Chemilumineszenzreaktion auszulösen, welche die markierten Proteinbanden erkennbar macht.

Alternativ können auch primäre Antikörper bereits mit einem solchen Enzym gekoppelt sein, oder radioaktive Marker oder Fluorophor tragen.

- Primärer Antikörper - Monoklonale Einzelzellklone (mouse@meprin β) 10ml;
1:10 TBST -> 8D5; 19F5; 7D10; 18A6; 17E7; 9BP; 6H11; 1YFS; 7D2; 10G12;
7H1; 8E3; 2C3; 19DS; 12F9; 6E7; 18C7; 16D4; 14D5; 21F5; 9G3; 1SE4;
20CS
- Sekundärer Antikörper – (donkey@mouse) 1:10.000 TBST+ Magermilchpulver
+ 0.02% NaN₃
- TBST
- Schaker Rochy 3D®
- Kühlschrank 4°C

Die Membran wird unter kontinuierlichem Schwenken bei 4°C über 24 Stunden mit dem primären Antikörper inkubiert. Nach der Inkubation schließen sich drei Waschvorgänge mit TBST für je 5min an. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper wird bei Raumtemperatur für eine Stunde durchgeführt. Auch hiernach wird nach demselben Schema gewaschen wie beim primären Antikörper.

Merke:

Das Inkubieren des primären Antikörpers bei 4°C erfolgt, um unspezifisches Bindeverhalten des Antikörpers zu unterbinden. Daher wird dem System Energie in Form von Wärme entzogen. So können mehr Bindungen mit geringer Aktivierungsenergie (also spezifische Bindungen) zustande kommen.

Die Waschschriffe erfolgen, um überschüssige und schwach gebundene Antikörper zu entfernen und so störende Signale in der Chemilumineszenz zu minimieren.

4.2.5.5 Chemiluminiszenznachweis

Alle der hier verwendeten sekundären Antikörpern tragen das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP- horse reddish peroxidase). Durch die Zugabe von bestimmten Substraten wird eine Reaktion enzymatisch beschleunigt, durch die ein lichtemittierendes Produkt entsteht.

Diese ausgesendeten Lichtquanten können mit dem LAS-3000 Imager von Fujifilm® detektiert werden. Die so nun sichtbaren Proteinbanden ermöglichen nun die Lokalisation des gesuchten Proteins.

Mehrere sekundäre Antikörper können an einen primären Antikörper binden, was eine Signalverstärkung bewirkt. Auch stellt die Belichtungszeit der Membran eine nützliche Methode zur Intensivierung des Lichtsignals dar. Die verschiedenen Belichtungszeiten der Proben sind im Ablauf weiter unten aufgeführt.

- Inkubierte Nitrzellulosemembran
- Immobilon Western® Reagenzien A und B
- LAS-3000 Imager von Fujifilm®
- Software: Image Reader LAS 3000®

Die Reagenzien A und B der Immobilon Western Lösung, welche vorher im Verhältnis 1:1 vermischt wurden, werden auf die Membran gegeben. Dabei werden die zwei Nierenproben je nach Bildqualität 30 bis 60 Sekunden belichtet.

Da die Niere ein sehr proteinreiches Organ ist, sind hier nur sehr kurze Belichtungszeiten nötig um ein ausreichend starkes Signal zu erhalten. Signale aus den Proben Gehirn, HEK-Zellen und rekombinanten Meprin β benötigen jedoch längere Belichtungszeiten.

Daher wurden Gehirn, HEK-Zellproben und rekombinantes Meprin β nochmals separat fünf bis 10min belichtet.

In Anschluss werden die Reagenzien mit TBST heruntergewaschen. Die Membran wird in TBST eingelegt und bei 4°C gelagert.

4.3 Molekularbiologische Methoden

4.3.1 Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen

Um Meprin β exprimierende HEK293T-Zellen zu generieren, wurde hier die Methode der transienten/vorübergehenden Transfektion genutzt. Das bedeutet, dass mittels eines Vektors DNA in eine Zielstruktur (hier HEK293T) eingebracht wird, um eine kurzfristige Expressierung einer Zielstruktur zu erreichen.

In diesem Versuch wird der Plasmid-Vektor pCMV6-Entry-Meprin-beta (Insert: MEP1B (Myc-DKK-tagged) Human Meprin A, beta) in HEK293T Zellen eingebracht. Dies erfolgt über die kationische Transfektion mit Polyethylenimin (PEI). Aufgrund seiner Ladung, welche durch viele Aminogruppen ($R-NH_2$) zustande kommt, zeigt dieses Polymer eine hohe Affinität zu sauren DNA.

Durch zelluläre Transportprozesse gelangt der Komplex aus PEI und DNA in die Zelle. Diese Vorgänge können noch verstärkt werden, indem man ein serumfreies Medium (hier Opti-MEM) zur Transfektion verwendet. Damit setzt man die Zelle einem Hungerprozess aus und die Zellmembran wird für die verwendeten Vektoren durchlässiger.

- PEI (1 μ g/ μ l in dH₂O; pH 7,2)
- PBS
- Poly-L-Ornithin
- dH₂O
- Opti-MEM

- pCMV6-Entry-meprin-beta
- pCMV-Leervektor
- Kulturschalen (6cm Durchmesser)
- Aspirator – Star Lab Smart Instruments®
- s@fe mate 1.2 vision Bio Air a eurolone® devison
- Heracell 240i CO₂ Incubator – Thermo Scietific®

Die Transfektion stellt für die Zelle einen belastenden Prozess dar, da durch die Verwendung des Hungermediums ein Mangelzustand erzeugt wird. Dies kann zur Ablösung der Zellen von Oberfläche der Kulturschale führen. Um dem entgegenzuwirken, werden die Zellen in eine Matrix aus Poly-L-Ornithin eingebettet. Dafür wird die Kulturschale speziell vorbereitet. In einer Verdünnung von 1:200 werden 200ml Poly-L-Ornithin auf die Kulturschale aufgetragen und über 24 Stunden im Inkubator inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Kulturschale mit PBS gewaschen und 1 Millionen HEK293T-Zellen auf ihr ausgesät. Diese Kultur wird inkubiert, bis sie eine Konfluenz von mehr als 80% erreicht hat. Hier dauerte dies etwas weitere 24 Stunden.

Nun wird das Nährmedium entfernt und durch Opti-MEM ausgetauscht. Die Kultur wird zwei Stunden inkubiert.

Auf diese Weise werden drei 6cm Kulturschalen vorbereitet.

Nun beginnt die Phase der eigentlichen Transfektion. Um den Erfolg der Transfektion später ermitteln zu können und einen Einfluss des verwendeten Vektors auf die Nachweisbarkeit des Expressionsprodukts auszuschließen, wird die erste Kulturschale lediglich mit PEI behandelt. Die Zweite mit dem pCMV6-Leervektor und PEI. Also den verwendeten Vektor ohne die DNA von Meprin β .

Und die Dritte mit PEI und dem Vektor pCMV6-Entry-Meprin-beta.

Die Transfektionslösung, worin 60 μ l Opti-mMEM; 1 μ g DNA und 4 μ l PEI enthalten sind, wird in die Kulturschale hineingegeben. Nun wird erneut inkubiert, bis nach vier Stunden das Medium durch Nährmedium ausgetauscht wird.

Zur Erfolgskontrolle werden die Kulturen lysiert die Proteine mithilfe SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und nach einem Western Blot immunpräzipitiert. Hierbei werden Antikörper gegen die entsprechenden Zielstrukturen verwendet.

Erfolgskontrolle der Transfektion im Western Blot

Chemilumineszenz: Immobilon, Belichtungszeit 10s – Bild nach 30s

Verwendeter Antikörper: G@meprin beta 1:1000; 2nd r@g 1:10.000

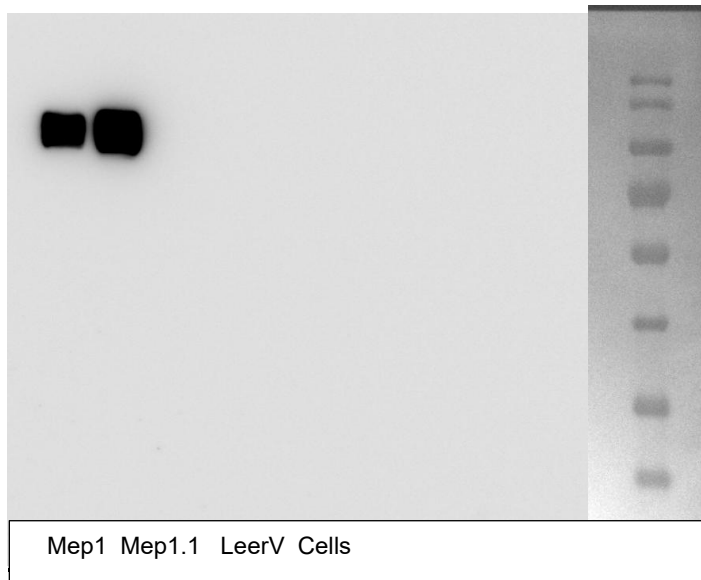


Abbildung 4 doppelt aufgetragener Probenansatz mit deutlichem Signal für exprimiertes Meprin β

Loadingkontrolle:

Verwendeter Antikörper: m@alpha Tubulin 1:1000 (3x used); 2nd d@m 1:10.000

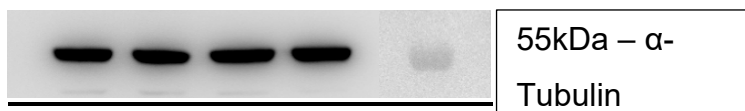


Abbildung 5 Loadingskontrolle zur Feststellung der Konzentrationsgleichheit der Proben

5. Ergebnisse

5.1. Bindungsfähigkeit der Antikörper an Meprin β

Zum jetzigen Zeitpunkt existiert kein monoklonaler Antikörper, der in der Lage ist, die Metalloprotease Meprin β in Lysaten von Mausgehirnen immunologisch nachzuweisen. Daher wurde in dieser Arbeit der Versuch unternommen aus einer Hybridoma Massenkultur Zellklone zu identifizieren, welche einen Meprin β spezifischen monoklonalen Antikörper produzieren.

Hierfür wurden Zellüberstände verschiedener Einzelzellklone verwendet, welche alle in einer Konzentration von 1:10 gute Signale in der Immunodetektion erzeugten.

Auf eine Fällung der Antikörper wurde aufgrund der guten Signalstärke verzichtet. Auch waren die daraus resultierenden Ergebnisse ausreichend, um die Fragestellung dieser Arbeit in befriedigenden Maße zu beantworten.

Zur Testung der Antikörper wurden Hirnlysate von Mäusen mit dem genetischen Wildtyp für Meprin β erzeugt. Um eine Referenz zu den Hirnlysaten zu generieren wurden zusätzlich Nierenlysate von Mäusen mit genetischem Wildtyp und knock out für Meprin β erzeugt. Es wurde bereits nachgewiesen, dass Meprin β in der Niere sehr stark exprimiert wird. Daher sollte ein starkes Signal im Wildtyplysate und das Fehlen eines solchen im knock out, als Negativkontrolle, eine spezifische Bindung des Antikörpers an Meprin β in der Niere beweisen. Das ermöglicht eine Aussage darüber, ob es sich bei dem beobachteten Signal im Hirnlysate wirklich um Meprin β handelt.

Organe bestehen aus einer Vielzahl verschiedener Zellen, welche unterschiedliche Proteinbesätze besitzen. Allein diese Vielzahl verschiedenster Epitope kann zu vermehrten Hintergrundsignalen und damit zu Fehlinterpretationen führen. Um dem vorzubeugen, wurden transient mit Meprin β transfizierte HEK293T-Zellen verwendet, um die Vielfältigkeit der Proteine im Lysat zu reduzieren und den Anteil von Meprin β an der Gesamtmenge der Proteinmasse zu erhöhen. Durch diese Überexprimierung der Zielstruktur können die HEK293T-Zellen als Positivkontrolle verwendet werden.

Um die Signalspezifität noch weiter einzugrenzen, wurde zusätzlich eine Probe aus rekombinantem Meprin β verwendet.

Durch die Verwendung der SDS-Gelelektrophorese können die Proteine in den verschiedenen Proben nach ihrer Größe aufgetrennt und im Nass-Blot-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran übertragen werden. Mit der Immunpräzipitation soll das Zielprotein erkannt und mit der Chemolumineszenz sichtbar gemacht werden.

Um die genaue Größe von Meprin β in den einzelnen Proben zu bestimmen, wurden die Lysate aus Niere (Wildtyp und knock out) sowie der transfizierten HEK293T Kultur und das rekombinante Meprin β mit dem industriell hergestellten Ziege anti Meprin β (g@Mep1b) inkubiert. Daraus ergab sich eine Proteingröße in den Zell- und Gewebelysaten von etwa 110 Kilodalton (kDa) und für das rekombinante Protein von etwa 75 kDa.

In **Kapitel 4 Methoden** finden sie den theoretischen Hintergrund und den Ablauf der einzelnen Methoden.

Die Untersuchungen der verschiedenen Einzelzellklone zeigten bei allen Klonen keine spezifische Bindung an Meprin β . Auf der Höhe von 110 kDa war im knock out Lysat der Niere stets ein Signal zu finden, was eine spezifische Bindung an das Zielprotein ausschließt.

Einzelzellklone	Ergebnis auf Spezifität für Meprin β
8D5	-
19F5	-
7D10	-
18A6	-
17E7	-
9BP	-
6H11	-
1YFS	-
7D2	-
10G12	-
7H1	-
8E3	-
2C3	-
19DS	-
12F9	-
6E7	-
18C7	-
16D4	-
14D5	-
21F5	-
9G3	-
1SE4	-

Tab. 6: Zusammenfassung der Testergebnisse der Einzelzellklone, die in dieser Arbeit untersucht wurden. (+) markiert ein positives Signal für Meprin β und ein (-) ein negatives.

Die folgenden Abbildungen zeigen das Ergebnis der Chemolumineszenz nach Immunopräzipitation mit den Überständen der jeweiligen Einzelzellklonen.

5.2 Einzelergebnisse der monoklonalen Einzelzellklone im Western Blot

5.2.1 8D5

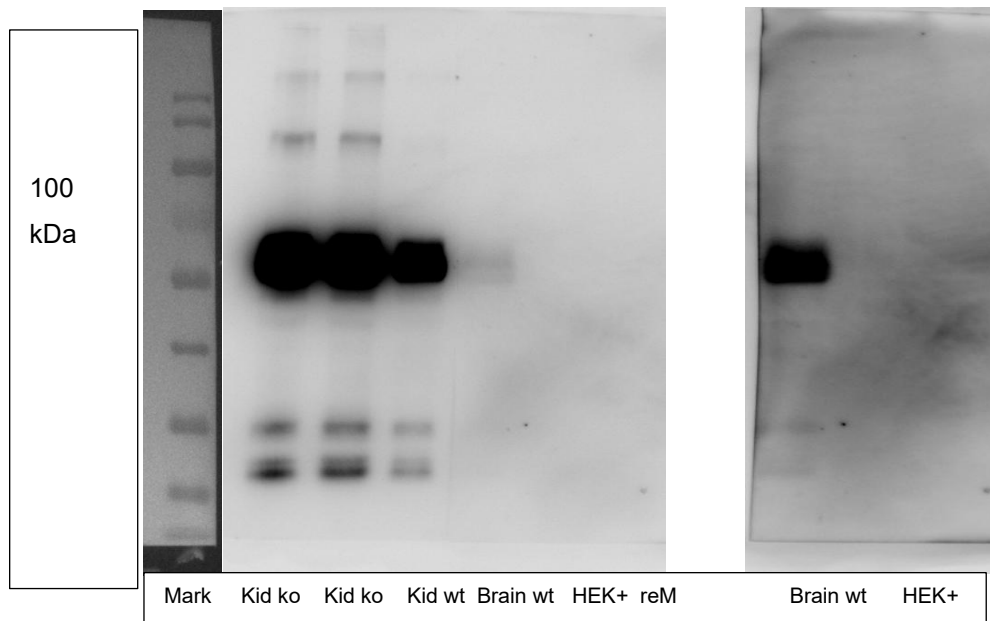


Abbildung 6 Western Blot des mAb 8D5; positives Signal im Nieren knock out bei, damit keine Spezifität für Meprin β

5.2.2 19F5

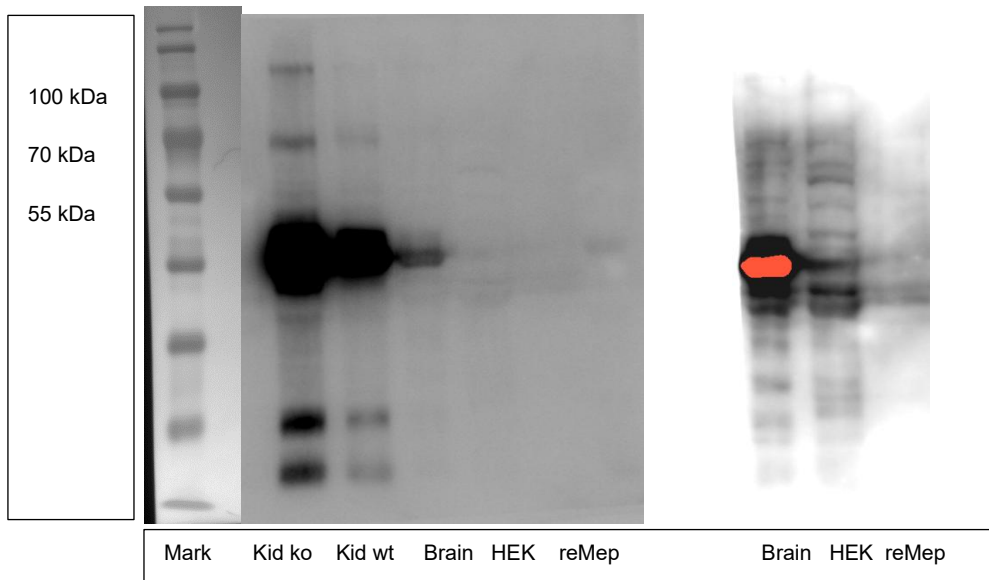


Abbildung 7 Western Blot des mAb 19F5; keine Signale bei 110kDa, dafür starkes Signal bei 55kDa, unspezifische Bindung des Antikörpers

5.2.3 7D10

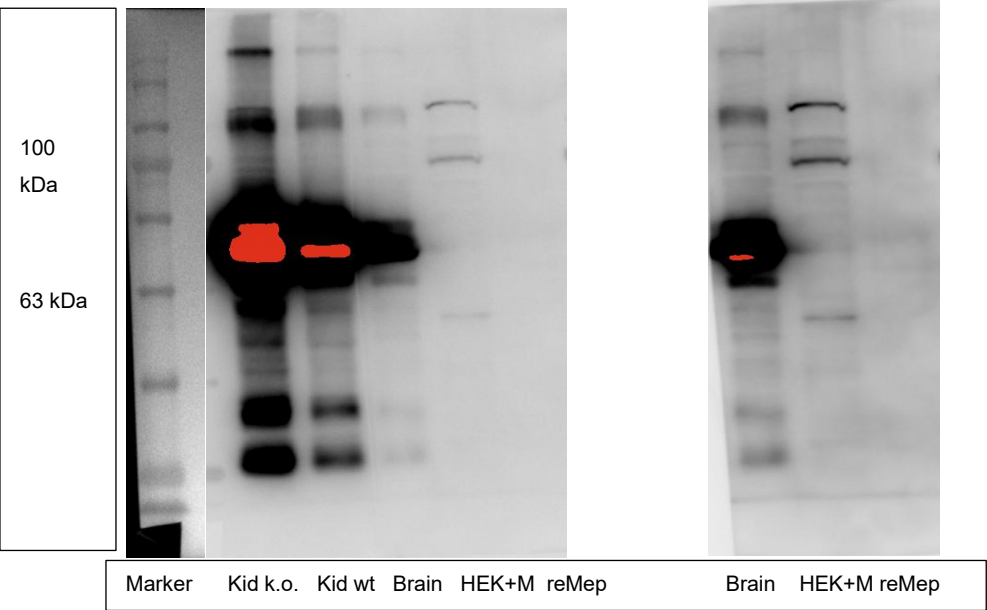


Abbildung 8 Western Blot des mAb 7D10, Signale bei 110kDa in allen Lysatproben, daher keine Spezifität für Meprin β nachweisbar

5.2.4 18A6

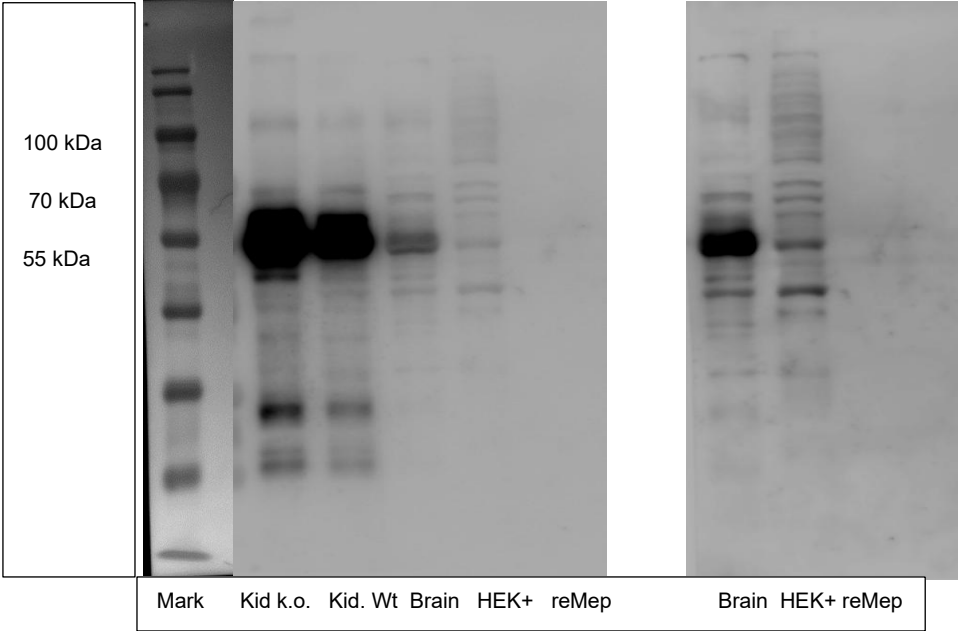


Abbildung 9 Western Blot des mAb 18A6, Signale bei 110kDa in allen Lysatproben, daher keine Spezifität für Meprin β

5.2.5 17E7

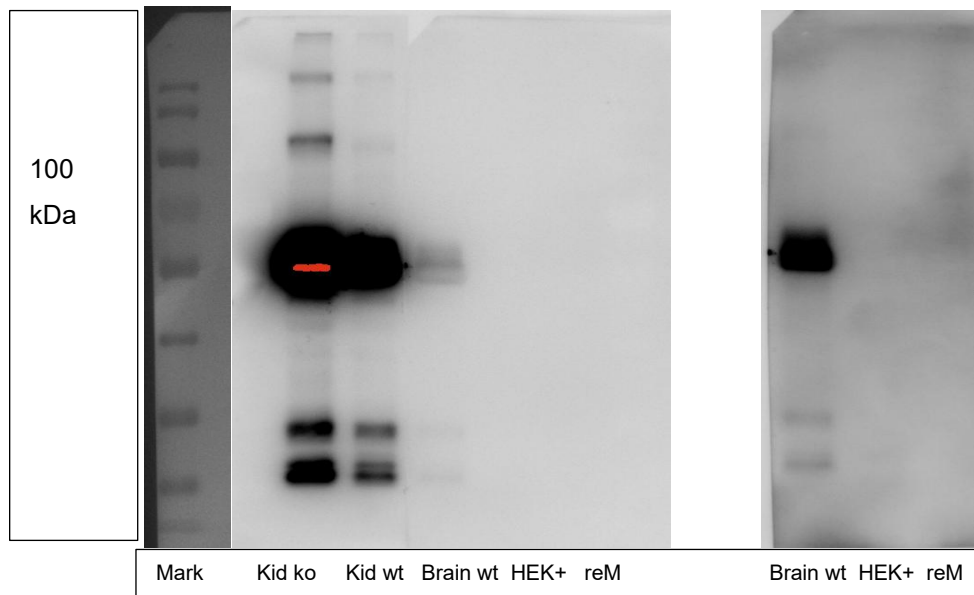


Abbildung 10 Western Blot des mAb 17E7; Signal bei 110kDa im Nieren wt und knock out, keine spezifische Bindung an die Zielstruktur

5.2.6 9BP

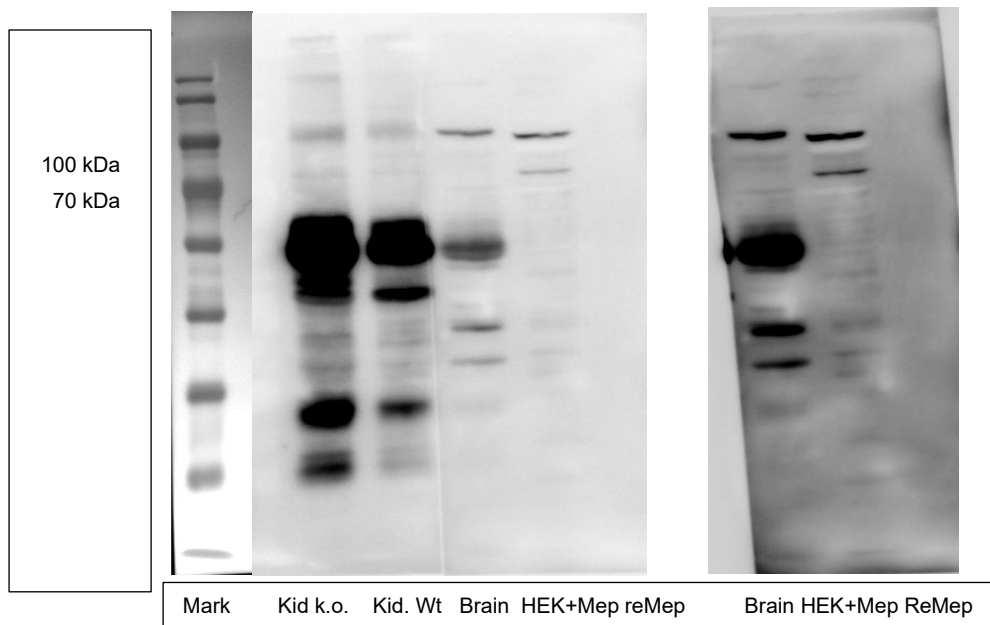


Abbildung 11 Western Blot des mAb 9BP; Signale bei 110kDa in allen Lysaten, keine spezifische Bindung an die Zielstruktur

5.2.7 6H11

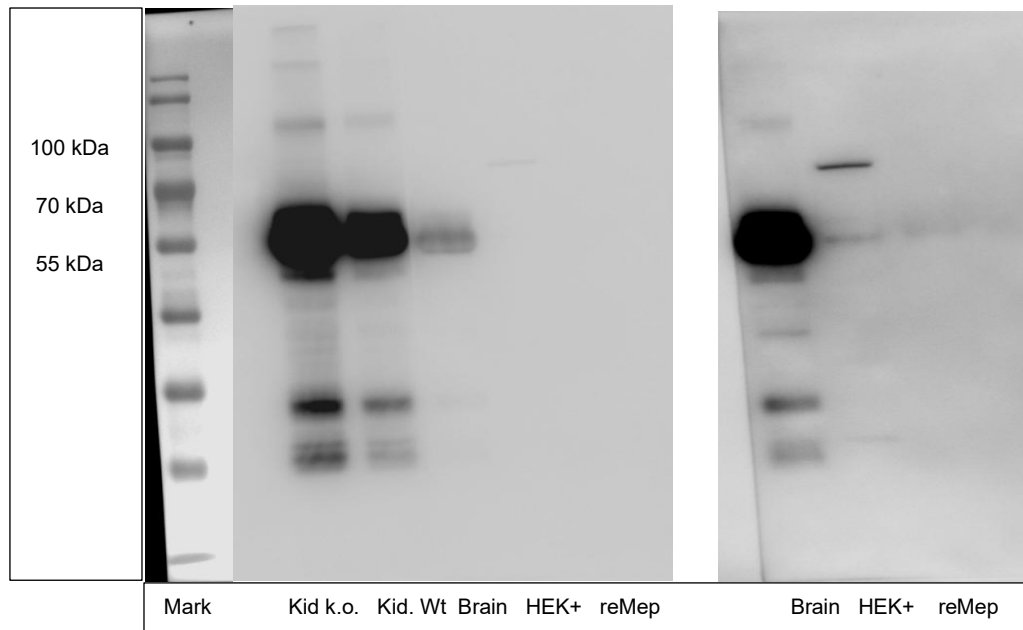


Abbildung 12 Western Blot des mAb 6H11; Signale bei 110kDa im Nieren wildtyp und knock out, keine spezifische Bindung an die Zielstruktur

5.2.8 1YFS

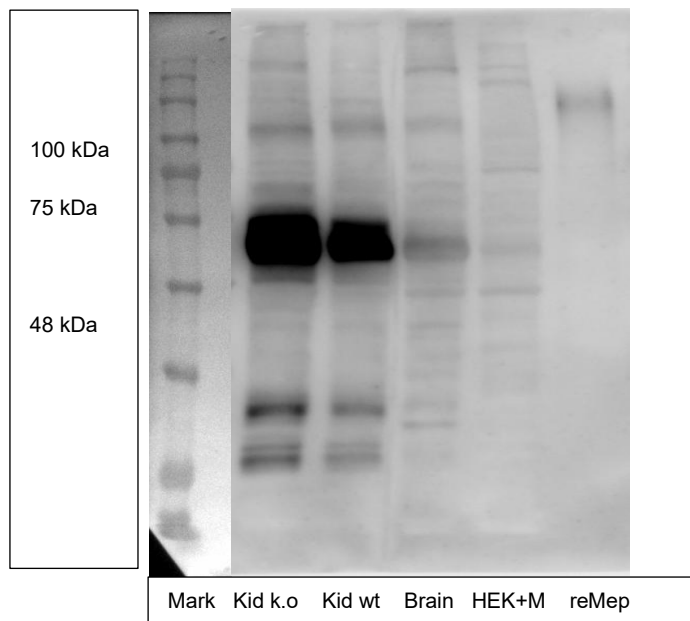


Abbildung 13 Western Blot des mAb 1YFS; Signale in allen Lysaten bei 110kDa, keine spezifische Bindung an die Zielstruktur

5.2.9 7D2

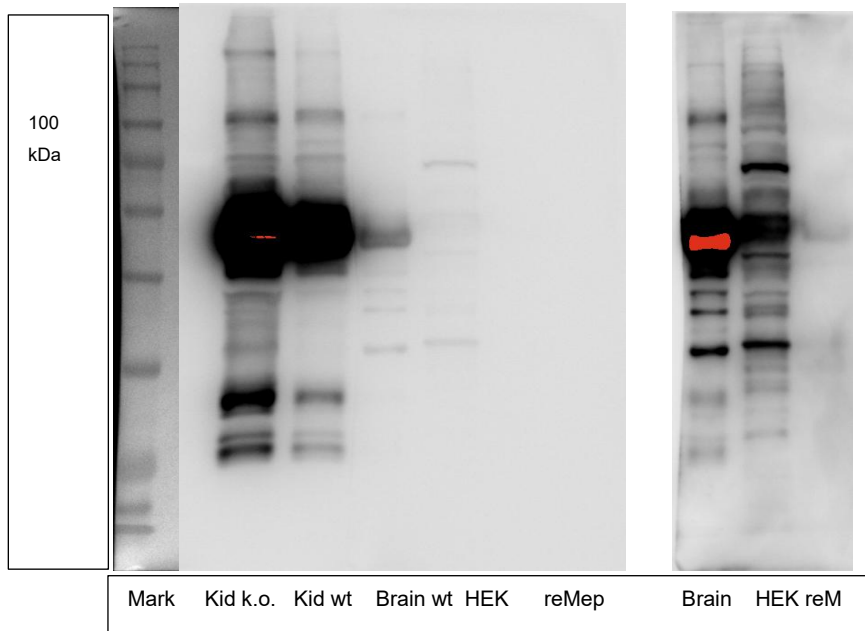


Abbildung 14 Western Blot des mAb 7D2; Signale bei 110kDa in den Nierenlysaten Wildtyp und knock out, sowie Gehirn und HEK293

5.2.10 10G12

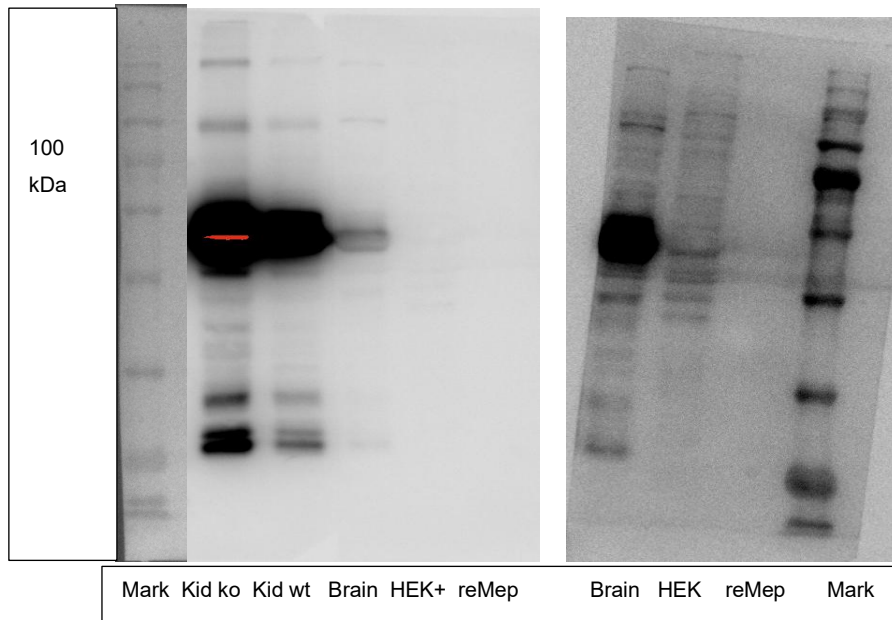


Abbildung 15 Western Blot des mAb 10G12; Signale bei 110kDa in den Nierenlysaten Wildtyp und knock, sowie Gehirn, keine spezifische Bindung an die Zielstruktur

5.2.11 7H1

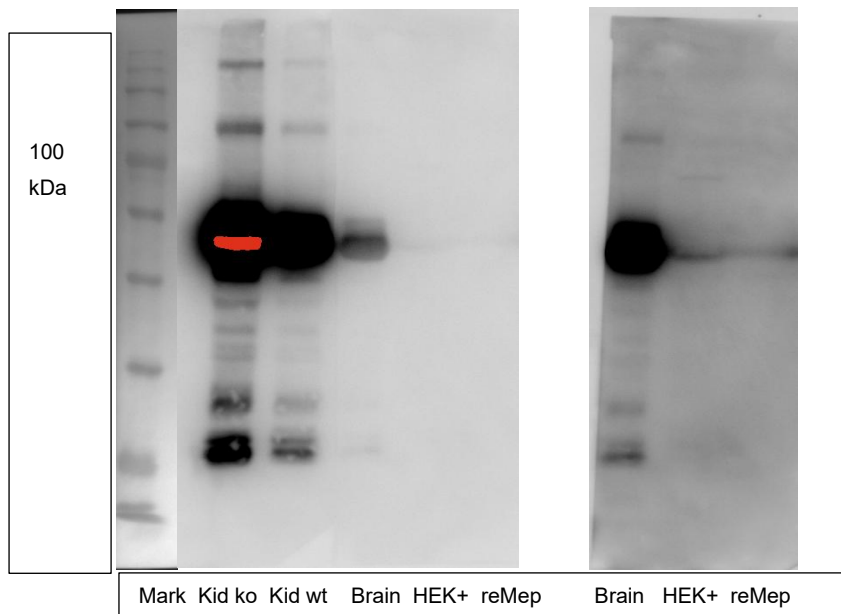


Abbildung 16 Western Blot des mAb 7H1; Signale bei 110kDa bei 100kDa in Nierenlysaten Wildtyp und knock out, sowie Gehirn, keine spezifische Bindung an die Zielstruktur

5.2.12 8E3

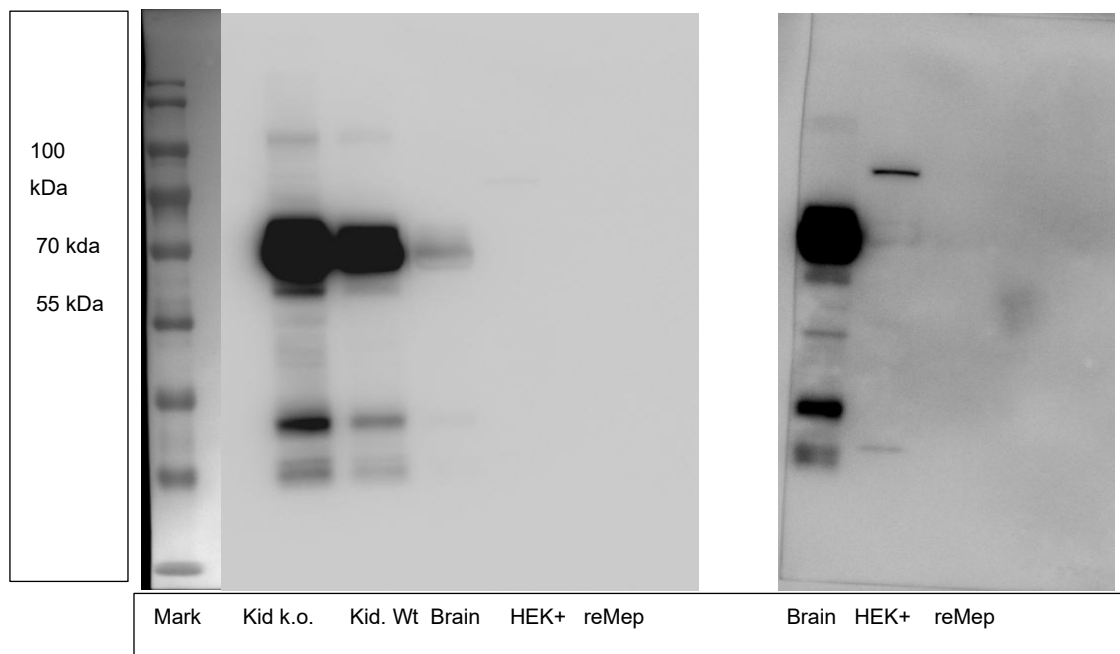


Abbildung 17 Western Blot des mAb 8E3; Signal bei 110kDa in Nierenlysaten Wildtyp und knock out, sowie Gehirn, keine spezifische Bindung der Zielstruktur

5.2.13 2C3

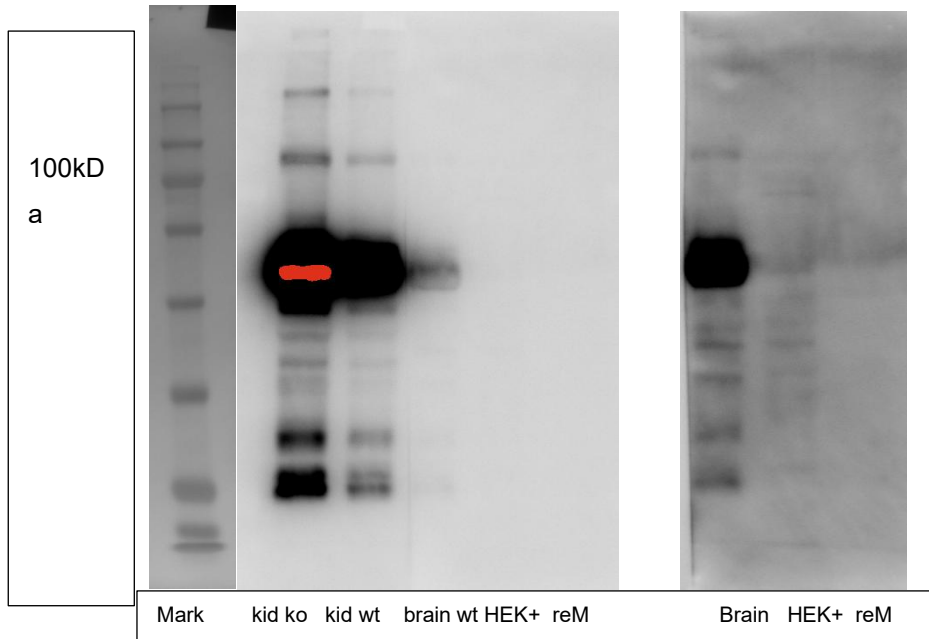


Abbildung 18 Western Blot des mAb 2C3; keine Signale bei 100kDa, dafür diverse, starke Signale bei ca 70kDa, keine spezifische Bindung der Zielstruktur

5.2.14 19DS

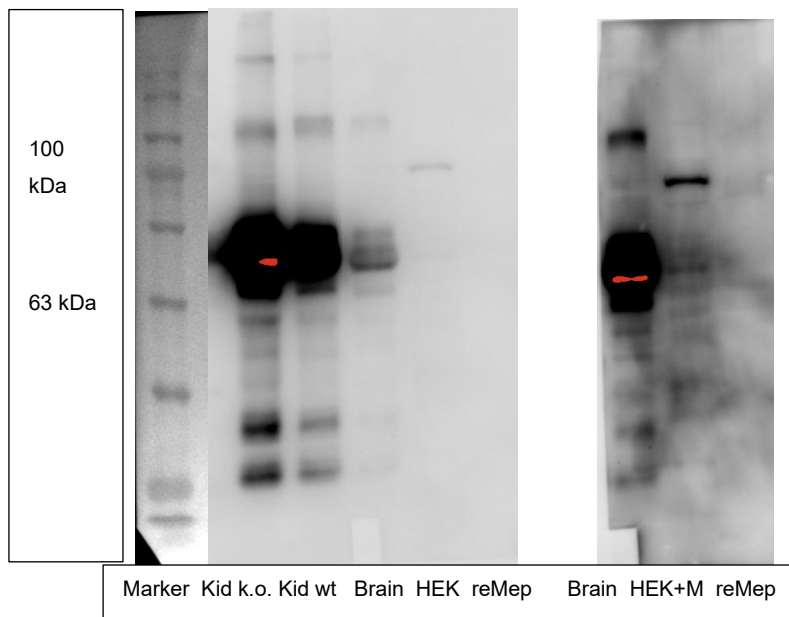


Abbildung 19 Western Blot des mAb 19DS; Signale bei 110kDa in den Lysaten Nieren Wildtyp und knock out, sowie Gehirn, keine spezifische Bindung der Zielstruktur

5.2.15 12F9

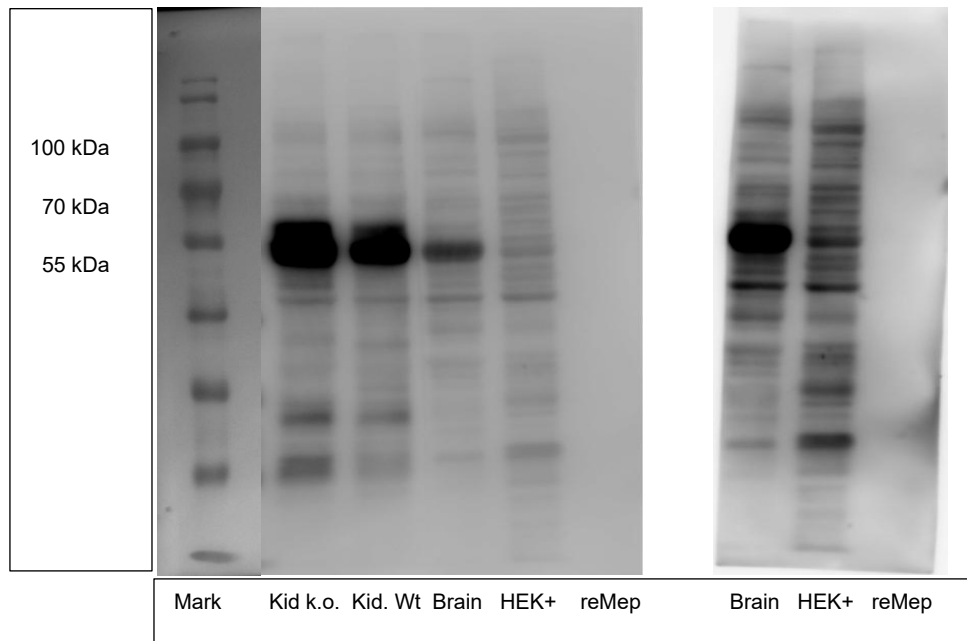


Abbildung 20 Western Blot des mAb 12F9; Signale in allen Lysaten bei 100kDa, keine spezifische Bindung an die Zielstruktur

5.2.16 6E7

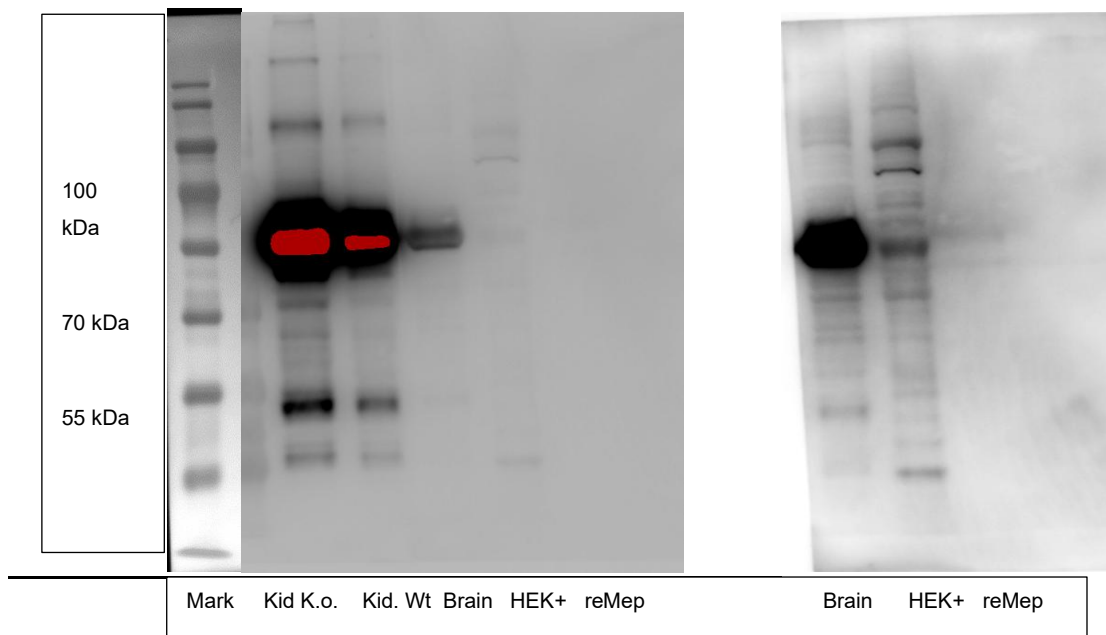


Abbildung 21 Western Blot des mAb 6E7; Signale in den Lysaten Niere Wildtyp und knock out, keine spezifische Bindung an die Zielstruktur

5.2.17 18C7

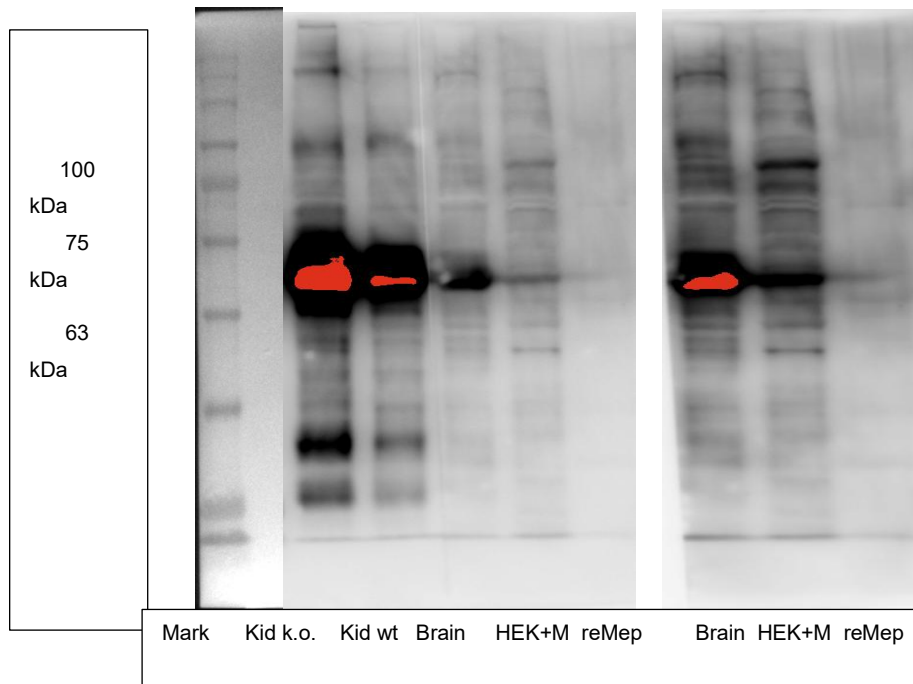


Abbildung 22 Western Blot des mAb 18C7; Signale in allem Lysaten 100kDa, keine spezifische Bindung der Zielstruktur

5.2.18 16D4

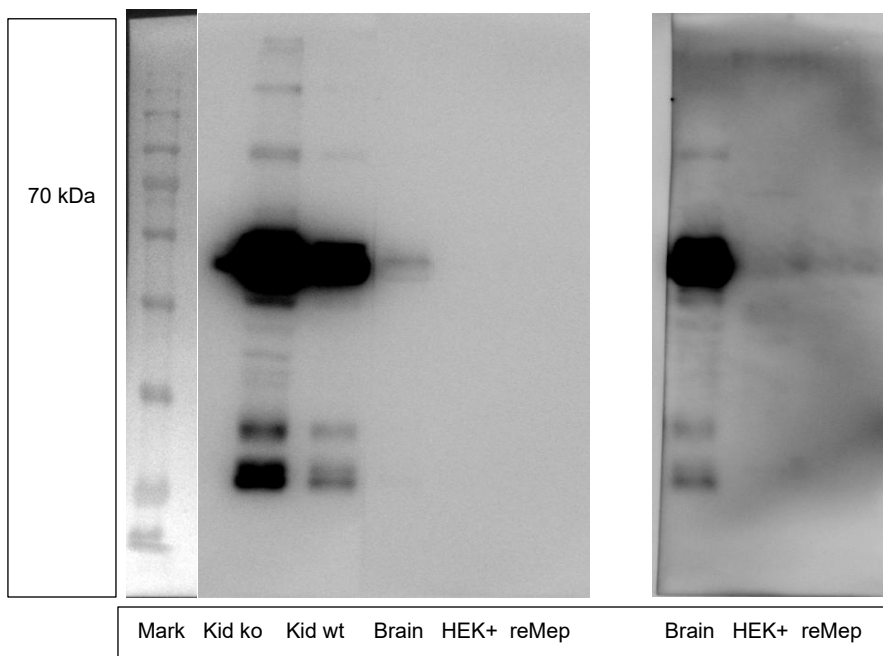


Abbildung 23 Western Blot des mAb 16D4; keine Bindung in der Lysaten 100kDa, dafür starke Signale bei anderen Banden, keine spezifische Bindung der Zielstruktur

5.2.19 14D5

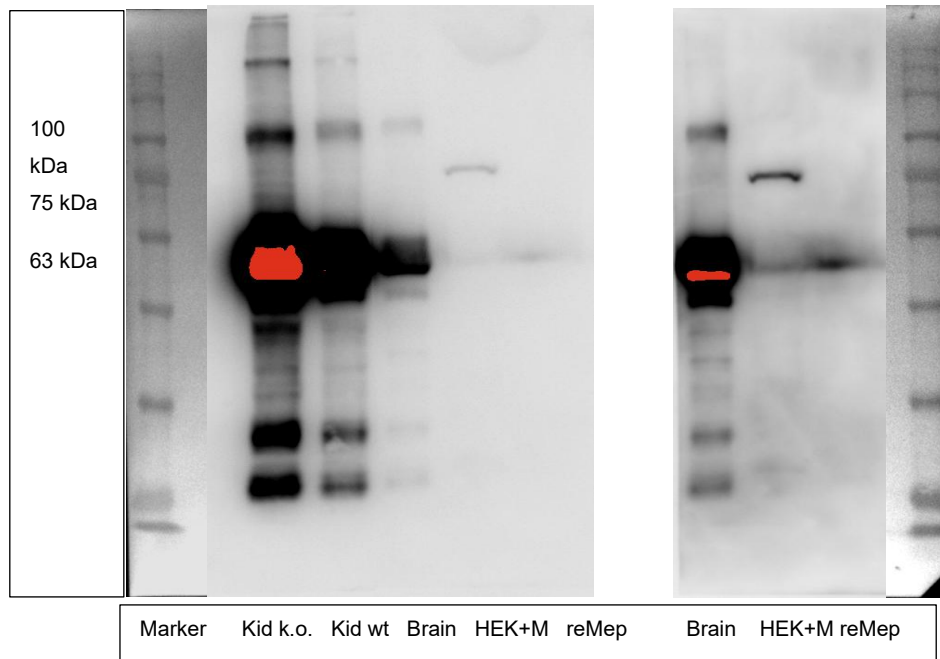


Abbildung 24 Western Blot des mAb 14D5; Signale bei 100kDa in den Lysaten Niere Wildtyp und knock out, sowie Gehirn, keine spezifische Bindung der Zielstruktur

5.2.20 21FS

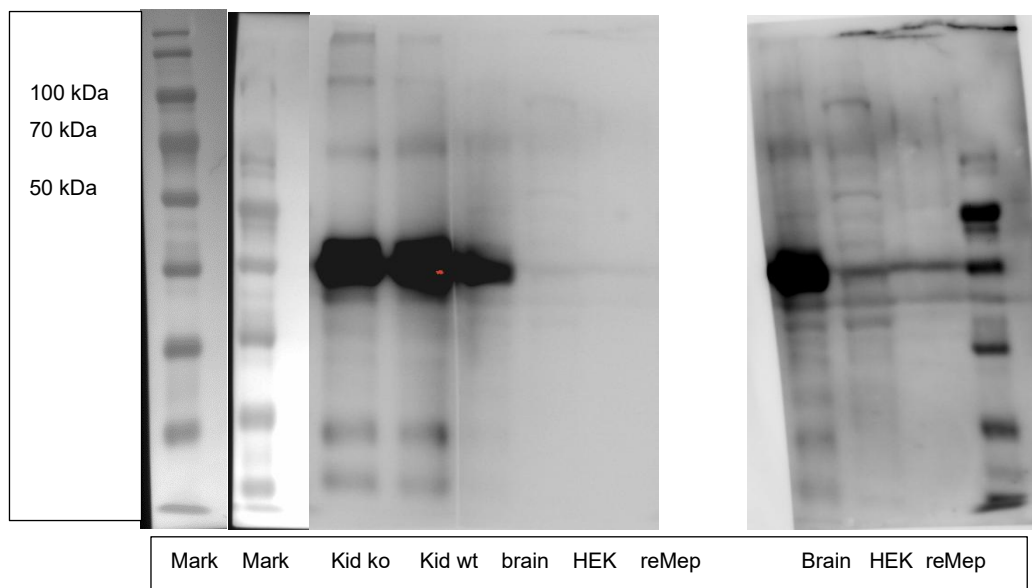


Abbildung 25 Western Blot des mAb 21FS, keine Signale in allen Proben bei 100kDa, dafür diverse andere Signale, keine spezifische Bindung der Zielstruktur

5.2.21 9G3

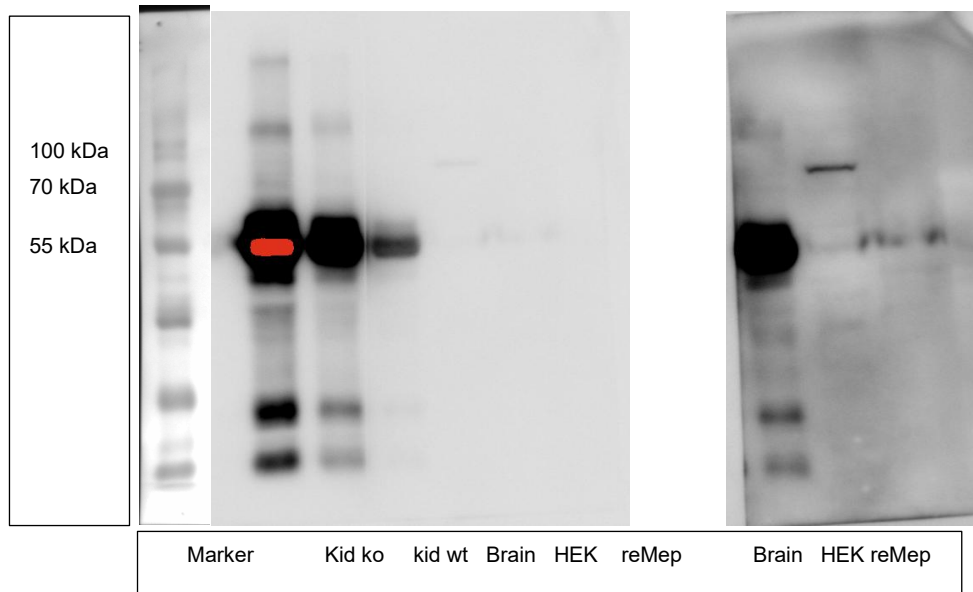


Abbildung 26 Western Blot des mAb 9G3; Signale bei 110kDa in die Lysaten Nieren Wildtyp und knock out, keine spezifische Bindung der Zielstruktur

5.2.22 1SE4

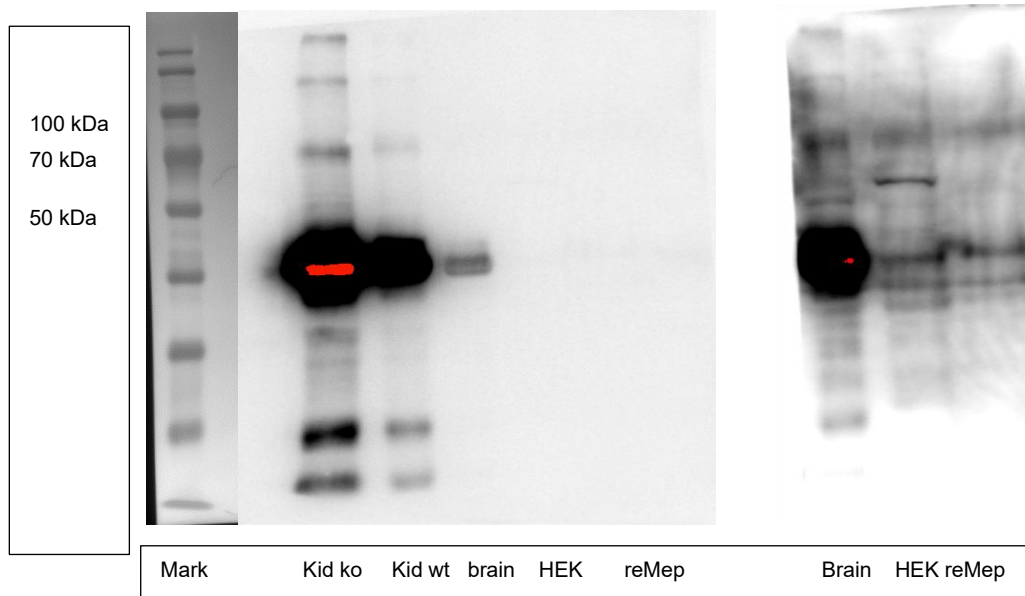


Abbildung 27 Western Blot des mAb 1SE4; keine Signale bei 100kDa in allen Proben, diverse andere Signale, keine spezifische Bindung der Zielstruktur

6. Diskussion

In dieser Dissertationsschrift sollte die Fähigkeit monoklonaler Antikörper aus der Arbeitsgruppe Pietrzik der Universität Mainz zur Immunodetektion von Meprin β im Gehirn nachgewiesen werden. Wir konnten jedoch belegen, dass die verwendeten Antikörper nicht in der Lage sind die Metalloprotease spezifisch zu binden.

In allen Untersuchungen mittels Western Blot kam es zu einer unspezifischen Bindung der Antikörper an Proteine. Es kann daher ausgeschlossen werden, dass manche Einzelzellklone keine Antikörper produzierten.

In einer Hybridomazellkultur können mehrere tausend Zellklone vorliegen, die verschiedenste Antikörper produzieren. Wir testeten davon 22 Zellklone. Es kann also sein, dass eine Erhöhung der Anzahl getesteter Zellklone ein besseres Ergebnis erzielen kann.

Das zur Immunisierung des Donororganismus verwendete Antigen war hier rekombinantes Meprin β . Gebildete Antikörper richten sich gegen die Proteinstruktur des rekombinanten Enzyms und nicht gegen das native. Die gebildeten Antikörper können daher das native Protein unter Umständen nicht binden bzw. detektieren. Hier könnte als neues Antigen das native Protein verwendet werden, um einen spezifischeren mAb zu generieren.

Das durch den Antikörper gebundene Epitop könnte in der Tertiärstruktur für den Antikörper nicht zugänglich sein. Jedoch wird diese Möglichkeit durch den Fakt ausgeschlossen, da das im Western Blot verwendete rekombinante Meprin β in seiner Primärstruktur vorliegt und somit alle Epitope dem Antikörper zugänglich wären. Auf der anderen Seite könnte der Antikörper auch nur spezifisch für das native Protein sein. Die vielen Hintergrundsignale in der Immunfluoreszenz legen aber nahe, dass die Antikörper viele verschiedene Proteine, bzw. Epitope binden und wenig spezifisch für das Zielprotein sind.

Meprin β ist in sehr hoher Konzentration in der Niere vorhanden. Hier gibt es auch industriell hergestellte mAbs, welche in der Lage sind das Enzym spezifisch zu binden. Im Gehirn funktionieren diese jedoch nicht. Eine Erklärung dafür wäre, dass ein anderer Serotyp von Meprin β im Gehirn vorliegt. Im Western Blot würde sich dieser Fall so zeigen, dass ein Signal bei 110kDa in der Wildtypprobe und im knock

out der Niere fehlen würden. In beiden Proben finden sich jedoch bei allen getesteten Antikörpern starke Fluoreszenzsignale bei 110kDa.

Eine hohe Konzentration des Zielproteins im untersuchten Gewebe ist eine gute Voraussetzung, um das gesuchte Protein immunologisch im Gewebelysat nachzuweisen. Für Meprin β im Gehirn ist noch nicht klar, wie hoch seine Konzentration im Gewebe ist. Es kann also sein, dass seine Gesamtkonzentration nicht hoch genug ist um ein ausreichend starkes Signal in der Immunfluoreszenz zu erzeugen. Die Untersuchung einzelner Hirnkompartimente, z.B. des Hippocampus, könnte Hinweise auf lokale Konzentrationsunterschiede von Meprin β im Gehirn liefern.

Um einen funktionsfähigen Antikörper zur Immunodetektion von Meprin β im Gehirn herzustellen, sind neue Hybridoma Einzelzellklone nötig. Bei den hier Vorliegenden, wurde gezeigt, dass sie zwar alle einen Antikörper produzieren, jedoch keiner von ihnen spezifisch genug die Zielstruktur binden kann. Eine Herstellung einer neuen Hybridomakultur und Verwendung eines anderen Antigens, z.B. dem nativen Enzym, kann den gewünschten Erfolg bringen. Unter der Annahme, dass Meprin β in einer anderen Isoform im Gehirn vorliegt als in der Niere, ist es möglich, dass das Enzym auch in anderen Geweben einer anderen Isoform angehört. So kommt Meprin β auch in Geweben des Magen-Darm-Trakts oder im Bindegewebe vor (siehe Kapitel 2.3.3.). Eine Verwendung dieser Isoformen als Antigen könnte dabei ein neuer Ansatz sein.

Nach der Herstellung einer Hybridomazellkultur gilt es die Antikörperproduzierenden Zellen zu isolieren und Kulturen der Einzelzellklone anzulegen. Eine möglichst hohe Zahl getesteter monoklonaler Antikörper erhöht die Wahrscheinlichkeit einen geeigneten Einzelzellklon zu identifizieren.

Es müssen somit weitere Untersuchungen vorgenommen werden, um einen monoklonalen Antikörper zu finden, der es vermag Meprin β spezifisch im Gehirn binden zu können.

7. Zusammenfassung

Als alternative β -Sekretase, ist Meprin β an der Entstehung von N-terminalen A β Molekülen im Gehirn beteiligt und nimmt direkten Einfluss auf die Pathophysiologie des Morbus Alzheimer (Bien et al. 2012; Becker-Pauly und Pietrzik 2016; Marengo et al. 2022; Armbrust et al. 2024b). Diese verkürzten A β -Peptide, insbesondere A β_{2-40} und A β_{2-42} tragen durch ihre erhöhte Neurotoxizität und Plaquebildung zur Progression der Erkrankung bei (Marengo et al. 2022). In Neuronen und Astrozyten ist die Expression von Meprin β , bei Alzheimer Patienten, erhöht. Dieses Phänomen tritt vor allem in der Nähe von A β -Ablagerungen auf (Schlenzig et al. 2018; Armbrust et al. 2024b). In präklinischen Modellen führt diese Überexpression zu einer verstärkten APP – Prozessierung über amyloidogenen Weg, der zu einer Zunahme von N-terminal verkürzten A β -Spezies und zu Verhaltensdefiziten wie Hyperaktivität und gestörter räumlicher Gedächtnisleistung führt (Armbrust et al. 2024b; Keller et al. 2025).

Das Fehlen von Meprin β in transgenen Mausmodellen vermindert die Konzentration von A β -Spezies im Gehirn und verbessert Lern- und Gedächtnisleitung. Dies unterstreicht die pathophysiologische Bedeutung von Meprin β (Marengo et al. 2022). Darüber hinaus beeinflusst es die neuronale Plastizität. Durch die Proteolyse von Brevicain, einem Bestandteil der extrazellulären Matrix, verändert es die Integrität der Blut-Hirn-Schranke (Keller et al. 2025; Gindorf et al. 2021b).

Somit ist die Entwicklung eines monoklonalen Antikörpers gegen Meprin β in Zusammenhang mit der Alzheimerkrankheit sinnvoll und aus translationaler und therapeutischer Sicht notwendig. Die Zulassung des monoklonalen Antikörpers Lecanemab (van Dyck et al. 2023) unterstreicht den Nutzen einer zielgerichteten Therapie und ihren Einfluss auf die Krankheitsprogression. Ein monoklonaler Antikörper gegen Meprin β macht es möglich Meprin β erstmalig direkt im Gehirn nachzuweisen und kann womöglich in der Lage sein das Enzym zu inhibieren und die pathologische APP-Prozessierung mit Produktion von neurotoxischem A β_{2-40} und A β_{2-42} zu unterbinden. Neben der Entwicklung eines solchen Antikörpers müssen jedoch weitere innovative Technologien zum Einsatz kommen um die Penetration der Blut-Hirn-Schranke zu verbessern und Modifikationen am Fc-Fragment des Antikörpers, zur Reduktion von Nebenwirkungen, vorzunehmen (Sharma und Singh 2025; Barrera-Ocampo 2024). Eine innovative, antikörperbasierte Inhibition der

Genese von $A\beta_{2-40}$ und $A\beta_{2-42}$ kann ein weiterer Schritt zu einer kausalen und nachhaltigen Therapie des Morbus Alzheimer darstellen.

8. Literaturverzeichnis

A.S. Buchman, M. D.; R.S. Wilson, PhD; J.L. Bienias, ScD; R.C. Shah, M. D.; D.A. Evans, M. D.; and D.A. Bennett, M. D. (2005): Change in body mass index and risk of incident Alzheimer disease. In: *Neurology* 65, S. 892–897.

Abdeldaim, Dalia T.; Schindowski, Katharina (2023): Fc-Engineered Therapeutic Antibodies: Recent Advances and Future Directions. In: *Pharmaceutics* 15 (10). DOI: 10.3390/pharmaceutics15102402.

Alkan, Sefik S. (2004): Monoclonal antibodies: the story of a discovery that revolutionized science and medicine. In: *Nature reviews. Immunology* 4 (2), S. 153–156. DOI: 10.1038/nri1265.

Alois Alzheimer (1906): Über einen eigenartigen schweren Krankheitsprozess der Hirnrinde. In: *Neurologisches Zentralblatt* (25), S. 1134.

Ambort, Daniel; Brellier, Florence; Becker-Pauly, Christoph; Stöcker, Walter; Andrejevic-Blant, Snezana; Chiquet, Matthias; Sterchi, Erwin E. (2010): Specific processing of tenascin-C by the metalloprotease meprin β neutralizes its inhibition of cell spreading. In: *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 29 (1), S. 31–42. DOI: 10.1016/j.matbio.2009.08.007.

Angevaren, Maaïke; Aufdemkampe, Geert; Verhaar, H. J. J.; Aleman, A.; Vanhees, Luc (2008): Physical activity and enhanced fitness to improve cognitive function in older people without known cognitive impairment. In: *The Cochrane database of systematic reviews* (3), CD005381. DOI: 10.1002/14651858.CD005381.pub3.

Aow, Jonathan; Huang, Tzu-Rung; Goh, Yeek Teck; Sun, Alfred Xuyang; Thinakaran, Gopal; Koo, Edward H. (2023): Evidence for a clathrin-independent endocytic pathway for APP internalization in the neuronal somatodendritic compartment. In: *Cell reports* 42 (7), S. 112774. DOI: 10.1016/j.celrep.2023.112774.

Armbrust, Fred; Bickenbach, Kira; Altmeyden, Hermann; Foggetti, Angelica; Winkelmann, Anne; Wulff, Peer et al. (2024a): A novel mouse model for N-terminal truncated A β 2-x generation through meprin β overexpression in astrocytes. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 81 (1), S. 139. DOI: 10.1007/s00018-024-05139-w.

Armbrust, Fred; Bickenbach, Kira; Altmeyen, Hermann; Foggetti, Angelica; Winkelmann, Anne; Wulff, Peer et al. (2024b): A novel mouse model for N-terminal truncated A β 2-x generation through meprin β overexpression in astrocytes. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 81 (1), S. 139. DOI: 10.1007/s00018-024-05139-w.

Armbrust, Fred; Bickenbach, Kira; Koudelka, Tomas; Tholey, Andreas; Pietrzik, Claus; Becker-Pauly, Christoph (2021): Phosphorylation of meprin β controls its cell surface abundance and subsequently diminishes ectodomain shedding. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 35 (7), e21677. DOI: 10.1096/fj.202100271R.

Arnold, S. E.; Hyman, B. T.; Flory, J.; Damasio, A. R.; van Hoesen, G. W. (1991): The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. In: *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)* 1 (1), S. 103–116. DOI: 10.1093/cercor/1.1.103.

Arolas, Joan L.; Broder, Claudia; Jefferson, Tamara; Guevara, Tibisay; Sterchi, Erwin E.; Bode, Wolfram et al. (2012): Structural basis for the sheddase function of human meprin β metalloproteinase at the plasma membrane. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (40), S. 16131–16136. DOI: 10.1073/pnas.1211076109.

Arribas, Joaquín; Merlos-Suárez, Anna (2003): Shedding of plasma membrane proteins. In: *Curr Top Dev Biol* 54, S. 125–144. DOI: 10.1016/s0070-2153(03)54007-8.

Artaso Irigoyen, Begoña; Goñi Sarriés, Adriana; Gómez Martínez, Ana Rosa (2004): Síntomas neuropsiquiátricos en el síndrome demencial. In: *RevNeurol* 38 (06), S. 506. DOI: 10.33588/rn.3806.2003437.

Athan, E. S.; Williamson, J.; Ciappa, A.; Santana, V.; Romas, S. N.; Lee, J. H. et al. (2001): A founder mutation in presenilin 1 causing early-onset Alzheimer disease in unrelated Caribbean Hispanic families. In: *JAMA* 286 (18), S. 2257–2263. DOI: 10.1001/jama.286.18.2257.

AWMF S3 Leitlinie Demenzen DGPPN und DGN (2025): S3-Leitlinie Demenzen. AWMF Registernummer 038-013, 17.07.2025.

Banerjee, S.; Oneda, B.; Yap, L. M.; Jewell, D. P.; Matters, G. L.; Fitzpatrick, L. R. et al. (2009): MEP1A allele for meprin A metalloprotease is a susceptibility gene for inflammatory bowel disease. In: *Mucosal immunology* 2 (3), S. 220–231. DOI: 10.1038/mi.2009.3.

Banerjee, Sanjita; Bond, Judith S. (2008): Prointerleukin-18 is activated by meprin beta in vitro and in vivo in intestinal inflammation. In: *Journal of Biological Chemistry* 283 (46), S. 31371–31377. DOI: 10.1074/jbc.M802814200.

Banerjee, Sanjita; Jin, Ge; Bradley, S. Gaylen; Matters, Gail L.; Gailey, Ryan D.; Crisman, Jacqueline M.; Bond, Judith S. (2011): Balance of meprin A and B in mice affects the progression of experimental inflammatory bowel disease. In: *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 300 (2), G273-82. DOI: 10.1152/ajpgi.00504.2009.

Barrera-Ocampo, Alvaro (2024): Monoclonal antibodies and aptamers: The future therapeutics for Alzheimer's disease. In: *Acta pharmaceutica Sinica. B* 14 (7), S. 2795–2814. DOI: 10.1016/j.apsb.2024.03.034.

Baumkötter, Frederik; Schmidt, Nadine; Vargas, Carolyn; Schilling, Sandra; Weber, Rebecca; Wagner, Katja et al. (2014): Amyloid precursor protein dimerization and synaptogenic function depend on copper binding to the growth factor-like domain. In: *J. Neurosci.* 34 (33), S. 11159–11172. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0180-14.2014.

Baumkötter, Frederik; Wagner, Katja; Eggert, Simone; Wild, Klemens; Kins, Stefan (2012): Structural aspects and physiological consequences of APP/APLP trans-dimerization. In: *Experimental brain research* 217 (3-4), S. 389–395. DOI: 10.1007/s00221-011-2878-6.

Becker-Pauly, Christoph; Pietrzik, Claus U. (2016): The Metalloprotease Meprin β Is an Alternative β -Secretase of APP. In: *Frontiers in molecular neuroscience* 9, S. 159. DOI: 10.3389/fnmol.2016.00159.

Beckmann, Anna-Madeleine; Glebov, Konstantin; Walter, Jochen; Merkel, Olaf; Mangold, Martin; Schmidt, Frederike et al. (2016): The intact Kunitz domain protects the amyloid precursor protein from being processed by matriptase-2. In: *Biological chemistry* 397 (8), S. 777–790. DOI: 10.1515/hsz-2015-0263.

Behl, Tapan; Kaur, Ishnoor; Sehgal, Aayush; Khandige, Prasanna Shama; Imran, Mohd; Gulati, Monica et al. (2024): The link between Alzheimer's disease and stroke:

- A detrimental synergism. In: *Ageing research reviews* 99, S. 102388. DOI: 10.1016/j.arr.2024.102388.
- Behring, Emil von (1890): Ueber das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thieren. DOI: 10.17192/eb2013.0164.
- Benarroch, Eduardo E. (2018): Glutamatergic synaptic plasticity and dysfunction in Alzheimer disease: Emerging mechanisms. In: *Neurology* 91 (3), S. 125–132. DOI: 10.1212/wnl.0000000000005807.
- Bertenshaw, Greg P.; Norcum, Mona T.; Bond, Judith S. (2003): Structure of homo- and hetero-oligomeric meprin metalloproteases. Dimers, tetramers, and high molecular mass multimers. In: *Journal of Biological Chemistry* 278 (4), S. 2522–2532. DOI: 10.1074/jbc.M208808200.
- Beyreuther, K.; Masters, C. L. (1991): Amyloid precursor protein (APP) and beta A4 amyloid in the etiology of Alzheimer's disease: precursor-product relationships in the derangement of neuronal function. In: *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 1 (4), S. 241–251. DOI: 10.1111/j.1750-3639.1991.tb00667.x.
- Biasin, Valentina; Marsh, Leigh M.; Egemnazarov, Bakytbek; Wilhelm, Jochen; Ghanim, Bahil; Klepetko, Walter et al. (2014): Meprin β , a novel mediator of vascular remodelling underlying pulmonary hypertension. In: *The Journal of pathology* 233 (1), S. 7–17. DOI: 10.1002/path.4303.
- Bien, Jessica; Jefferson, Tamara; Causević, Mirsada; Jumpertz, Thorsten; Munter, Lisa; Multhaup, Gerd et al. (2012): The metalloprotease meprin β generates amino terminal-truncated amyloid β peptide species. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (40), S. 33304–33313. DOI: 10.1074/jbc.M112.395608.
- Bilal Malik, Abhijeet Ghatol (Hg.) (2024): Understanding How Monoclonal Antibodies Work. PMID: 34283484: StatPearls [Internet. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34283484/>.
- Black, J. E.; Isaacs, K. R.; Anderson, B. J.; Alcantara, A. A.; Greenough, W. T. (1990): Learning causes synaptogenesis, whereas motor activity causes angiogenesis, in cerebellar cortex of adult rats. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (14), S. 5568–5572. DOI: 10.1073/pnas.87.14.5568.

- Blennow, Kaj; Leon, Mony J. de; Zetterberg, Henrik (2006): Alzheimer's disease. In: *The Lancet* 368 (9533), S. 387–403. DOI: 10.1016/S0140-6736(06)69113-7.
- Blobel, Carl P. (2005): ADAMs: key components in EGFR signalling and development. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 6 (1), S. 32–43. DOI: 10.1038/nrm1548.
- Blotenberg, Iris; Hoffmann, Wolfgang; Thyrian, Jochen René (2023): Dementia in Germany: Epidemiology and Prevention Potential. In: *Deutsches Arzteblatt international* 120 (27-28), S. 470–476. DOI: 10.3238/arztebl.m2023.0100.
- Boespflug, Erin L.; Iliff, Jeffrey J. (2018): The Emerging Relationship Between Interstitial Fluid-Cerebrospinal Fluid Exchange, Amyloid- β , and Sleep. In: *Biological psychiatry* 83 (4), S. 328–336. DOI: 10.1016/j.biopsych.2017.11.031.
- Bond, J. S.; Beynon, R. J. (1995): The astacin family of metalloendopeptidases. In: *Protein science : a publication of the Protein Society* 4 (7), S. 1247–1261. DOI: 10.1002/pro.5560040701.
- Bordji, Karim; Becerril-Ortega, Javier; Nicole, Olivier; Buisson, Alain (2010): Activation of extrasynaptic, but not synaptic, NMDA receptors modifies amyloid precursor protein expression pattern and increases amyloid- β production. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30 (47), S. 15927–15942. DOI: 10.1523/jneurosci.3021-10.2010.
- Braak, H.; Braak, E. (1991): Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. In: *Acta neuropathologica* 82 (4), S. 239–259. DOI: 10.1007/BF00308809.
- Broder, Claudia; Arnold, Philipp; Vadon-Le Goff, Sandrine; Konerding, Moritz A.; Bahr, Kerstin; Müller, Stefan et al. (2013): Metalloproteases meprin α and meprin β are C- and N-procollagen proteinases important for collagen assembly and tensile strength. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (35), S. 14219–14224. DOI: 10.1073/pnas.1305464110.
- Broder, Claudia; Becker-Pauly, Christoph (2013a): The metalloproteases meprin α and meprin β : unique enzymes in inflammation, neurodegeneration, cancer and fibrosis. In: *The Biochemical journal* 450 (2), S. 253–264. DOI: 10.1042/BJ20121751.

Broder, Claudia; Becker-Pauly, Christoph (2013b): The metalloproteases meprin α and meprin β : unique enzymes in inflammation, neurodegeneration, cancer and fibrosis. In: *The Biochemical journal* 450 (2), S. 253–264. DOI: 10.1042/BJ20121751.

Brubacher, D.; Monsch, A. U.; Stähelin, H. B. (2004): Weight change and cognitive performance. In: *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* 28 (9), S. 1163–1167. DOI: 10.1038/sj.ijo.0802721.

Busche, Marc Aurel; Eichhoff, Gerhard; Adelsberger, Helmuth; Abramowski, Dorothee; Wiederhold, Karl-Heinz; Haass, Christian et al. (2008): Clusters of hyperactive neurons near amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. In: *Science (New York, N.Y.)* 321 (5896), S. 1686–1689. DOI: 10.1126/science.1162844.

Bylander, John; Li, Qing; Ramesh, Ganesan; Zhang, Binzhi; Reeves, W. Brian; Bond, Judith S. (2008): Targeted disruption of the meprin metalloproteinase beta gene protects against renal ischemia-reperfusion injury in mice. In: *American journal of physiology. Renal physiology* 294 (3), F480-90. DOI: 10.1152/ajprenal.00214.2007.

Calignon, Alix de; Polydoro, Manuela; Suárez-Calvet, Marc; William, Christopher; Adamowicz, David H.; Kopeikina, Kathy J. et al. (2012): Propagation of tau pathology in a model of early Alzheimer's disease. In: *Neuron* 73 (4), S. 685–697. DOI: 10.1016/j.neuron.2011.11.033.

Callen, D. J.; Black, S. E.; Gao, F.; Caldwell, C. B.; Szalai, J. P. (2001): Beyond the hippocampus: MRI volumetry confirms widespread limbic atrophy in AD. In: *Neurology* 57 (9), S. 1669–1674. DOI: 10.1212/wnl.57.9.1669.

Campbell D. H.; Pressman D.; Pauling L. (1943): The Nature of the Forces Between Antigen and Antibody and of the Precipitation Reaction. In: *American Physiological Society*. Online verfügbar unter <https://profiles.nlm.nih.gov/101584639X106>.

Carro, E.; Trejo, J. L.; Busiguina, S.; Torres-Aleman, I. (2001): Circulating insulin-like growth factor I mediates the protective effects of physical exercise against brain insults of different etiology and anatomy. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21 (15), S. 5678–5684. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.21-15-05678.2001.

- Catherine A. Rotkamp, *Akihiko Nunomura, Arun K. Raina, †Lawrence M. Sayre, George Perry, and Mark A. Smith (2000): Oxidative Stress, Antioxidants, and Alzheimer Disease. In: *Alzheimer Disease and Associated Disorders* (14), S. 62–66.
- Chandra, V.; Pandav, R.; Dodge, H. H.; Johnston, J. M.; Belle, S. H.; DeKosky, S. T.; Ganguli, M. (2001): Incidence of Alzheimer's disease in a rural community in India: the Indo-US study. In: *Neurology* 57 (6), S. 985–989. DOI: 10.1212/wnl.57.6.985.
- Chaudhary, Bharat; Kumari, Sneha; Dhapola, Rishika; Sharma, Prajjwal; Paidlewar, Mohit; Vellingiri, Balachandar et al. (2025): Calcium dysregulation in Alzheimer's disease: unraveling the molecular nexus of neuronal dysfunction and therapeutic opportunities. In: *Biochemical pharmacology* 242 (Pt 2), S. 117211. DOI: 10.1016/j.bcp.2025.117211.
- Chávez-Castillo, Mervin; Gotera, María Paula; Duran, Pablo; Díaz, María P.; Nava, Manuel; Cano, Clímaco et al. (2025): Neuroprotective Role of Omega-3 Fatty Acids: Fighting Alzheimer's Disease. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 30 (15). DOI: 10.3390/molecules30153057.
- Cho, Yoon Young; Kwon, Oh-Hoon; Chung, Sungkwon (2020): Preferred Endocytosis of Amyloid Precursor Protein from Cholesterol-Enriched Lipid Raft Microdomains. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 25 (23). DOI: 10.3390/molecules25235490.
- Chuanshen Wua,* , Dongfeng Zhoua, Chen Wenb, Lin Zhangc, Peter Comoc, Youlin Qiaob (2003): Relationship between blood pressure and Alzheimer's disease in Linxian County, China. In: *Life Sciences* 72, S. 1125–1133.
- Cirrito, John R.; Yamada, Kelvin A.; Finn, Mary Beth; Sloviter, Robert S.; Bales, Kelly R.; May, Patrick C. et al. (2005): Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid-beta levels in vivo. In: *Neuron* 48 (6), S. 913–922. DOI: 10.1016/j.neuron.2005.10.028.
- Clarfield, A. Mark (2003): The decreasing prevalence of reversible dementias: an updated meta-analysis. In: *Archives of internal medicine* 163 (18), S. 2219–2229. DOI: 10.1001/archinte.163.18.2219.
- Cotman, Carl W.; Berchtold, Nicole C. (2002): Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. In: *Trends in neurosciences* 25 (6), S. 295–301. DOI: 10.1016/s0166-2236(02)02143-4.

Coulson, E. J.; Paliga, K.; Beyreuther, K.; Masters, C. L. (2000): What the evolution of the amyloid protein precursor supergene family tells us about its function. In: *Neurochemistry international* 36 (3), S. 175–184. DOI: 10.1016/s0197-0186(99)00125-4.

Cummings, Jeffrey L.; Atri, Alireza; Feldman, Howard H.; Hansson, Oskar; Sano, Mary; Knop, Filip K. et al. (2025a): evoke and evoke+: design of two large-scale, double-blind, placebo-controlled, phase 3 studies evaluating efficacy, safety, and tolerability of semaglutide in early-stage symptomatic Alzheimer's disease. In: *Alzheimer's research & therapy* 17 (1), S. 14. DOI: 10.1186/s13195-024-01666-7.

Cummings, Jeffrey L.; Zhou, Yadi; Lee, Garam; Zhong, Kate; Fonseca, Jorge; Leisgang-Osse, Amanda M.; Cheng, Feixiong (2025b): Alzheimer's disease drug development pipeline: 2025. In: *Alzheimer's & dementia (New York, N. Y.)* 11 (2), e70098. DOI: 10.1002/trc2.70098.

Dahms, Sven O.; Könnig, Ina; Roeser, Dirk; Gührs, Karl-Heinz; Mayer, Magnus C.; Kaden, Daniela et al. (2012): Metal binding dictates conformation and function of the amyloid precursor protein (APP) E2 domain. In: *Journal of molecular biology* 416 (3), S. 438–452. DOI: 10.1016/j.jmb.2011.12.057.

Danaher Life Sciences (2024): Hybridoma generation techniques - innovations, benefits & future. Online verfügbar unter <https://lifesciences.danaher.com/us/en/latest-innovations-hybridoma-generation..>, zuletzt geprüft am 24.05.2024.

Deborah Gustafson, PhD; Elisabeth Rotenberg, PhD; Kaj Blennow, PhD; Bertil Steen, MD, PhD; Ingmar Skoog MD, PhD (2003): An 18-Year Follow-up of Overweight and Risk of Alzheimer Disease. In: *Arch Intern Med* 163, S. 1524–1528.

DeKosky, S. T.; Scheff, S. W. (1990): Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. In: *Annals of neurology* 27 (5), S. 457–464. DOI: 10.1002/ana.410270502.

Delacourte, A.; David, J. P.; Sergeant, N.; Buée, L.; Wattez, A.; Vermersch, P. et al. (1999): The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. In: *Neurology* 52 (6), S. 1158–1165. DOI: 10.1212/wnl.52.6.1158.

D'Onofrio, Grazia; Sancarolo, Daniele; Panza, Francesco; Copetti, Massimiliano; Cascavilla, Leandro; Paris, Francesco et al. (2012): Neuropsychiatric Symptoms and Functional Status in Alzheimer's Disease and Vascular Dementia Patients. In: *CAR* 9 (6), S. 759–771. DOI: 10.2174/156720512801322582.

Dubois, Bruno; Feldman, Howard H.; Jacova, Claudia; Dekosky, Steven T.; Barberger-Gateau, Pascale; Cummings, Jeffrey et al. (2007): Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. In: *The Lancet Neurology* 6 (8), S. 734–746. DOI: 10.1016/S1474-4422(07)70178-3.

Dujardin, Simon; Commins, Caitlin; Lathuiliere, Aurelien; Beerepoot, Pieter; Fernandes, Analiese R.; Kamath, Tarun V. et al. (2020): Tau molecular diversity contributes to clinical heterogeneity in Alzheimer's disease. In: *Nature medicine* 26 (8), S. 1256–1263. DOI: 10.1038/s41591-020-0938-9.

Dyrks, T.; Weidemann, A.; Multhaup, G.; Salbaum, J. M.; Lemaire, H. G.; Kang, J. et al. (1988): Identification, transmembrane orientation and biogenesis of the amyloid A4 precursor of Alzheimer's disease. In: *The EMBO journal* 7 (4), S. 949–957. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1988.tb02900.x.

Edbauer, Dieter; Winkler, Edith; Regula, Joerg T.; Pesold, Brigitte; Steiner, Harald; Haass, Christian (2003): Reconstitution of gamma-secretase activity. In: *Nature cell biology* 5 (5), S. 486–488. DOI: 10.1038/ncb960.

EDELMAN, G. M.; POULIK, M. D. (1961): Studies on structural units of the gamma-globulins. In: *The Journal of experimental medicine* 113 (5), S. 861–884. DOI: 10.1084/jem.113.5.861.

Eftekharzadeh, Bahareh; Daigle, J. Gavin; Kapinos, Larisa E.; Coyne, Alyssa; Schiantarelli, Julia; Carlomagno, Yari et al. (2018): Tau Protein Disrupts Nucleocytoplasmic Transport in Alzheimer's Disease. In: *Neuron* 99 (5), 925-940.e7. DOI: 10.1016/j.neuron.2018.07.039.

Eggert, Simone; Midthune, Brea; Cottrell, Barbara; Koo, Edward H. (2009): Induced dimerization of the amyloid precursor protein leads to decreased amyloid-beta protein production. In: *The Journal of biological chemistry* 284 (42), S. 28943–28952. DOI: 10.1074/jbc.m109.038646.

Elias, M. F.; Elias, P. K.; Sullivan, L. M.; Wolf, P. A.; D'Agostino, R. B. (2003): Lower cognitive function in the presence of obesity and hypertension: the Framingham heart

study. In: *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* 27 (2), S. 260–268. DOI: 10.1038/sj.ijo.802225.

Emmerling, M. R.; Morganti-Kossmann, M. C.; Kossmann, T.; Stahel, P. F.; Watson, M. D.; Evans, L. M. et al. (2000): Traumatic brain injury elevates the Alzheimer's amyloid peptide A beta 42 in human CSF. A possible role for nerve cell injury. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 903, S. 118–122. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06357.x.

Engelhart, Marianne J.; Geerlings, Mirjam I.; Ruitenberg, Annemieke; van Swieten, John C.; Hofman, Albert; Witteman, Jacqueline C. M.; Breteler, Monique M. B. (2002): Dietary intake of antioxidants and risk of Alzheimer disease. In: *JAMA* 287 (24), S. 3223–3229. DOI: 10.1001/jama.287.24.3223.

Engvall, E.; Perlmann, P. (1971): Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. In: *Immunochemistry* 8 (9), S. 871–874. DOI: 10.1016/0019-2791(71)90454-x.

Evans, D. A.; Beckett, L. A.; Albert, M. S.; Hebert, L. E.; Scherr, P. A.; Funkenstein, H. H.; Taylor, J. O. (1993): Level of education and change in cognitive function in a community population of older persons. In: *Annals of epidemiology* 3 (1), S. 71–77. DOI: 10.1016/1047-2797(93)90012-s.

Evans, D. A.; Hebert, L. E.; Beckett, L. A.; Scherr, P. A.; Albert, M. S.; Chown, M. J. et al. (1997): Education and other measures of socioeconomic status and risk of incident Alzheimer disease in a defined population of older persons. In: *Archives of neurology* 54 (11), S. 1399–1405. DOI: 10.1001/archneur.1997.00550230066019.

Faxén-Irving, Gerd; Basun, Hans; Cederholm, Tommy (2005): Nutritional and cognitive relationships and long-term mortality in patients with various dementia disorders. In: *Age and Ageing* 34 (2), S. 136–141. DOI: 10.1093/ageing/afi023.

Fink, Howard A.; Jutkowitz, Eric; McCarten, J. Riley; Hemmy, Laura S.; Butler, Mary; Davila, Heather et al. (2018): Pharmacologic Interventions to Prevent Cognitive Decline, Mild Cognitive Impairment, and Clinical Alzheimer-Type Dementia: A Systematic Review. In: *Annals of internal medicine* 168 (1), S. 39–51. DOI: 10.7326/M17-1529.

Ford, Earl S. (2002): Does exercise reduce inflammation? Physical activity and C-reactive protein among U.S. adults. In: *Epidemiology (Cambridge, Mass.)* 13 (5), S. 561–568. DOI: 10.1097/00001648-200209000-00012.

Fragraeus, Astrid (1948): Antibody production in relation to the development of plasma cells. in vivo and in vitro experiments. In: *Acta Medica Scandinavia* (204), S. 110–116.

Franz, G.; Beer, R.; Kampfl, A.; Engelhardt, K.; Schmutzhard, E.; Ulmer, H.; Deisenhammer, F. (2003): Amyloid beta 1-42 and tau in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury. In: *Neurology* 60 (9), S. 1457–1461. DOI: 10.1212/01.WNL.0000063313.57292.00.

Fratiglioni, Laura; Paillard-Borg, Stephanie; Winblad, Bengt (2004): An active and socially integrated lifestyle in late life might protect against dementia. In: *The Lancet Neurology* 3 (6), S. 343–353. DOI: 10.1016/S1474-4422(04)00767-7.

Gallardo, Gilbert; Holtzman, David M. (2019): Amyloid- β and Tau at the Crossroads of Alzheimer's Disease. In: *Advances in experimental medicine and biology* 1184, S. 187–203. DOI: 10.1007/978-981-32-9358-8_16.

Gandhi, Swetal; Refolo, Lorenzo M.; Sambamurti, Kumar (2004): Amyloid precursor protein compartmentalization restricts beta-amyloid production: therapeutic targets based on BACE compartmentalization. In: *Journal of molecular neuroscience : MN* 24 (1), S. 137–143. DOI: 10.1385/jmn:24:1:137.

Gesamtbundesausschuss (GBA) (2023): Verordnungseinschränkungen. Online verfügbar unter <https://www.g-ba.de/downloads/83-691-795/AM-RL-III-Verordnungseinschränkungen2023-05-12>, zuletzt aktualisiert am 12.05.2023.

Gindorf, Markus; Storck, Steffen E.; Ohler, Anke; Scharfenberg, Franka; Becker-Pauly, Christoph; Pietrzik, Claus U. (2021a): Meprin β : A novel regulator of blood-brain barrier integrity. In: *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 41 (1), S. 31–44. DOI: 10.1177/0271678X20905206.

Gindorf, Markus; Storck, Steffen E.; Ohler, Anke; Scharfenberg, Franka; Becker-Pauly, Christoph; Pietrzik, Claus U. (2021b): Meprin β : A novel regulator of blood-brain barrier integrity. In: *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official*

Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism 41 (1), S. 31–44. DOI: 10.1177/0271678X20905206.

Glennner, G. G.; Wong, C. W. (1984): Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. In: *Biochemical and biophysical research communications* 120 (3), S. 885–890. DOI: 10.1016/s0006-291x(84)80190-4.

Goate, A.; Chartier-Harlin, M. C.; Mullan, M.; Brown, J.; Crawford, F.; Fidani, L. et al. (1991): Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. In: *Nature* 349 (6311), S. 704–706. DOI: 10.1038/349704a0.

Gomis-Rüth, F. Xavier (2003): Structural Aspects of the Metzincin Clan of Metalloendopeptidases. In: *MB* 24 (2), S. 157–202. DOI: 10.1385/MB:24:2:157.

Gomis-Rüth, F. Xavier (2009): Catalytic domain architecture of metzincin metalloproteases. In: *Journal of Biological Chemistry* 284 (23), S. 15353–15357. DOI: 10.1074/jbc.R800069200.

Gomis-Rüth, F. Xavier; Trillo-Muyo, Sergio; Stöcker, Walter (2012): Functional and structural insights into astacin metallopeptidases. In: *Biological chemistry* 393 (10), S. 1027–1041. DOI: 10.1515/hsz-2012-0149.

Gorelick, Philip B.; Scuteri, Angelo; Black, Sandra E.; Decarli, Charles; Greenberg, Steven M.; Iadecola, Costantino et al. (2011): Vascular contributions to cognitive impairment and dementia: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. In: *Stroke* 42 (9), S. 2672–2713. DOI: 10.1161/str.0b013e3182299496.

Götz, J.; Chen, F.; van Dorpe, J.; Nitsch, R. M. (2001): Formation of neurofibrillary tangles in P301L tau transgenic mice induced by Aβ₄₂ fibrils. In: *Science (New York, N.Y.)* 293 (5534), S. 1491–1495. DOI: 10.1126/science.1062097.

Gratuze, Maud; Leyns, Cheryl Eg; Sauerbeck, Andrew D.; St-Pierre, Marie-Kim; Xiong, Monica; Kim, Nayeon et al. (2020): Impact of TREM2R47H variant on tau pathology-induced gliosis and neurodegeneration. In: *The Journal of clinical investigation* 130 (9), S. 4954–4968. DOI: 10.1172/JCI138179.

Haass, C.; Capell, A.; Citron, M.; Teplow, D. B.; Selkoe, D. J. (1995): The vacuolar H(+)-ATPase inhibitor bafilomycin A1 differentially affects proteolytic processing of mutant and wild-type beta-amyloid precursor protein. In: *Journal of Biological Chemistry* 270 (11), S. 6186–6192. DOI: 10.1074/jbc.270.11.6186.

Haass, Christian; Selkoe, Dennis J. (2007): Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 8 (2), S. 101–112. DOI: 10.1038/nrm2101.

Hall, K. S.; Gao, S.; Unverzagt, F. W.; Hendrie, H. C. (2000): Low education and childhood rural residence: risk for Alzheimer's disease in African Americans. In: *Neurology* 54 (1), S. 95–99. DOI: 10.1212/wnl.54.1.95.

Han, Kyung Ho; Li, Yi-Chuan; Parveen, Rabia; Venkataraman, Srimathi; Lin, Chih-Wei (2025): Technologies for Monoclonal Antibody Discovery and Development. In: *International journal of molecular sciences* 26 (21). DOI: 10.3390/ijms262110470.

Hansson, Oskar; Zetterberg, Henrik; Buchhave, Peder; Andreasson, Ulf; Londos, Elisabet; Minthon, Lennart; Blennow, Kaj (2007): Prediction of Alzheimer's disease using the CSF Abeta42/Abeta40 ratio in patients with mild cognitive impairment. In: *Dementia and geriatric cognitive disorders* 23 (5), S. 316–320. DOI: 10.1159/000100926.

Hardy, J.; Allsop, D. (1991): Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. In: *Trends in pharmacological sciences* 12 (10), S. 383–388. DOI: 10.1016/0165-6147(91)90609-v.

Hardy, J. A.; Higgins, G. A. (1992): Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. In: *Science (New York, N.Y.)* 256 (5054), S. 184–185. DOI: 10.1126/science.1566067.

Herrup, Karl (2015): The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis. In: *Nature neuroscience* 18 (6), S. 794–799. DOI: 10.1038/nn.4017.

Herzog, Christian; Haun, Randy S.; Kaushal, Varsha; Mayeux, Philip R.; Shah, Sudhir V.; Kaushal, Gur P. (2009): Meprin A and meprin alpha generate biologically functional IL-1beta from pro-IL-1beta. In: *Biochemical and biophysical research communications* 379 (4), S. 904–908. DOI: 10.1016/j.bbrc.2008.12.161.

Holtzman, David M.; Morris, John C.; Goate, Alison M. (2011): Alzheimer's disease: the challenge of the second century. In: *Science translational medicine* 3 (77), 77sr1. DOI: 10.1126/scitranslmed.3002369.

<https://www.alzforum.org/alsbiomarker>.

Huang, Shu-Ming; Mouri, Akihiro; Kokubo, Hideko; Nakajima, Ryuichi; Suemoto, Takahiro; Higuchi, Makoto et al. (2006): Neprilysin-sensitive synapse-associated amyloid-beta peptide oligomers impair neuronal plasticity and cognitive function. In: *Journal of Biological Chemistry* 281 (26), S. 17941–17951. DOI: 10.1074/jbc.M601372200.

Hughes, Diarmaid; Judge, Conor; Murphy, Robert; Loughlin, Elaine; Costello, Maria; Whiteley, William et al. (2020): Association of Blood Pressure Lowering With Incident Dementia or Cognitive Impairment: A Systematic Review and Meta-analysis. In: *JAMA* 323 (19), S. 1934–1944. DOI: 10.1001/jama.2020.4249.

Huguenin, Maya; Müller, Eliane J.; Trachsel-Rösmann, Sandra; Oneda, Beatrice; Ambort, Daniel; Sterchi, Erwin E.; Lottaz, Daniel (2008): The metalloprotease meprin beta processes E-cadherin and weakens intercellular adhesion. In: *PloS one* 3 (5), e2153. DOI: 10.1371/journal.pone.0002153.

Hussain, I.; Powell, D.; Howlett, D. R.; Tew, D. G.; Meek, T. D.; Chapman, C. et al. (1999): Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. In: *Molecular and cellular neurosciences* 14 (6), S. 419–427. DOI: 10.1006/mcne.1999.0811.

Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen (2011): Resonderanalysen zu Memantin bei Alzheimer Demenz. Rapid Report A10-06. Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen.

IQWiG (2020): Strukturelle Bildgebung zur S3-Leitlinie Demenzen. Strukturelle Bildgebung. Nr. 1012, 07.12.2020.

Isbert, Simone; Wagner, Katja; Eggert, Simone; Schweitzer, Andrea; Multhaup, Gerd; Weggen, Sascha et al. (2012): APP dimer formation is initiated in the endoplasmic reticulum and differs between APP isoforms. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 69 (8), S. 1353–1375. DOI: 10.1007/s00018-011-0882-4.

Iwata, Akira; Chen, Xiao-Han; McIntosh, Tracy K.; Browne, Kevin D.; Smith, Douglas H. (2002): Long-term accumulation of amyloid-beta in axons following brain trauma without persistent upregulation of amyloid precursor protein genes. In: *Journal of neuropathology and experimental neurology* 61 (12), S. 1056–1068. DOI: 10.1093/jnen/61.12.1056.

Jäckle, Felix; Schmidt, Frederike; Wichert, Rielana; Arnold, Philipp; Prox, Johannes; Mangold, Martin et al. (2015): Metalloprotease meprin β is activated by transmembrane serine protease matriptase-2 at the cell surface thereby enhancing APP shedding. In: *The Biochemical journal* 470 (1), S. 91–103. DOI: 10.1042/BJ20141417.

James, K.; Bell, G. T. (1987): Human monoclonal antibody production. Current status and future prospects. In: *Journal of immunological methods* 100 (1-2), S. 5–40. DOI: 10.1016/0022-1759(87)90170-0.

Jefferson, Tamara; Čaušević, Mirsada; dem Keller, Ulrich auf; Schilling, Oliver; Isbert, Simone; Geyer, Rebecca et al. (2011): Metalloprotease meprin beta generates nontoxic N-terminal amyloid precursor protein fragments in vivo. In: *The Journal of biological chemistry* 286 (31), S. 27741–27750. DOI: 10.1074/jbc.M111.252718.

Jefferson, Tamara; dem Keller, Ulrich auf; Bellac, Caroline; Metz, Verena V.; Broder, Claudia; Hedrich, Jana et al. (2013): The substrate degradome of meprin metalloproteases reveals an unexpected proteolytic link between meprin β and ADAM10. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 70 (2), S. 309–333. DOI: 10.1007/s00018-012-1106-2.

Jeong, Su-Min; Park, Junhee; Han, Kyungdo; Yoo, Juhwan; Yoo, Jung Eun; Lee, Cheol Min et al. (2023): Association of Changes in Smoking Intensity With Risk of Dementia in Korea. In: *JAMA network open* 6 (1), e2251506. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2022.51506.

Jiang, Xiaoyan; Andjelkovic, Anuska V.; Zhu, Ling; Yang, Tuo; Bennett, Michael V. L.; Chen, Jun et al. (2018): Blood-brain barrier dysfunction and recovery after ischemic stroke. In: *Progress in neurobiology* 163-164, S. 144–171. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2017.10.001.

Jose A. Luchsinger, M. D.; Ming-Xin Tang, PhD; Steven Shea, M. D.; and Richard Mayeux, M. D. (2004): Hyperinsulinemia and risk of Alzheimer disease. In: *Nerology* 63, S. 1187–1192.

Jose A. Luchsinger, Ming-Xin Tang, Yaakov Stern, Steven Shea, and Richard Mayeux (2001): Diabetes Mellitus and Risk of Alzheimer's Disease and Dementia with Stroke in a Multiethnic Cohort. In: *American Journal of Epidemiology* 154 (7), S. 635–641.

Kaden, Daniela; Munter, Lisa Marie; Reif, Bernd; Multhaup, Gerd (2012): The amyloid precursor protein and its homologues: structural and functional aspects of native and pathogenic oligomerization. In: *European journal of cell biology* 91 (4), S. 234–239. DOI: 10.1016/j.ejcb.2011.01.017.

Kaden, Daniela; Munter, Lisa-Marie; Joshi, Mangesh; Treiber, Carina; Weise, Christoph; Bethge, Tobias et al. (2008): Homophilic interactions of the amyloid precursor protein (APP) ectodomain are regulated by the loop region and affect beta-secretase cleavage of APP. In: *Journal of Biological Chemistry* 283 (11), S. 7271–7279. DOI: 10.1074/jbc.M708046200.

Kaduszkiewicz, Hanna; Zimmermann, Thomas; Beck-Bornholdt, Hans-Peter; van den Bussche, Hendrik (2005): Cholinesterase inhibitors for patients with Alzheimer's disease: systematic review of randomised clinical trials. In: *BMJ (Clinical research ed.)* 331 (7512), S. 321–327. DOI: 10.1136/bmj.331.7512.321.

Kamatham, Pushpa Tryphena; Shukla, Rashi; Khatri, Dharmendra Kumar; Vora, Lalitkumar K. (2024): Pathogenesis, diagnostics, and therapeutics for Alzheimer's disease: Breaking the memory barrier. In: *Ageing research reviews* 101, S. 102481. DOI: 10.1016/j.arr.2024.102481.

Kang, J.; Müller-Hill, B. (1990): Differential splicing of Alzheimer's disease amyloid A4 precursor RNA in rat tissues: PreA4(695) mRNA is predominantly produced in rat and human brain. In: *Biochemical and biophysical research communications* 166 (3), S. 1192–1200. DOI: 10.1016/0006-291x(90)90992-v.

Kang, Jae-Eun; Lim, Miranda M.; Bateman, Randall J.; Lee, James J.; Smyth, Liam P.; Cirrito, John R. et al. (2009): Amyloid-beta dynamics are regulated by orexin and the sleep-wake cycle. In: *Science (New York, N.Y.)* 326 (5955), S. 1005–1007. DOI: 10.1126/science.1180962.

Kang, Ju Hee; Korecka, Magdalena; Lee, Edward B.; Cousins, Katheryn A. Q.; Tropea, Thomas F.; Chen-Plotkin, Alice A. et al. (2023): Alzheimer Disease Biomarkers: Moving from CSF to Plasma for Reliable Detection of Amyloid and tau Pathology. In: *Clinical chemistry* 69 (11), S. 1247–1259. DOI: 10.1093/clinchem/hvad139.

Kang, Seo Young; Kim, Ye-Jee; Jang, Wooyoung; Son, Ki Young; Park, Hye Soon; Kim, Young Sik (2021): Body mass index trajectories and the risk for Alzheimer's disease among older adults. In: *Scientific reports* 11 (1), S. 3087. DOI: 10.1038/s41598-021-82593-7.

Keller, Maximilian; Gallagher, Celine; Kreiselmaier, Simon; Bickenbach, Kira; Schmitt, Ulrich; Marengo, Liana et al. (2025): Meprin β Modulates Brevican Proteolysis Impairing Neural Plasticity and Memory Formation. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 39 (10), e70616. DOI: 10.1096/fj.202500017R.

Keskin, Aylin D.; Kekuš, Maja; Adelsberger, Helmuth; Neumann, Ulf; Shimshek, Derya R.; Song, Beomjong et al. (2017): BACE inhibition-dependent repair of Alzheimer's pathophysiology. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (32), S. 8631–8636. DOI: 10.1073/pnas.1708106114.

Klunk, William E.; Engler, Henry; Nordberg, Agneta; Wang, Yanming; Blomqvist, Gunnar; Holt, Daniel P. et al. (2004): Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. In: *Annals of neurology* 55 (3), S. 306–319. DOI: 10.1002/ana.20009.

Knopman, David S.; Amieva, Helene; Petersen, Ronald C.; Chételat, Gäel; Holtzman, David M.; Hyman, Bradley T. et al. (2021): Alzheimer disease. In: *Nature reviews. Disease primers* 7 (1), S. 33. DOI: 10.1038/s41572-021-00269-y.

Koffie, Robert M.; Meyer-Luehmann, Melanie; Hashimoto, Tadafumi; Adams, Kenneth W.; Mielke, Matthew L.; Garcia-Alloza, Monica et al. (2009): Oligomeric amyloid beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (10), S. 4012–4017. DOI: 10.1073/pnas.0811698106.

Köhler, G.; Milstein, C. (2005): Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. 1975. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 174 (5), S. 2453–2455.

Kong, Geoffrey K-W; Miles, Luke A.; Crespi, Gabriela A. N.; Morton, Craig J.; Ng, Hooi Ling; Barnham, Kevin J. et al. (2008): Copper binding to the Alzheimer's disease amyloid precursor protein. In: *European biophysics journal : EBJ* 37 (3), S. 269–279. DOI: 10.1007/s00249-007-0234-3.

Koponen, S.; Taiminen, T.; Kairisto, V.; Portin, R.; Isoniemi, H.; Hinkka, S.; Tenovuo, O. (2004): APOE-epsilon4 predicts dementia but not other psychiatric disorders after traumatic brain injury. In: *Neurology* 63 (4), S. 749–750. DOI: 10.1212/01.WNL.0000134603.57107.2F.

Kothari, Manjeet; Wanjari, Anil; Acharya, Sourya; Karwa, Vineet; Chavhan, Roma; Kumar, Sunil et al. (2024): A Comprehensive Review of Monoclonal Antibodies in Modern Medicine: Tracing the Evolution of a Revolutionary Therapeutic Approach. In: *Cureus* 16 (6), e61983. DOI: 10.7759/cureus.61983.

Kounnas, M. Z.; Moir, R. D.; Rebeck, G. W.; Bush, A. I.; Argraves, W. S.; Tanzi, R. E. et al. (1995): LDL receptor-related protein, a multifunctional ApoE receptor, binds secreted beta-amyloid precursor protein and mediates its degradation. In: *Cell* 82 (2), S. 331–340. DOI: 10.1016/0092-8674(95)90320-8.

Kronenberg, Daniel; Bruns, Bernd C.; Moali, Catherine; Vadon-Le Goff, Sandrine; Sterchi, Erwin E.; Traupe, Heiko et al. (2010): Processing of procollagen III by meprins: new players in extracellular matrix assembly? In: *The Journal of investigative dermatology* 130 (12), S. 2727–2735. DOI: 10.1038/jid.2010.202.

Kuchibhotla, Kishore V.; Goldman, Samuel T.; Lattarulo, Carli R.; Wu, Hai-Yan; Hyman, Bradley T.; Bacskai, Brian J. (2008): Abeta plaques lead to aberrant regulation of calcium homeostasis in vivo resulting in structural and functional disruption of neuronal networks. In: *Neuron* 59 (2), S. 214–225. DOI: 10.1016/j.neuron.2008.06.008.

Kuperstein, Inna; Broersen, Kerensa; Benilova, Iryna; Rozenski, Jef; Jonckheere, Wim; Debulpaep, Maja et al. (2010): Neurotoxicity of Alzheimer's disease A β peptides is induced by small changes in the A β 42 to A β 40 ratio. In: *The EMBO journal* 29 (19), S. 3408–3420. DOI: 10.1038/emboj.2010.211.

Kusoro, Olubunmi; Roche, Moïse; Del-Pino-Casado, Rafael; Leung, Phuong; Orgeta, Vasiliki (2025): Time to Diagnosis in Dementia: A Systematic Review With Meta-Analysis. In: *International journal of geriatric psychiatry* 40 (7), e70129. DOI: 10.1002/gps.70129.

Lena Kilander; Hakan Nyman; Merike Boberg; Hans Lithell (2000): The association between low diastolic blood pressure in middle age and cognitive function in old age. A population based study. In: *Age and Ageing* 29, S. 243–248.

Lenore J. Launer^{a,*}, G. Webster Ross^{b,c}, Helen Petrovitch^c, Kamal Masaki^c, Dan Foley^a, Lon R. White^c, Richard J. Havlik^a (2000): Midlife blood pressure and dementia: the Honolulu–Asia aging study. In: *Neurobiology of aging* 21, S. 49–55.

Levy-Lahad, E.; Wijsman, E. M.; Nemens, E.; Anderson, L.; Goddard, K. A.; Weber, J. L. et al. (1995): A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. In: *Science (New York, N.Y.)* 269 (5226), S. 970–973. DOI: 10.1126/science.7638621.

Ling, Yan; Morgan, Kevin; Kalsheker, Noor (2003): Amyloid precursor protein (APP) and the biology of proteolytic processing: relevance to Alzheimer's disease. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 35 (11), S. 1505–1535. DOI: 10.1016/s1357-2725(03)00133-x.

Linnert, Miriam; Fritz, Claudia; Jäger, Christian; Schlenzig, Dagmar; Ramsbeck, Daniel; Kleinschmidt, Martin et al. (2021): Structure and Dynamics of Meprin β in Complex with a Hydroxamate-Based Inhibitor. In: *International journal of molecular sciences* 22 (11). DOI: 10.3390/ijms22115651.

Liu, Yulu; Lu, Guangyu; Liu, Lin; He, Yuhang; Gong, Weijuan (2024): Cognitive reserve over the life course and risk of dementia: a systematic review and meta-analysis. In: *Frontiers in aging neuroscience* 16, S. 1358992. DOI: 10.3389/fnagi.2024.1358992.

M. E. TRUJILLO & P. E. SCHERER (2005): Adiponectin – journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome. In: *Journal of Internal Medicine* 257, S. 167–175.

Marengo, Liana; Armbrust, Fred; Schoenherr, Caroline; Storck, Steffen E.; Schmitt, Ulrich; Zampar, Silvia et al. (2022): Meprin β knockout reduces brain A β levels and rescues learning and memory impairments in the APP/Jon mouse model for

Alzheimer's disease. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 79 (3), S. 168.
DOI: 10.1007/s00018-022-04205-5.

Mattsson, Niklas; Rajendran, Lawrence; Zetterberg, Henrik; Gustavsson, Mikael; Andreasson, Ulf; Olsson, Maria et al. (2012): BACE1 inhibition induces a specific cerebrospinal fluid β -amyloid pattern that identifies drug effects in the central nervous system. In: *PloS one* 7 (2), e31084. DOI: 10.1371/journal.pone.0031084.

Mattsson, Niklas; Zetterberg, Henrik; Hansson, Oskar; Andreasen, Niels; Parnetti, Lucilla; Jonsson, Michael et al. (2009): CSF biomarkers and incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment. In: *JAMA* 302 (4), S. 385–393.
DOI: 10.1001/jama.2009.1064.

Mayeux, Richard; Stern, Yaakov (2012): Epidemiology of Alzheimer disease. In: *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2 (8). DOI: 10.1101/cshperspect.a006239.

McKhann, G.; Drachman, D.; Folstein, M.; Katzman, R.; Price, D.; 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. In: *Neurology* 34 (7), S. 939–944. DOI: 10.1212/wnl.34.7.939.

McShane, Rupert; Westby, Maggie J.; Roberts, Emmert; Minakaran, Neda; Schneider, Lon; Farrimond, Lucy E. et al. (2019): Memantine for dementia. In: *The Cochrane database of systematic reviews* 3 (3), CD003154. DOI: 10.1002/14651858.CD003154.pub6.

Menéndez-González, M.; Pérez-Pinera, P.; Martínez-Rivera, M.; Calatayud, M. T.; Blázquez Menes, B. (2005): APP processing and the APP-KPI domain involvement in the amyloid cascade. In: *Neuro-degenerative diseases* 2 (6), S. 277–283. DOI: 10.1159/000092315.

Menon, Preeti Kumaran; Koistinen, Niina Anneli; Iverfeldt, Kerstin; Ström, Anna-Lena (2019): Phosphorylation of the amyloid precursor protein (APP) at Ser-675 promotes APP processing involving meprin $\beta\beta$. In: *Journal of Biological Chemistry* 294 (47), S. 17768–17776. DOI: 10.1074/jbc.RA119.008310.

Mihov, Deyan; Raja, Eva; Spiess, Martin (2015): Chondroitin Sulfate Accelerates Trans-Golgi-to-Surface Transport of Proteoglycan Amyloid Precursor Protein. In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 16 (8), S. 853–870. DOI: 10.1111/tra.12294.

Mizuno, Tetsuya (2012): The biphasic role of microglia in Alzheimer's disease. In: *International journal of Alzheimer's disease* 2012, S. 737846. DOI: 10.1155/2012/737846.

Mohs, R. C.; Doody, R. S.; Morris, J. C.; Ieni, J. R.; Rogers, S. L.; Perdomo, C. A.; Pratt, R. D. (2001): A 1-year, placebo-controlled preservation of function survival study of donepezil in AD patients. In: *Neurology* 57 (3), S. 481–488. DOI: 10.1212/wnl.57.3.481.

Molinuevo, José Luis; Ayton, Scott; Batrla, Richard; Bednar, Martin M.; Bittner, Tobias; Cummings, Jeffrey et al. (2018): Current state of Alzheimer's fluid biomarkers. In: *Acta neuropathologica* 136 (6), S. 821–853. DOI: 10.1007/s00401-018-1932-x.

Montine, Thomas J.; Phelps, Creighton H.; Beach, Thomas G.; Bigio, Eileen H.; Cairns, Nigel J.; Dickson, Dennis W. et al. (2012): National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease: a practical approach. In: *Acta neuropathologica* 123 (1), S. 1–11. DOI: 10.1007/s00401-011-0910-3.

Moorthy, Balakrishnan S.; Xie, Bo; Moussa, Ehab M.; Iyer, Lavanya K.; Chandrasekhar, Saradha; Panchal, Jainik P.; Topp, Elizabeth M.: Structure of Monoclonal Antibodies 19, S. 81–89. DOI: 10.1007/978-1-4939-2543-8_6.

Morganti, Francesca; Negri, Ilia (2025): How Cognitive Reserve Could Protect from Dementia? An Analysis of Everyday Activities and Social Behaviors During Lifespan. In: *Brain sciences* 15 (6). DOI: 10.3390/brainsci15060652.

Morris, Martha Clare; Evans, Denis A.; Bienias, Julia L.; Tangney, Christine C.; Bennett, David A.; Aggarwal, Neelum et al. (2002): Dietary intake of antioxidant nutrients and the risk of incident Alzheimer disease in a biracial community study. In: *JAMA* 287 (24), S. 3230–3237. DOI: 10.1001/jama.287.24.3230.

Morris, Martha Clare; Evans, Denis A.; Bienias, Julia L.; Tangney, Christine C.; Bennett, David A.; Aggarwal, Neelum et al. (2003): Dietary fats and the risk of incident Alzheimer disease. In: *Archives of neurology* 60 (2), S. 194–200. DOI: 10.1001/archneur.60.2.194.

Nancy Uhlig (2013a): Charakterisierung der humanen Metalloprotease Meprin beta. Bachelorarbeit im Fachbereich Biologie der Johannes-Gutenberg Universität.

Nancy Uhlig (2013b): Charakterisierung der Metalloprotease Meprin beta. Johannes-Gutenberg Universität Mainz.

Nichols E., et al. (2022): Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. In: *The Lancet. Public health* 7 (2), e105-e125. DOI: 10.1016/S2468-2667(21)00249-8.

Nourhashémi, F.; Deschamps, V.; Larrieu, S.; Letenneur, L.; Dartigues, J-F; Barberger-Gateau, P. (2003): Body mass index and incidence of dementia: the PAQUID study. In: *Neurology* 60 (1), S. 117–119. DOI: 10.1212/01.wnl.0000038910.46217.aa.

O'Brien, Richard J.; Wong, Philip C. (2011): Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. In: *Annual review of neuroscience* 34, S. 185–204. DOI: 10.1146/annurev-neuro-061010-113613.

Ohler, Anke; Debela, Mekdes; Wagner, Susanne; Magdolen, Viktor; Becker-Pauly, Christoph (2010): Analyzing the protease web in skin: meprin metalloproteases are activated specifically by KLK4, 5 and 8 vice versa leading to processing of proKLK7 thereby triggering its activation. In: *Biological chemistry* 391 (4), S. 455–460. DOI: 10.1515/bc.2010.023.

Olsson, Bob; Portelius, Erik; Cullen, Nicholas C.; Sandelius, Åsa; Zetterberg, Henrik; Andreasson, Ulf et al. (2019): Association of Cerebrospinal Fluid Neurofilament Light Protein Levels With Cognition in Patients With Dementia, Motor Neuron Disease, and Movement Disorders. In: *JAMA neurology* 76 (3), S. 318–325. DOI: 10.1001/jamaneurol.2018.3746.

P. K. SMITH,* R. I. KROHN, G. T. HERMANSON, A. K. MALLIA, F. H. GARTNER (1985): Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. In: *Analytical biochemistry* (150), S. 76–85.

Palmer, Alan M. (2010): The role of the blood-CNS barrier in CNS disorders and their treatment. In: *Neurobiology of disease* 37 (1), S. 3–12. DOI: 10.1016/j.nbd.2009.07.029.

Palop, Jorge J.; Mucke, Lennart (2016): Network abnormalities and interneuron dysfunction in Alzheimer disease. In: *Nature reviews. Neuroscience* 17 (12), S. 777–792. DOI: 10.1038/nrn.2016.141.

- Pandiella, A.; Bosenberg, M. W.; Huang, E. J.; Besmer, P.; Massagué, J. (1992): Cleavage of membrane-anchored growth factors involves distinct protease activities regulated through common mechanisms. In: *Journal of Biological Chemistry* 267 (33), S. 24028–24033. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)35940-4.
- Panza, Francesco; Lozupone, Madia; Logroscino, Giancarlo; Imbimbo, Bruno P. (2019): A critical appraisal of amyloid- β -targeting therapies for Alzheimer disease. In: *Nature reviews. Neurology* 15 (2), S. 73–88. DOI: 10.1038/s41582-018-0116-6.
- Paul Ehrlich Institut (2025): Leqembi. Online verfügbar unter <https://www.pei.de/SharedDocs/arzneimittel/sera/EU-1-24-1891.htm>, zuletzt aktualisiert am 01.09.2025, zuletzt geprüft am 18.11.2025.
- Pendlebury, Sarah T.; Rothwell, Peter M. (2009): Prevalence, incidence, and factors associated with pre-stroke and post-stroke dementia: a systematic review and meta-analysis. In: *The Lancet Neurology* 8 (11), S. 1006–1018. DOI: 10.1016/S1474-4422(09)70236-4.
- Perry, George; Cash, Adam D.; Smith, Mark A. (2002): Alzheimer Disease and Oxidative Stress. In: *Journal of biomedicine & biotechnology* 2 (3), S. 120–123. DOI: 10.1155/S1110724302203010.
- Petry, S.; Cummings, J. L.; Hill, M. A.; Shapira, J. (1988): Personality alterations in dementia of the Alzheimer type. In: *Archives of neurology* 45 (11), S. 1187–1190. DOI: 10.1001/archneur.1988.00520350025009.
- Pooler, Amy M.; Noble, Wendy; Hanger, Diane P. (2014): A role for tau at the synapse in Alzheimer's disease pathogenesis. In: *Neuropharmacology* 76 Pt A, S. 1–8. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2013.09.018.
- PORTER, R. R. (1959): The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain. In: *The Biochemical journal* 73 (1), S. 119–126. DOI: 10.1042/bj0730119.
- Prakash, Roshini; Carmichael, S. Thomas (2015): Blood-brain barrier breakdown and neovascularization processes after stroke and traumatic brain injury. In: *Current opinion in neurology* 28 (6), S. 556–564. DOI: 10.1097/WCO.0000000000000248.
- Prox, Johannes; Arnold, Philipp; Becker-Pauly, Christoph (2015): Meprin α and meprin β : Procollagen proteinases in health and disease. In: *Matrix biology : journal*

of the *International Society for Matrix Biology* 44-46, S. 7–13. DOI: 10.1016/j.matbio.2015.01.010.

Qiu, C.; Bäckman, L.; Winblad, B.; Agüero-Torres, H.; Fratiglioni, L. (2001): The influence of education on clinically diagnosed dementia incidence and mortality data from the Kungsholmen Project. In: *Archives of neurology* 58 (12), S. 2034–2039. DOI: 10.1001/archneur.58.12.2034.

R.A. Whitmer, PhD; S. Sidney, M. D.; J. Selby, M. D.; S. Claiborne Johnston, M. D.; and K. Yaffe, M. D. (2005): Midlife cardiovascular risk factors and risk of dementia in late life. In: *Neurology* 64, S. 277–281. DOI: 10.1212/01.

Rauch, Jennifer N.; Luna, Gabriel; Guzman, Elmer; Audouard, Morgane; Challis, Collin; Sibih, Youssef E. et al. (2020): LRP1 is a master regulator of tau uptake and spread. In: *Nature* 580 (7803), S. 381–385. DOI: 10.1038/s41586-020-2156-5.

Rebeck, G. W.; Reiter, J. S.; Strickland, D. K.; Hyman, B. T. (1993): Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: allelic variation and receptor interactions. In: *Neuron* 11 (4), S. 575–580. DOI: 10.1016/0896-6273(93)90070-8.

Reuben, David B.; Judd-Hamilton, Leslie; Harris, Tamara B.; Seeman, Teresa E. (2003): The associations between physical activity and inflammatory markers in high-functioning older persons: MacArthur Studies of Successful Aging. In: *Journal of the American Geriatrics Society* 51 (8), S. 1125–1130. DOI: 10.1046/j.1532-5415.2003.51380.x.

Richard Doll, Richard Peto, Jillian Boreham, Isabelle Sutherland (2000): Smoking and dementia in male British doctors. prospective study. In: *British Medical Journal* 320, S. 1097–1102.

Rita Peila, Beatriz L. Rodriguez, and Lenore J. Launer: Type 2 Diabetes, APOE Gene, and the Risk for Dementia and Related Pathologies. TheHonolulu-AsiaAgingStudy. In: *Diabetes* 2002 (51), S. 1256–1262.

Robert Stewart, M. D.; Kamal Masaki, M. D.; Qian-Li Xue, PhD; Rita Peila, MSc; Helen Petrovitch, M. D.; Lon R. White, M. D.; Lenore J. Launer, PhD (2005): A 32-Year Prospective Study of Change in Body Weight and Incident Dementia: The Honolulu-Asia Aging Study. The Honolulu-Asia Aging Study. In: *Arch Nereol* (62), S. 55–60.

Rogaev, E. I.; Sherrington, R.; Rogaeva, E. A.; Levesque, G.; Ikeda, M.; Liang, Y. et al. (1995): Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. In: *Nature* 376 (6543), S. 775–778. DOI: 10.1038/376775a0.

Rohan de Silva, H. A.; Jen, A.; Wickenden, C.; Jen, L. S.; Wilkinson, S. L.; Patel, A. J. (1997): Cell-specific expression of beta-amyloid precursor protein isoform mRNAs and proteins in neurons and astrocytes. In: *Brain research. Molecular brain research* 47 (1-2), S. 147–156. DOI: 10.1016/S0169-328X(97)00045-4.

Roux, K. H. (1999): Immunoglobulin structure and function as revealed by electron microscopy. In: *International archives of allergy and immunology* 120 (2), S. 85–99. DOI: 10.1159/000024226.

Sander, Hannah; Wallace, Samantha; Plouse, Rachel; Tiwari, Shuchita; Gomes, Aldrin V. (2019): Ponceau S waste: Ponceau S staining for total protein normalization. In: *Analytical biochemistry* 575, S. 44–53. DOI: 10.1016/j.ab.2019.03.010.

Scarmeas, Nikolaos; Stern, Yaakov; Mayeux, Richard; Luchsinger, Jose A. (2006): Mediterranean diet, Alzheimer disease, and vascular mediation. In: *Archives of neurology* 63 (12), S. 1709–1717. DOI: 10.1001/archneur.63.12.noc60109.

Scharfenberg, Franka; Armbrust, Fred; Marengo, Liana; Pietrzik, Claus; Becker-Pauly, Christoph (2019): Regulation of the alternative β -secretase meprin β by ADAM-mediated shedding. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 76 (16), S. 3193–3206. DOI: 10.1007/s00018-019-03179-1.

Scheuner, D.; Eckman, C.; Jensen, M.; Song, X.; Citron, M.; Suzuki, N. et al. (1996): Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. In: *Nature medicine* 2 (8), S. 864–870. DOI: 10.1038/nm0896-864.

Schieb, Heinke; Weidlich, Sebastian; Schlechtingen, Georg; Linning, Philipp; Jennings, Gary; Gruner, Margit et al. (2010): Structural design, solid-phase synthesis and activity of membrane-anchored β -secretase inhibitors on A β generation from wild-type and Swedish-mutant APP. In: *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 16 (48), S. 14412–14423. DOI: 10.1002/chem.201002878.

Schlenzig, Dagmar; Cynis, Holger; Hartlage-Rübsamen, Maike; Zeitschel, Ulrike; Menge, Katja; Fothe, Anja et al. (2018): Dipeptidyl-Peptidase Activity of Meprin β Links N-truncation of A β with Glutaminyl Cyclase-Catalyzed pGlu-A β Formation. In: *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 66 (1), S. 359–375. DOI: 10.3233/JAD-171183.

Schmidt, Vanessa; Baum, Katharina; Lao, Angelyn; Rateitschak, Katja; Schmitz, Yvonne; Teichmann, Anke et al. (2012): Quantitative modelling of amyloidogenic processing and its influence by SORLA in Alzheimer's disease. In: *The EMBO journal* 31 (1), S. 187–200. DOI: 10.1038/emboj.2011.352.

Schneider, Julie A.; Bennett, David A. (2010): Where vascular meets neurodegenerative disease. In: *Stroke* 41 (10 Suppl), 144-146. DOI: 10.1161/STROKEAHA.110.598326.

Schönherr, Caroline; Bien, Jessica; Isbert, Simone; Wichert, Rielana; Prox, Johannes; Altmeyen, Hermann et al. (2016): Generation of aggregation prone N-terminally truncated amyloid β peptides by meprin β depends on the sequence specificity at the cleavage site. In: *Molecular neurodegeneration* 11, S. 19. DOI: 10.1186/s13024-016-0084-5.

Schrader-Fischer, G.; Paganetti, P. A. (1996): Effect of alkalizing agents on the processing of the beta-amyloid precursor protein. In: *Brain research* 716 (1-2), S. 91–100. DOI: 10.1016/0006-8993(96)00002-9.

Schütte, André; Ermund, Anna; Becker-Pauly, Christoph; Johansson, Malin E. V.; Rodriguez-Pineiro, Ana M.; Bäckhed, Fredrik et al. (2014): Microbial-induced meprin β cleavage in MUC2 mucin and a functional CFTR channel are required to release anchored small intestinal mucus. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (34), S. 12396–12401. DOI: 10.1073/pnas.1407597111.

Scott, Andrew M.; Wolchok, Jedd D.; Old, Lloyd J. (2012): Antibody therapy of cancer. In: *Nature reviews. Cancer* 12 (4), S. 278–287. DOI: 10.1038/nrc3236.

Selkoe, D. J. (1991): The molecular pathology of Alzheimer's disease. In: *Neuron* 6 (4), S. 487–498. DOI: 10.1016/0896-6273(91)90052-2.

Selkoe, D. J. (2000): Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and

cytotoxicity of amyloid beta-protein. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 924, S. 17–25. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb05554.x.

Selkoe, Dennis J.; Hardy, John (2016): The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. In: *EMBO molecular medicine* 8 (6), S. 595–608. DOI: 10.15252/emmm.201606210.

Sharma, Akhil; Singh, Thakur Gurjeet (2025): Next-generation neurotherapeutics: mechanistic insights on monoclonal antibodies in Alzheimer's disease. In: *Brain research* 1870, S. 150047. DOI: 10.1016/j.brainres.2025.150047.

Shaw, Leslie M.; Arias, Jalayne; Blennow, Kaj; Galasko, Douglas; Molinuevo, Jose Luis; Salloway, Stephen et al. (2018): Appropriate use criteria for lumbar puncture and cerebrospinal fluid testing in the diagnosis of Alzheimer's disease. In: *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 14 (11), S. 1505–1521. DOI: 10.1016/j.jalz.2018.07.220.

Sherrington, R.; Froelich, S.; Sorbi, S.; Campion, D.; Chi, H.; Rogaeva, E. A. et al. (1996): Alzheimer's disease associated with mutations in presenilin 2 is rare and variably penetrant. In: *Human molecular genetics* 5 (7), S. 985–988. DOI: 10.1093/hmg/5.7.985.

Sherrington, R.; Rogaev, E. I.; Liang, Y.; Rogaeva, E. A.; Levesque, G.; Ikeda, M. et al. (1995): Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. In: *Nature* 375 (6534), S. 754–760. DOI: 10.1038/375754a0.

Shi, Yang; Manis, Melissa; Long, Justin; Wang, Kairuo; Sullivan, Patrick M.; Remolina Serrano, Javier et al. (2019): Microglia drive APOE-dependent neurodegeneration in a tauopathy mouse model. In: *The Journal of experimental medicine* 216 (11), S. 2546–2561. DOI: 10.1084/jem.20190980.

Shi, Yang; Yamada, Kaoru; Liddel, Shane Antony; Smith, Scott T.; Zhao, Lingzhi; Luo, Wenjie et al. (2017): ApoE4 markedly exacerbates tau-mediated neurodegeneration in a mouse model of tauopathy. In: *Nature* 549 (7673), S. 523–527. DOI: 10.1038/nature24016.

Sims, John R.; Zimmer, Jennifer A.; Evans, Cynthia D.; Lu, Ming; Ardayfio, Paul; Sparks, JonDavid et al. (2023): Donanemab in Early Symptomatic Alzheimer Disease: The TRAILBLAZER-ALZ 2 Randomized Clinical Trial. In: *JAMA* 330 (6), S. 512–527. DOI: 10.1001/jama.2023.13239.

- Singh, Rohit; Chandley, Pankaj; Rohatgi, Soma (2023): Recent Advances in the Development of Monoclonal Antibodies and Next-Generation Antibodies. In: *ImmunoHorizons* 7 (12), S. 886–897. DOI: 10.4049/immunohorizons.2300102.
- Sinha, S.; Anderson, J. P.; Barbour, R.; Basi, G. S.; Caccavello, R.; Davis, D. et al. (1999): Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. In: *Nature* 402 (6761), S. 537–540. DOI: 10.1038/990114.
- Sisodia, S. S. (1992): Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (13), S. 6075–6079. DOI: 10.1073/pnas.89.13.6075.
- Sisodia, S. S. (1999): Alzheimer's disease: perspectives for the new millennium. In: *The Journal of clinical investigation* 104 (9), S. 1169–1170. DOI: 10.1172/jci8508.
- Skillbäck, Tobias; Farahmand, Bahman Y.; Rosén, Christoffer; Mattsson, Niklas; Nägga, Katarina; Kilander, Lena et al. (2015): Cerebrospinal fluid tau and amyloid- β 1-42 in patients with dementia. In: *Brain : a journal of neurology* 138 (Pt 9), S. 2716–2731. DOI: 10.1093/brain/awv181.
- Smith, C.; Graham, D. I.; Murray, L. S.; Nicoll, J. A. R. (2003): Tau immunohistochemistry in acute brain injury. In: *Neuropathology and applied neurobiology* 29 (5), S. 496–502. DOI: 10.1046/j.1365-2990.2003.00488.x.
- Soba, Peter; Eggert, Simone; Wagner, Katja; Zentgraf, Hanswalter; Siehl, Katjuscha; Kreger, Sylvia et al. (2005): Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. In: *The EMBO journal* 24 (20), S. 3624–3634. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600824.
- Sparks, D. L.; Kuo, Y. M.; Roher, A.; Martin, T.; Lukas, R. J. (2000): Alterations of Alzheimer's disease in the cholesterol-fed rabbit, including vascular inflammation. Preliminary observations. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 903, S. 335–344. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06384.x.
- Spires, Tara L.; Meyer-Luehmann, Melanie; Stern, Edward A.; McLean, Pamela J.; Skoch, Jesse; Nguyen, Paul T. et al. (2005): Dendritic spine abnormalities in amyloid precursor protein transgenic mice demonstrated by gene transfer and intravital multiphoton microscopy. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25 (31), S. 7278–7287. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1879-05.2005.

Spires-Jones, Tara L.; Hyman, Bradley T. (2014): The intersection of amyloid beta and tau at synapses in Alzheimer's disease. In: *Neuron* 82 (4), S. 756–771. DOI: 10.1016/j.neuron.2014.05.004.

Stakos, Dimitrios A.; Stamatelopoulos, Kimon; Bampatsias, Dimitrios; Sachse, Marco; Zormpas, Eleftherios; Vlachogiannis, Nikolaos I. et al. (2020): The Alzheimer's Disease Amyloid-Beta Hypothesis in Cardiovascular Aging and Disease: JACC Focus Seminar. In: *Journal of the American College of Cardiology* 75 (8), S. 952–967. DOI: 10.1016/j.jacc.2019.12.033.

Statistisches Bundesamt (2023): Zahl der Woche Nr. 38 vom 19. September 2023. Statistisches Bundesamt. Online verfügbar unter https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/Zahl-der-Woche/2023/PD23_38_p002.html?utm_source=chatgpt.com, zuletzt geprüft am 16.12.2025.

Sterchi, E. E.; Green, J. R.; Lentze, M. J. (1982): Non-pancreatic hydrolysis of N-benzoyl-L-tyrosyl-p-aminobenzoic acid (PABA-peptide) in the human small intestine. In: *Clinical science (London, England : 1979)* 62 (5), S. 557–560. DOI: 10.1042/cs0620557.

Sterchi, Erwin E.; Stöcker, Walter; Bond, Judith S. (2008): Meprins, membrane-bound and secreted astacin metalloproteinases. In: *Molecular aspects of medicine* 29 (5), S. 309–328. DOI: 10.1016/j.mam.2008.08.002.

Stern, Y.; Albert, S.; Tang, M. X.; Tsai, W. Y. (1999): Rate of memory decline in AD is related to education and occupation: cognitive reserve? In: *Neurology* 53 (9), S. 1942–1947. DOI: 10.1212/wnl.53.9.1942.

Takeda, Kazuya; Araki, Wataru; Akiyama, Haruhiko; Tabira, Takeshi (2004): Amino-truncated amyloid beta-peptide (A β 5-40/42) produced from caspase-cleaved amyloid precursor protein is deposited in Alzheimer's disease brain. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18 (14), S. 1755–1757. DOI: 10.1096/fj.03-1070fje.

Tanzi, Rudolph E. (2012): The genetics of Alzheimer disease. In: *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2 (10). DOI: 10.1101/cshperspect.a006296.

Tarawneh, Rawan; D'Angelo, Gina; Crimmins, Dan; Herries, Elizabeth; Griest, Terry; Fagan, Anne M. et al. (2016): Diagnostic and Prognostic Utility of the Synaptic

Marker Neurogranin in Alzheimer Disease. In: *JAMA neurology* 73 (5), S. 561–571. DOI: 10.1001/jamaneurol.2016.0086.

Terry, R. D.; Masliah, E.; Salmon, D. P.; Butters, N.; DeTeresa, R.; Hill, R. et al. (1991): Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. In: *Annals of neurology* 30 (4), S. 572–580. DOI: 10.1002/ana.410300410.

Tian, Yue; Jing, Guangchan; Zhang, Mengren (2023): Insulin-degrading enzyme: Roles and pathways in ameliorating cognitive impairment associated with Alzheimer's disease and diabetes. In: *Ageing research reviews* 90, S. 101999. DOI: 10.1016/j.arr.2023.101999.

Traber, M. G.; van der Vliet, A.; Reznick, A. Z.; Cross, C. E. (2000): Tobacco-related diseases. Is there a role for antioxidant micronutrient supplementation? In: *Clinics in chest medicine* 21 (1), 173-87, x. DOI: 10.1016/s0272-5231(05)70016-2.

Tsoi, Kelvin Kf; Chan, Joyce Yc; Chan, Felix Ch; Hirai, Hoyee W.; Kwok, Timothy Cy; Wong, Samuel Ys (2019): Monotherapy Is Good Enough for Patients with Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease: A Network Meta-analysis of 76 Randomized Controlled Trials (1).

Ulku, Irem; Liebsch, Filip; Akerman, S. Can; Schulz, Jana F.; Kulic, Luka; Hock, Christoph et al. (2023): Mechanisms of amyloid- β 34 generation indicate a pivotal role for BACE1 in amyloid homeostasis. In: *Scientific reports* 13 (1), S. 2216. DOI: 10.1038/s41598-023-28846-z.

van Dyck, Christopher H.; Swanson, Chad J.; Aisen, Paul; Bateman, Randall J.; Chen, Christopher; Gee, Michelle et al. (2023): Lecanemab in Early Alzheimer's Disease. In: *The New England journal of medicine* 388 (1), S. 9–21. DOI: 10.1056/NEJMoa2212948.

van Praag, H.; Kempermann, G.; Gage, F. H. (1999): Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. In: *Nature neuroscience* 2 (3), S. 266–270. DOI: 10.1038/6368.

Vassar, R.; Bennett, B. D.; Babu-Khan, S.; Kahn, S.; Mendiaz, E. A.; Denis, P. et al. (1999): Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. In: *Science (New York, N.Y.)* 286 (5440), S. 735–741. DOI: 10.1126/science.286.5440.735.

- Vassar, Robert (2002): Beta-secretase (BACE) as a drug target for Alzheimer's disease. In: *Advanced drug delivery reviews* 54 (12), S. 1589–1602. DOI: 10.1016/s0169-409x(02)00157-6.
- Vazeille, Emilie; Bringer, Marie-Agnès; Gardarin, Aurélie; Chambon, Christophe; Becker-Pauly, Christoph; Pender, Sylvia L. F. et al. (2011): Role of meprins to protect ileal mucosa of Crohn's disease patients from colonization by adherent-invasive E. coli. In: *PloS one* 6 (6), e21199. DOI: 10.1371/journal.pone.0021199.
- Verghese, Joe; Lipton, Richard B.; Katz, Mindy J.; Hall, Charles B.; Derby, Carol A.; Kuslansky, Gail et al. (2003): Leisure activities and the risk of dementia in the elderly. In: *The New England journal of medicine* 348 (25), S. 2508–2516. DOI: 10.1056/NEJMoa022252.
- Villemagne, Victor L.; Burnham, Samantha; Bourgeat, Pierrick; Brown, Belinda; Ellis, Kathryn A.; Salvado, Olivier et al. (2013): Amyloid β deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: a prospective cohort study. In: *The Lancet. Neurology* 12 (4), S. 357–367. DOI: 10.1016/s1474-4422(13)70044-9.
- W. NEAL BURNETTE (1981): "Western Blotting": Electrophoretic Transfer of Proteins from Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gels to Unmodified Nitrocellulose and Radiographic Detection with Antibody and Radioiodinated Protein A. In: *Analytical biochemistry* (112), S. 195–203.
- Wasco, W.; Bupp, K.; Magendantz, M.; Gusella, J. F.; Tanzi, R. E.; Solomon, F. (1992): Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (22), S. 10758–10762. DOI: 10.1073/pnas.89.22.10758.
- Wasco, W.; Gurubhagavatula, S.; Paradis, M. D.; Romano, D. M.; Sisodia, S. S.; Hyman, B. T. et al. (1993): Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid beta protein precursor. In: *Nature genetics* 5 (1), S. 95–100. DOI: 10.1038/ng0993-95.
- Werny, Ludwig; Colmorgen, Cynthia; Becker-Pauly, Christoph (2022): Regulation of meprin metalloproteases in mucosal homeostasis. In: *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research* 1869 (1), S. 119158. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2021.119158.

- White, L.; Katzman, R.; Losonczy, K.; Salive, M.; Wallace, R.; Berkman, L. et al. (1994): Association of education with incidence of cognitive impairment in three established populations for epidemiologic studies of the elderly. In: *Journal of clinical epidemiology* 47 (4), S. 363–374. DOI: 10.1016/0895-4356(94)90157-0.
- Whitehouse, P. J.; Martino, A. M.; Wagster, M. V.; Price, D. L.; Mayeux, R.; Atack, J. R.; Kellar, K. J. (1988): Reductions in 3Hnicotinic acetylcholine binding in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: an autoradiographic study. In: *Neurology* 38 (5), S. 720–723. DOI: 10.1212/wnl.38.5.720.
- Wiltfang, Jens; Esselmann, Hermann; Bibl, Mirko; Hüll, Michael; Hampel, Harald; Kessler, Holger et al. (2007): Amyloid beta peptide ratio 42/40 but not A beta 42 correlates with phospho-Tau in patients with low- and high-CSF A beta 40 load. In: *Journal of neurochemistry* 101 (4), S. 1053–1059. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2006.04404.x.
- Wolfe, M. S.; Xia, W.; Moore, C. L.; Leatherwood, D. D.; Ostaszewski, B.; Rahmati, T. et al. (1999): Peptidomimetic probes and molecular modeling suggest that Alzheimer's gamma-secretase is an intramembrane-cleaving aspartyl protease. In: *Biochemistry* 38 (15), S. 4720–4727. DOI: 10.1021/bi982562p.
- Wu, Jessica W.; Hussaini, S. Abid; Bastille, Isle M.; Rodriguez, Gustavo A.; Mrejeru, Ana; Rilett, Kelly et al. (2016): Neuronal activity enhances tau propagation and tau pathology in vivo. In: *Nature neuroscience* 19 (8), S. 1085–1092. DOI: 10.1038/nn.4328.
- X Zhang 1, C Li, M Zhang (1999): Psychosocial risk factors of Alzheimer's disease. In: *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 1999 May (79), S. 335–338.
- Yamada, Kaoru; Holth, Jerrah K.; Liao, Fan; Stewart, Floy R.; Mahan, Thomas E.; Jiang, Hong et al. (2014): Neuronal activity regulates extracellular tau in vivo. In: *The Journal of experimental medicine* 211 (3), S. 387–393. DOI: 10.1084/jem.20131685.
- Yan, R.; Bienkowski, M. J.; Shuck, M. E.; Miao, H.; Tory, M. C.; Pauley, A. M. et al. (1999): Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. In: *Nature* 402 (6761), S. 533–537. DOI: 10.1038/990107.
- Yan, Riqiang; Vassar, Robert (2014): Targeting the β secretase BACE1 for Alzheimer's disease therapy. In: *The Lancet. Neurology* 13 (3), S. 319–329. DOI: 10.1016/S1474-4422(13)70276-X.

- Yau, Wai-Ying Wendy; Kirn, Dylan R.; Rabin, Jennifer S.; Properzi, Michael J.; Schultz, Aaron P.; Shirzadi, Zahra et al. (2025): Physical activity as a modifiable risk factor in preclinical Alzheimer's disease. In: *Nature medicine* 31 (12), S. 4075–4083. DOI: 10.1038/s41591-025-03955-6.
- Yi Wen^{1,+}, W. Haung Yu^{1,+}, Bryan Maloney², Jason Bailey², Junrong Ma², Isabelle Marié³, Thomas Maurin¹, Lili Wang¹, Helen Figueroa¹, Mathieu Herman¹, Pavan Krishnamurthy¹, Li Liu¹, Emmanuel Planel¹, Lit-Fui Lau⁴, Debomoy K. Lahiri², and Karen Duff^{1,*} (2008): Transcriptional regulation of β -secretase by p25,cdk5 leads to enhanced amyloidogenic processing. In: *Neuron* 57 (5), S. 680–690.
- Yu, Yi-Hao; Ginsberg, Henry N. (2005): Adipocyte signaling and lipid homeostasis: sequelae of insulin-resistant adipose tissue. In: *Circulation research* 96 (10), S. 1042–1052. DOI: 10.1161/01.RES.0000165803.47776.38.
- Yura, Renee E.; Bradley, S. Gaylen; Ramesh, Ganesan; Reeves, W. Brian; Bond, Judith S. (2009): Meprin A metalloproteases enhance renal damage and bladder inflammation after LPS challenge. In: *American journal of physiology. Renal physiology* 296 (1), F135-44. DOI: 10.1152/ajprenal.90524.2008.
- Zetterberg, Henrik; Bendlin, Barbara B. (2021): Biomarkers for Alzheimer's disease-preparing for a new era of disease-modifying therapies. In: *Molecular psychiatry* 26 (1), S. 296–308. DOI: 10.1038/s41380-020-0721-9.
- Zhang, Aiping; Uaesoontrachoon, Kitipong; Shaughnessy, Conner; Das, Jharna R.; Rayavarapu, Sree; Brown, Kristy J. et al. (2015): The use of urinary and kidney SILAM proteomics to monitor kidney response to high dose morpholino oligonucleotides in the mdx mouse. In: *Toxicology reports* 2, S. 838–849. DOI: 10.1016/j.toxrep.2015.05.008.
- Zhang, Huiqin; Jiang, Xuefan; Ma, Lina; Wei, Wei; Li, Zehui; Chang, Surui et al. (2022): Role of A β in Alzheimer's-related synaptic dysfunction. In: *Frontiers in cell and developmental biology* 10, S. 964075. DOI: 10.3389/fcell.2022.964075.
- Zhao, Guojun; Mao, Guozhang; Tan, Jianxin; Dong, Yunzhou; Cui, Mei-Zhen; Kim, Seong-Hun; Xu, Xuemin (2004): Identification of a new presenilin-dependent zeta-cleavage site within the transmembrane domain of amyloid precursor protein. In: *Journal of Biological Chemistry* 279 (49), S. 50647–50650. DOI: 10.1074/jbc.C400473200.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Lukas Donald Schmülling
Geb. am 24. September 1993
in Recklinghausen



Beruflicher Werdegang

01/02/2025 – jetzt	Facharztweiterbildung in der Abteilung Anästhesie und Intensivmedizin an der Universitätsklinik Augsburg
01/11/2023 – 31/10/25	Facharztweiterbildung in der Abteilung Anästhesie und Intensivmedizin im Diakoniekrankenhaus Bad Kreuznach
15/04/2019 bis jetzt	Promotionsarbeit am Institut für Pathobiochemie der Johannes-Gutenberg Universität Mainz
01/04/2017 – 30/06/2023	Angestellter als Gesundheits- und Krankenpfleger im Bereich Anästhesie und Intensivmedizin des Marienhaus Klinikums Mainz (MKM)
12/10/2016 – 15/07/2023	Studium der Humanmedizin an der Johannes- Gutenberg Universität Mainz

01/05/2016 - 30/11/2016	Angestellter als Gesundheits- und Krankenpfleger im Bereich Anästhesie und Intensivmedizin des St. Gertrauden-Krankenhauses, Berlin
01/05/2016 - 30/11/2016	Angestellter als Gesundheits- und Krankenpfleger im Bereich Anästhesie und Intensivmedizin des St. Gertrauden-Krankenhauses, Berlin

Praktika und Famulaturen

01/01/2023 – 21/04/2023	Praktisches Jahr (3.Tertial) im Fachbereich Innere Medizin
31/10/2022 – 31/12/2022	Praktisches Jahr (2.Tertial) im Fachbereich Chirurgie im Steve-Biko-Hospital der University of Pretoria, Südafrika
05/09/2022 – 30/10/2022	Praktisches Jahr (2.Tertial) im Fachbereich Chirurgie im Diakoniekrankenhaus Bad Kreuznach
16/05/2022 – 04/09/2022	Praktisches Jahr (1. Tertial) im Fachbereich Anästhesie und Intensivmedizin im Diakoniekrankenhaus Bad Kreuznach
11/10/2021 – 24/10/2022	Hospitation in Kinder- und Neugeborenen Intensivmedizin der Universitätsklinik Mainz
01/09/2021 – 30/09/2021	Famulatur im Bereich Radiologie der Universitätsklinik Mainz
01/03/2021 – 31.03.2021	Famulatur auf der kardiochirurgischen Intensivstation Im UKGM (Marburg; Fachbereich Anästhesie)
14/09/2020 – 16/10/2020	Famulatur im Bereich Anästhesiologie im Marienhaus Klinikum Mainz (MKM)

06/01/2019 – 22/03/2019

Medical Internship im Community Hospital

Kukruantumi, Ghana

Fortbildungen

03/12/2025 – 06/12/2025

Kongress der DIVI 2025

Workshop dilatative Punktionstracheotomie

Workshop Echokardiographie

30/06/2025 – 02/07/2025

NaSim 25, Mainz

08/02/2025 – 15/02/2025

Kompaktkurs Notfallmedizin, Westerland

18/01/2025

Heidelberger ECMO Symposium

04/12/2024 – 06/12/2024

Kongress der DIVI 2024

Workshop extrakorporale Unterstützung – Lunge

Workshop VA-ECMO nach Reanimation und kardialer

Dekompensation

02/11/2024 – 03/11/2024

DEGUM Grundkurs 2

Sonographie für die Diagnostik in Akutsituationen

07/06/2024 – 08/06/2024

BAINS Bodensee Symposium

Workshop invasive Notfalltechniken

02/03/2024 – 03/03/2024

DEGUM Grundkurs 1

Ultraschallgestützte periphere Nervenblockaden und

Gefäßzugänge

10/2022

ERC – Instructor Zertifikat für Basic Life Support

(BLS)

05/2022

ERC – Provider Zertifikat für Advanced Life Support

(ALS)

Zusatzbezeichnungen und Zertifikate-----

15/12/2025	Zusatzbezeichnung Notfallmedizin
27/10/2025	Zertifikat zur Anästhesie-Fokussierten Sonographie (AFS) der Deutschen Gesellschaft für Anästhesie (DGAI)

Engagement

01/11/2023 – jetzt	Dozent für die Fachweiterbildung Kinderintensivpflege für die Themen „kindliche Anatomie und Physiologie“ und „Monitoringverfahren in der Anästhesie“
04/2021 – 11/22	Tutor im Skills-Lab der Universitätsklinik Mainz für den Kurs „Grundlagen der maschinellen Beatmung“
11/2019 – 06/2022	1. Vorsitzender des gemeinnützigen Vereins Zur Förderung der medizinischen Lehre Rheinland Pfalz (FMR)
16/01/2020 – 15/12/2021	gewähltes Mitglied der Tenure Kommission an der Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
Sommersemester 2017 - 2021	aktives Mitglied des Fachschaftsrates Medizin an der Johannes-Gutenberg- Universität, Mainz
04/2014 – 10/2016	Jugendredakteur beim Magazin Heilberufe des Springer-Nature-Verlages

Sprachkenntnisse

Sprachkenntnisse:	Deutsch (Muttersprache)
	Englisch (fließend)

