

**Charakterisierung von Antikörpern gegen das
Pyroglutamat-3-Amyloid-beta Peptid ($A\beta_{pE3}$ -Peptid) als
Voraussetzung für eine potentielle Anwendung in der
Alzheimer Immuntherapie**

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (*Dr. rer. nat.*)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –
der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Anke Piechotta
geb. am 09.04.1985 in Burg

Gutachter: 1. Prof. Dr. M. T. Stubbs
2. Prof. Dr. H.-U. Demuth
3. Prof. Dr. S. Knapp

Tag der öffentlichen Verteidigung: 20.06.2017

„Die größte Sehenswürdigkeit, die es gibt, ist die Welt
- sieh sie dir an.“

Kurt Tucholsky (1890-1935)

Summary

Alzheimer disease (AD) now affects more than 30 million people worldwide and is therefore one of the most dreaded consequences of aging. During the course of the disease, drastic neuron degeneration takes place, resulting in the typical dementia symptoms of decrease of reactivity and compliance, memory loss and finally loss of self-determination and death. AD is characterized histopathologically by extracellular deposition of the amyloid beta ($A\beta$) peptide and the intracellular aggregation of the tau protein in the brain. At present, there is no cure for AD, and the number of patients is increasing every year. Passive immunization with $A\beta$ specific antibodies has resulted in initial successes in the treatment of patients with mild AD and is thus an attractive area for the development of novel therapeutics.

The search for a specific antibody target therefore represents a major focus in research. Although it is unclear what features of $A\beta$ (monomers, oligomers, fibrils, plaque and/or modifications) result in toxicity and initiate aggregation of the tau protein, a wide variety of different $A\beta$ variants have been identified in brains of AD patients that could be potential triggers for the development of AD. One of these is the pyroglutamate-3- $A\beta$ peptide ($A\beta_{pE3}$) which has been shown to be more toxic than unmodified $A\beta$. As $A\beta_{pE3}$ has only been detected in parenchymal brain tissue, development of $A\beta_{pE3}$ -specific antibodies represents a promising approach for developing AD immunotherapy with reduced adverse effects.

The murine $A\beta_{pE3}$ -specific antibodies (c#6, c#17 and c#24) characterized in this work provide a starting point for the generation of such therapeutic antibodies. The antibodies were produced from hybridoma cell lines and subsequently purified from the cell culture supernatant. Antibody genotyping revealed different amino acid sequences for all three candidates in the variable domain. All three antibodies show high affinity (K_D values between 2 and 6 nM) towards the $A\beta_{pE3}$ peptide and inhibit fibrillation of the $A\beta_{pE3}$ peptide under *in vitro* conditions.

Structural characterization of the $F_{ab}/A\beta_{pE3}$ complexes using X-ray crystallography revealed new binding modes compared to $A\beta$ specific antibody structures described in the literature. Two of the three murine antibodies (c#6 and c#24) form a V-formed binding pocket ($A\beta_{pE3}$ -binding modus I) where the $A\beta_{pE3}$ peptide is buried deep in the interface between the light and heavy chains, promoting high selectivity for the $A\beta_{pE3}$ peptide. The remaining antibody (c#17) binds the peptide in a more conventional surface exposed extended conformation ($A\beta_{pE3}$ -binding modus II). The binding pocket of c#6 ($A\beta_{pE3}$ -binding modus I) in the absence of ligand is more flexible than that of c#17 ($A\beta_{pE3}$ -binding modus II). These structural data for $A\beta_{pE3}$ specific antibodies are a prerequisite for the future generation of humanized therapeutic antibodies.

In addition, a novel structural feature of the A β _{pE3} N-terminus was observed independent of binding modus. A parallel orientation of the pyroglutamate pE3 and the F4 sidechain confers a pronounced bulky hydrophobic nature to the N-terminal region of the A β _{pE3} peptide. This unusual structural feature of A β _{pE3} might explain its enhanced aggregation properties and its resistance to proteolytic degradation in comparison to the unmodified A β peptide. The deep burial of this hydrophobic N-terminus in antibodies *c#6* and *c#24* (A β _{pE3}-binding modus I) suggest that these might represent favored scaffolds for immunotherapeutics.

Zusammenfassung

Die Alzheimer Erkrankung (*alzheimer disease*, AD) beeinträchtigt mittlerweile mehr als 30 Millionen Menschen weltweit und gehört daher zu einer der gefürchtetsten Konsequenzen des Alters. Im Zuge dieser Erkrankung kommt es zu einer drastischem Neuronendegeneration, welche zu typischen Demenzercheinungen, wie verringerte Reaktions- und Lernfähigkeit, Gedächtnisverlust bis hin zu Verlust der Selbstbestimmung und Tod führt. Histopathologisch ist sie charakterisiert durch die extrazelluläre Ablagerung des Amyloid-beta Peptids ($A\beta$) und die intrazelluläre Aggregation des Tau-Proteins im Gehirn. Momentan gibt es keine Heilung für dies Erkrankung und die Anzahl der Patienten nimmt jedes Jahr weiter zu, sodass die Entwicklung von Therapeutika von großer Wichtigkeit ist. Passive Immunisierung mit der Verwendung von Antikörpern gegen das $A\beta$ -Peptid führte jedoch zu ersten Behandlungserfolgen, sodass diese Vorgehensweise als vielversprechende Entwicklung von neuen Therapeutika angesehen wird.

Die Auffindung eines spezifischen Antikörper-*targets* stellt daher einen bedeutenden Forschungsschwerpunkt dar. Obwohl es noch ungeklärt ist, welche Eigenschaften von $A\beta$ (Monomere, Oligomere, Fibrillen, *plaques* oder modifizierte $A\beta$ -Varianten) eine Toxizität hervorruft und die Aggregation des Tau-Proteins initiiert, wurde eine Vielzahl von verschiedenen $A\beta$ -Varianten in Gehirnen von AD-Patienten identifiziert, die potentielle Auslöser für die Entstehung von AD darstellen. Zu einer der modifizierten $A\beta$ -Varianten gehört das Pyroglutamat-3- $A\beta$ Peptid ($A\beta_{pE3}$), welches toxischere Eigenschaften im Vergleich zum nicht-modifiziertem $A\beta$ -Peptid besitzt. Es konnte bisher nur in parenchymalem Gewebe des Hirns detektiert werden, was eine Immuntherapie ohne Nebenwirkungen begünstigt. Somit ist die Entwicklung von therapeutischen $A\beta_{pE3}$ -spezifischen Antikörpern ein neuer Ansatz zur Behandlung der Alzheimer Erkrankung.

Die in dieser Arbeit charakterisierten murinen $A\beta_{pE3}$ -spezifischen Antikörper (c#6, c#17 and c#24) stellen einen vielversprechenden Ausgangspunkt für die Generierung von therapeutischen Antikörpern dar. Sie wurden über die Kultivierung von Hybridomazellen und anschließender Reinigung aus dem Zellkulturüberstand gewonnen. Mittels Genotypisierungs-Experimente wurde festgestellt, dass alle drei Antikörper unterschiedliche Aminosäuresequenzen der variablen Domänen aufweisen. Zudem zeigen sie eine hohe Affinität gegenüber dem $A\beta_{pE3}$ -Peptid (K_D -Wert von etwa 2 - 6 nM) und inhibieren die Aggregation der $A\beta_{pE3}$ -Peptide unter *in-vitro*-Bedingungen.

Anhand der strukturellen Charakterisierung der $F_{ab}/A\beta_{pE3}$ -Komplexe mittels Röntgenkristallographie konnte gezeigt werden, dass diese $A\beta_{pE3}$ -spezifischen AK andere Bindungsmodi aufweisen als die bisher veröffentlichten Antikörper, die gegen das nicht-modifizierte $A\beta$ Peptid gerichtet sind. Dabei wurde bei zwei von drei Antikörpern (c#6 und c#24) eine V-förmigen Bindetasche ($A\beta_{pE3}$ -Bindungsmodus I), die den N-Terminus des $A\beta_{pE3}$ -Peptids

im *interface* der leichten und schweren Kette einhüllt, nachgewiesen und dadurch eine erhöhte Spezifität gegenüber dem $A\beta_{pE3}$ -Peptid begünstigt. Der verbleibende Antikörper (c#17) bindet das Peptid hingegen in einer mehr oberflächenexponierteren, ausgedehnten Konformation. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindetasche von c#6 ($A\beta_{pE3}$ -Bindungsmodus I) in ungebundener Form flexibler ist als die Bindetasche des Antikörpers c#17 ($A\beta_{pE3}$ -Bindungsmodus II). Darüber hinaus eignen sich die strukturellen Daten der $A\beta_{pE3}$ -spezifischen AK als Vorstufe für die zukünftigen Generierung von humanisierten therapeutischen AK.

Als ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit konnte zudem eine strukturelle Besonderheit des $A\beta_{pE3}$ -N-Terminus unabhängig vom Bindungsmodus beobachtet werden. Durch die parallele Orientierung des Pyroglutamats zur Seitenkette des folgenden Phenylalanins wird ein außergewöhnliches sperriges hydrophobes Strukturelement ausgebildet. Diese strukturelle Eigenart des $A\beta_{pE3}$ -Peptids könnte der Grund für die schnellere Aggregation bzw. die gesteigerte Resistenz gegenüber proteolytischem Abbau im Vergleich zum nichtmodifizierten $A\beta$ -Peptid sein. Die tiefe Einbuchtung des Antikörper c#6 und c#24 ($A\beta_{pE3}$ -Bindungsmodus I) für die Bindung dieses hydrophoben $A\beta_{pE3}$ -N-terminus könnte ein bevorzugtes Gerüst für die Entwicklung von Immuntherapeutika räpresentieren.

Inhaltsverzeichnis

Summary	IV
Zusammenfassung	VI
Inhaltsverzeichnis	VIII
Abbildungsverzeichnis	XIII
Tabellenverzeichnis	XVI
1 Einleitung.....	1
1.0 Alzheimer Erkrankung	1
1.1 Potentielle Rolle des Amyloid-beta (A β)-Peptides in AD	1
1.2 Das Pyroglutamat-3-A β Peptid (A β_{pE3}).....	6
1.2.1 Präsenz und Toxizität des A β_{pE3}	6
1.2.2 Generierung und Eigenschaften des A β_{pE3}	8
1.2.3 A β_{pE3} - Vorkommen	11
1.3 Passive Immuntherapie in AD	12
1.4 Allgemeiner Antikörperaufbau und Generierung eines F _{ab} -Fragments	16
1.5 Publierte F _{ab} /A β -Strukturen	18
1.6 A β_{pE3} -spezifische Antikörper	21
1.7 Zielstellung der Arbeit.....	22
2 Material und Methoden	24
2.1 Chemikalien- und Materialverzeichnis	24
2.1.1 Chemikalien	24
2.1.2 Kits.....	24
2.1.3 Standards.....	25
2.1.4 Peptide.....	25
2.1.5 Enzyme und dafür benötigte Lösungen	26
2.1.6 <i>E. coli</i> -Stämme und Zellen	26

2.1.7 Plasmide	26
2.1.8 Oligonukleotide	26
2.1.8.1 Oligo (dT)-Primer für die cDNA-Synthese	26
2.1.8.2. Primer für die Amplifikation der Antikörperketten-DNA-Sequenz.....	26
2.1.8.3. pJet1.2-Sequenzierungsprimer	27
2.1.9 Medien und Zusätze für die Zellkultur.....	27
2.1.10 Kommerziell-erhältliche Puffer.....	28
2.1.11 Lösungen und Puffer	28
2.1.11.1 <i>dot blot</i>	28
2.1.11.2 modifizierte Puffer bei der Oberflächenplasmonresonanz-Methode .	29
2.1.11.3 ThT-Fluoreszenz-Assay	29
2.1.11.4 Transmissions-Elektronenmikroskopie.....	29
2.1.12 Geräte und Zubehör	30
2.1.13 Software.....	31
2.2 Methoden	32
2.2.1 Zellbiologische Methoden.....	32
2.2.1.1 Ermittlung der Zellzahl	32
2.2.1.2 Kultivierung von Hybridomazellen	32
2.2.1.3 Expression von A β _{PE3} -spezifischen Antikörpergenen	33
2.2.1.4 Adaption von AK-produzierenden Hybridomazellen an serumfreies Medium.....	33
2.2.2 Molekularbiologische Methoden	34
2.2.2.1 RNA-Isolation und cDNA-Synthese der murinen Antikörper.....	34
2.2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifikation der Nukleotidsequenz der murinen leichten und schweren Antikörperkette von c#17 und c#24.....	34
2.2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese	35
2.2.2.4 Gelelution	35
2.2.2.5 Ligation der amplifizierten DNA-Fragmente in den pJET1.2-Vektor ...	35
2.2.2.6 Chemotransformation	35
2.2.2.7 Kolonie-PCR.....	36
2.2.2.8 Isolierung von Plasmid-DNA und DNA-Konzentrationsbestimmung ...	36
2.2.2.9 DNA-Sequenzierung.....	36
2.2.2.10 Analyse der IgG-Unterklasse und der Genfamilie.....	36
2.2.3 Proteinbiochemische Methoden	37

2.2.3.1	Reinigung der monoklonalen Antikörper aus Überständen von Hybridomazellkulturen	37
2.2.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels UV/VIS-Spektroskopie	37
2.2.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	38
2.2.3.4	<i>dot blot</i>	39
2.2.3.5	Verdau des murinen Antikörpers zum F _{ab} -Fragment	40
2.2.3.6	Reinigung des F _{ab} -Fragmentes mittels Affinitätschromatographie an Protein G	40
2.2.3.7	Reinigung des F _{ab} -Fragments durch Gelfiltration.....	41
2.2.3.8	AK-Deglykosylierungsversuche mit PNGase F	41
2.2.4	Interaktionsstudien	41
2.2.4.1	Aktivitätsnachweis der AK-enhaltenen Fraktionen nach Protein-G Affinitätschromatographie (2.2.3.1) mittels Oberflächenplasmonresonanz (OPR) durch Verwendung eines A β _{pE3-40} gekoppelten OPR-Chip.....	41
2.2.4.2	Ermittlung der Antikörperaffinität zu verschiedenen A β -Peptidvarianten mittels OPR	42
2.2.4.3	Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)	44
2.2.5	Proteinkristallisation und Strukturlösung.....	47
2.2.5.1	Präparation der F _{ab} -Kristallisationsansätze	47
2.2.5.2	Proteinkristallisation	48
2.2.5.3	Datensammlung und Röntgenstrukturanalyse.....	50
2.2.5.4	Manuell Strukturanpassung und Strukturverfeinerung.....	52
2.2.5.5	Berechnung der Oberflächenkomplementarität (<i>sc</i>) und der Antikörper/Ligand-Kontaktfläche (<i>A_{AL}</i>).....	54
2.2.6	Funktioneller Antikörper-Test	55
2.2.6.1	Thioflavin T (ThT)-Fluoreszenz-Assay	55
2.2.6.2	Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM).....	56
3	Ergebnisse.....	57
3.1	Herstellung von drei Pyroglutamat-Amyloid-beta-(A β _{pE3})-spezifische Antikörpern <i>c#6</i> , <i>c#17</i> und <i>c#24</i> und deren F _{ab} -Fragmente	57
3.1.1	Aufreinigung des A β _{pE3} -spezifischen <i>c#17</i> aus Zellkulturüberständen von Hybridomazellen und Deglykosylierung mittels PNGase F	57
3.1.2	Herstellung der F _{ab} -Fragmente.....	60

3.1.3 Sequenzvergleich drei A β _{pE3} - spezifischer Antikörper.....	64
3.2 Interaktionsstudien und Spezifitätsanalysen der A β _{pE3} -spezifischen Antikörpern	65
3.2.1 Die Antikörper weisen unterschiedliche Assoziations- (k_{on}) bzw. Dissoziationsraten (k_{off}) in den OPR-Analysen auf.....	65
3.2.2 Spezifität der drei verschiedenen Antikörper	68
3.2.3 Affinitätsbestimmung der Antikörper F _{ab} -Fragmente c#6, c#24 und c#17 zum A β _{pE3-18} mittels ITC.....	71
3.3 Analyse der dreidimensionalen Struktur der F _{ab} /A β _{pE3} -Komplexe aller drei Antikörper.....	73
3.3.1 Kristallisation und Datensammlung	77
3.3.2 Struktur der Bindetasche des Antikörper c#6 in Komplex mit A β _{pE3-12Pbio}	75
3.3.3 Beobachtung einer strukturellen Verwandtschaft der F _{ab} -Fragmente von Antikörper c#6 und c#24	78
3.3.4 Rolle der putativen ionischen Wechselwirkung des K35 der LC zum D7 des A β _{pE3} -Peptids in der F _{ab} c#24-Bindetasche	85
3.3.5 Antikörper c#17 besitzt einen anderen Bindungsmodus als Antikörper c#6 bzw. c#24	82
3.3.6 Vergleichende Analyse der Antikörperbindetaschen mit Berücksichtigung der Peptid/Antikörper-Kontaktfläche	86
3.3.7 Untersuchung der Antikörper-Bindetaschenflexibilität in Abhängigkeit des Bindungsmodus	87
3.3.8 Das A β _{pE3} -Peptid bildet in allen drei Bindetaschen einen strukturell ähnlichen N-Terminus aus: die parallele pE3-F4 Kopfgruppe.....	92
3.4 Funktioneller Antikörper-Test (<i>in vitro</i>).....	93
3.4.1 Die Bildung der A β _{pE3-42} -Fibrillen wird konzentrationsabhängig durch die Zugabe von A β _{pE3} -spezifischen Antikörpern inhibiert.....	93
3.4.2 Analyse der A β -Fibrillenbildung mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie nach Zugabe der A β _{pE3} -spezifischen Antikörper	94
4 Diskussion.....	96
4.1 Reinigung der sezernierten A β _{pE3} -spezifische AK und anschließende enzymatische Spaltung mittels Papain führte zur Generierung von homogenen F _{ab} -Proteinproben	96
4.2 Affinität versus Spezifität der A β _{pE3} -spezifischen AK.....	98
4.3 Mögliche Ursachen des veränderten A β _{pE3} -Dissoziationsverhalten von AK c#24	100

4.4 Entdeckung eines neuen A β -Bindungsmodus	102
4.5 AK c#6 zeigt eine Antigen-abhängige Flexibilität der CDR- <i>loops</i>	104
4.6 Strukturen des A β -N-Terminus	105
4.7 Verwendung der Antikörperbindungs- und Strukturdaten für die Entwicklung von Therapeutika.....	110
4.8 Struktur versus Funktion: Bapineuzumab, mE8 und Aducanumab als Vorgängerbeispiel.....	111
4.9 Ausblick.....	114
5 Literaturverzeichnis	115
6 Anhang.....	131
6.1 Abkürzungsverzeichnis.....	131
6.2 Anhang zum Methodenteil	134
6.3 Anhang zum Ergebnisteil.....	136
6.4 Publikationsliste.....	151
Danksagung.....	152
Erklärung.....	154
Lebenslauf.....	155

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Prozessierung des A β -precursor-Proteins (APP)	2
Abb. 1.2: Schema der Hypothese der amyloiden Kaskade.....	4
Abb. 1.3: Schematischer Vergleich von pE-A β mit den Volllängen-A β -Peptiden	8
Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Generierung von A β _{pE3-x} und dessen Eigenschaften.....	9
Abb. 1.5: Darstellung möglicher Strategien zur Behandlung von AD durch Entfernung der A β -Ablagerungen bzw. der löslichen A β -Formen im Gehirn durch passive Immunisierung.....	14
Abb. 1.6: Schema der IgG1-Antikörperspaltung und Generierung eines F _{ab} -Fragments durch Zugabe der Cysteinprotease Papain.....	16
Abb. 1.7: Darstellung der N-terminalen A β -Bindung in der Antigenbindetasche verschiedener F _{ab} -Strukturen.....	19
Abb. 2.1: Schema zur Ermittlung der Gleichung für die Berechnung der Assoziations- konstante	44
Abb. 2.2: Aufbau des A β _{pE3-12} -Pbio.....	48
Abb. 2.3: Proteinlöslichkeitsdiagramm	49
Abb. 2.4: Vergleich von Realem Raum versus Reziprokem Raum.....	50
Abb. 2.5: Definition der <i>accessible surface area</i> (ASA)	54
Abb. 2.6: Struktur von Thioflavin T.....	55
Abb. 3.1: Beschreibung der Reinigung des Antikörpers c#17 mittels Affinitäts- chromatographie an Protein-G und SDS-gelelektrophoretische Analyse der Deglykosylierungsversuche des AK c#17 mit PNGase F.....	58
Abb. 3.2: SDS-PAGE zur Analyse der Antikörperspaltung durch die Cysteinprotease Papain	61
Abb. 3.3: Chromatographische Darstellung der Abtrennung des F _{ab} -Fragments c#6 vom 2xF _c -Fragment mittels Affinitätschromatographie an Protein G und SDS-PAGE ...	63
Abb. 3.4: Vergleich der Aminosäuresequenzen der variablen Regionen der leichten und schweren Kette der A β _{pE3} -spezifischen AK c#6, c#24 und c#17	64
Abb. 3.5: Sensogramme zur K _D -Wertbestimmung der A β _{pE3} -spezifischen AK zum A β _{pE3-18} - Peptid mittels OPR-Messung.....	66
Abb. 3.6: Sensogramme zur Analyse der AK-Spezifität mittels der Verwendung von verschiedenen A β _{x-18} -Peptiden.....	70
Abb. 3.7: Darstellung der ITC-Daten der Antikörper bzw. F _{ab} -Fragmente c#6, c#24 und c#17 mit dem A β _{pE3-18} (A-C) bzw. mit dem A β _{E3-18} (D-F)	71

Abb. 3.8: Mikroskopische Aufnahmen der Kristallreifung der $F_{ab}/A\beta_{pE3}$ -Komplexe.....	74
Abb. 3.9: Darstellung der Struktur des F_{ab} -Fragments c#6 im Komplex mit $A\beta_{pE3-12Pbio}$	76
Abb. 3.10: Darstellung der Struktur des F_{ab} -Fragments c#24 im Komplex mit $A\beta_{pE3-18}$	79
Abb. 3.11: Sensogramme zur Analyse der $A\beta_{pE3-18}$ -Mutante D7A	81
Abb. 3.12: Darstellung der Struktur des F_{ab} -Fragments c#17 im Komplex mit $A\beta_{pE3-12Pbio}$	83
Abb. 3.13: Darstellung der Strukturüberlagerung (<i>superposition</i>) der Hauptkette verschiedener Antikörper- F_{ab} -Fragmente	85
Abb. 3.14: Darstellung der Bindetaschen der Antikörper F_{ab} -Fragmente mit und ohne $A\beta$ -Ligand	89
Abb. 3.15: Darstellung der ($2F_oF_c$)-Elektronendichte des F_{ab} c#6 ohne Ligand vergleichend zum F_{ab} c#6/ $A\beta_{pE3-12}$ -Komplex	90
Abb. 3.16: Darstellung des B-Faktors der CDRs des F_{ab} c#17 und F_{ab} c#6 in ungebundener und gebundener Form	91
Abb. 3.17: Darstellung der Struktur des $A\beta_{pE3-18}$ -Peptids in den Bindetaschen der Antikörper F_{ab} -Fragmente.....	92
Abb. 3.18: Darstellung der Analyse zur Inhibierung der $A\beta_{pE3-42}$ -Fibrillenbildung durch die Zugabe von verschiedenen Konzentrationen der $A\beta_{pE3}$ -spezifischen Antikörper	93
Abb. 3.19: Transmissions-Elektronenmikroskopische Aufnahmen der $A\beta_{pE3-42}$ -Fibrillen (bzw. $A\beta_{1-42}$ -Fibrillen) unter Zugabe von $A\beta_{pE3}$ -spezifischen Antikörpern.....	95
Abb. 4.1: Darstellung der Papain-katalysierten Antikörperspaltung verschiedener IgG-Spezies	97
Abb. 4.2: Darstellung der putative ionische WW zwischen $A\beta$ -D7 und K35 der LC des c#24	100
Abb. 4.3: Vergleich der Bindetaschen des AK c#6 und Bapineuzumab	103
Abb. 4.4: Darstellung der Einlagerung des $A\beta_{pE3}$ -N-Terminus in die V-förmige Kavität des AK c#6	104
Abb. 4.5: Darstellung der Überlagerung verschiedener N-terminalen Strukturen des $A\beta$ - Peptids und Vergleich zu publizierten N-Termini von nichtverwandten Proteinen	107
Abb. 4.6: Vergleichende Darstellung der N-terminalen $A\beta$ -Bindung des $A\beta$ - Bindungsmodus 1 und 4	113
Abb. 6.1: Beschreibung der Reinigung der Antikörper c#17 und c#24 mittels Affinitätschromatographie an Protein G und SDS-PAGE	136
Abb. 6.2: Analyse der pE3- $A\beta$ -spezifischen AK mittels nichtreduzierender SDS-PAGE	137
Abb. 6.3: Massenspektrometrische Analyse des Fd-Fragments von Antikörper c#6.....	137

Abb. 6.4: Beschreibung der Reinigung des F _{ab} -Fragments c#24 vom 2xF _c -Fragment mittels Affinitätschromatographie an Protein G und SDS-PAGE	138
Abb. 6.5: Chromatographische Darstellung der Abtrennung des F _{ab} -Fragments c#17 vom 2xF _c -Fragment mittels Affinitätschromatographie an Protein G und SDS-PAGE	139
Abb. 6.6 Vergleich der Bindungseigenschaften der F _{ab} - und 2xF _c -Fragmente an die Protein-G-Matrix mittels SDS-PAGE	139
Abb. 6.7 Darstellung der ITC-Daten des AK c#6 mit dem A β ₃₋₁₈ -Peptid bei 30 °C	142
Abb. 6.8 Bindestasche des Antikörper F _{ab} -Fragments c#17 mit und ohne A β -Ligand	150
Abb. 6.9: TEM-Analyse der A β _{pE3-42} -Fibrillen (10 μ M) unter Zugabe von 4 μ M A β _{pE3} - spezifischen AK	150

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1: Prozentualer Anteil des $A\beta_{pE3-x}$ -Peptids zum Gesamt- $A\beta$ in Gehirnen von AD-Patienten in Abhängigkeit der verwendeten Methode	7
Tab. 1.2: Passive immunotherapeutische Studien am AD-Patienten	15
Tab. 1.3: Bisher veröffentlichte $F_{ab}/A\beta$ -Strukturen.....	20
Tab. 2.1: Chemikalien	24
Tab. 2.2: Primerbibliothek zur Amplifikation der Antikörperketten-DNA-Sequenz	27
Tab. 2.3: Geräte und Zubehör	30
Tab. 2.4: PCR-Programm zur DNA Amplifikation.....	34
Tab. 2.5: Molekulargewicht und Extinktionskoeffizienten der verwendeten Proteine/ Peptide.....	38
Tab. 2.6: Zusammensetzung der 12% Polyacrylamidgele	39
Tab. 2.7: Überblick über die durchgeführten Kristallisationen und deren AK/ $A\beta$ - Verhältnis	47
Tab. 3.1: K_D -Werte zwischen $A\beta_{pE3-18}$ -spezifischen AK und $A\beta_{pE3-18}$ -Peptid berechnet mittels k_{on} und k_{off} -Werten der OPR-Messung	67
Tab. 3.2: Untersuchung der AK-Spezifität von c#6, c#24 und c#17 gegenüber dem $A\beta_{pE3}$ - Peptid mittels der Verwendung von sequenzabweichenden $A\beta_{x-18}$ -Peptiden in der OPR-Methode.....	68
Tab. 3.3: Darstellung der ermittelten ITC-Parameter der Bindung zwischen dem F_{ab} - Fragment c#6, c#24 oder c#17 mit dem $A\beta_{pE3-18}$ -Peptid bei einer Reaktions- temperatur von 293,15 K	72
Tab. 3.4: Überblick der in dieser Arbeit durchgeführten Kristallisationsansätze	73
Tab. 3.5: Proteinstrukturparameter nach Kristallisation der $F_{ab}/A\beta_{pE3}$ -Komplexe	74
Tab. 3.6: Sequenzidentität der LC und des Fd-Fragments zwischen den $A\beta_{pE3}$ -spezifischen AK und dem verwendetem Suchmodell.....	75
Tab. 3.7: Kinetische-und Bindungsparameter der Analyse der Antikörper mit der $A\beta_{pE3-18}$ - Mutante D7A.....	81
Tab. 3.8: RMSD-Werte aus der <i>superposition</i> der gesamten F_{ab} -Fragmente bzw. einzelner Domänen des F_{ab} c#24 (Komplex), F_{ab} c#17 (Komplex) und F_{ab} c#6 ohne Peptid zum F_{ab} c#6 (Komplex).....	84
Tab. 3.9: Aminosäurereste der AK-Bindetasche, die in der Ausbildung nichtkovalenter Bindungen beteiligt sind.....	86
Tab. 3.10: Oberflächenkomplementarität sc und der Antikörper/Liganden Kontaktfläche A_{AL} (in \AA^2) zwischen dem F_{ab} -Fragment (LH) und dem $A\beta_{pE3}$ -Liganden	87

Tab. 4.1: Bekannte Antikörper/Liganden-Kontaktflächen von F _{ab} /Aβ-Komplexen	102
Tab. 4.2: Ausgewählte NMR-Strukturen des Aβ _{1-40/42} -Peptids	106
Tab. 4.3: Beispielhafte Auswahl von bekannten Strukturen pE-modifizierter Proteine	108
Tab. 6.1: Ermittlung des Mittelwertes der relative RU-Werte der Plateauphase aus zweifacher OPR-Messung.....	145
Tab. 6.2: OPR-Messung des gebundenen AK c#6 mit Zugabe verschiedener Konzentrationen des Aβ ₃₋₁₈ -Peptids unter abweichenden Bedingungen	146
Tab. 6.3: Proteinstrukturdaten nach Kristallisation aller gelösten F _{ab} -Strukturen/F _{ab} - Komplexe	152
Tab. 6.4: Mögliche nichtkovalente Interaktionen zwischen dem F _{ab} C#6 und Aβ _{pE3-12Pbio}	153
Tab. 6.5: Mögliche nichtkovalente Interaktionen zwischen dem F _{ab} C#24 und Aβ _{pE3-18}	154
Tab. 6.6: Mögliche nichtkovalente Interaktionen zwischen dem F _{ab} C#17 und Aβ _{pE3-12Pbio} ...	155

1 Einleitung

1.0 Alzheimer Erkrankung

Die Alzheimer Erkrankung (*alzheimer disease*, AD) ist eine progressive neurodegenerative Funktionsstörung, die das Leben von mehr als 30 Millionen Menschen weltweit beeinträchtigt. Statistisch gehören 60 % - 80 % aller Demenzerkrankungen der Alzheimerschen Erkrankung an (Alzheimer's Association, 2014). Das häufigste Initialsymptom dieser Erkrankung ist der schrittweise Fähigkeitsverlust, sich an kürzlich erlangte Informationen wieder zu erinnern. Die primäre Ursache liegt in dem allmählichen Abbau und der Dysfunktion von Neuronen in den Gehirnregionen, welche für die Ausbildung des Gedächtnisses, wie das limbische System, verantwortlich sind. Aufgrund der Tatsache, dass diverse Biomarker der AD noch vor Ausbruch der ersten Symptome nachweisbar sind, wurden die Kriterien der AD-Diagnose 2011 neu verfasst (Albert *et al.*, 2011; Jack *et al.*, 2011; McKhann *et al.*, 2011; Sperling *et al.*, 2011). Nach diesen Kriterien wurden drei verschiedene Stadien dieser Krankheit definiert, die präklinische AD, die milde kognitive Beeinträchtigung (*mild cognitive impairment*, MCI) und die Alzheimerschen Demenz. Statistisch erkrankt 1/10 der Bevölkerung ab einem Alter von 65 (Sperling *et al.*, 2011) und jeder Dritte ab einem Alter von 85 Jahren (Hebert *et al.*, 2013), so dass diese Erkrankung eine der gefürchtetsten Konsequenzen des Alterns bleibt. Desweiteren wird das Durchschnittsalter der Bevölkerung aufgrund medizinischer Technologie und verbesserter Lebensbedingungen in den nächsten Jahrzehnten weiter ansteigen, sodass die Anzahl von AD-Patienten ebenfalls zunehmen wird. Aus diesem Grund ist sowohl die mechanistische Aufklärung der AD-Entstehung als auch die Entwicklung von Therapeutika von enormer Bedeutung.

1.1 Potentielle Rolle des Amyloid-beta (A β)-Peptids in AD

Die AD ist histopathologisch charakterisiert durch extrazelluläre amyloide Ablagerungen, die als sogenannte *senile plaques* beschrieben sind und aus einem Kern von Amyloid-beta (A β)-Peptiden bestehen, umgeben von degenerierten Neuriten, reaktiven Astrozyten und Mikrogliazellen (Terry & Katzman, 1983; Glenner & Wong, 1984a; Itagaki *et al.*, 1989; Funato *et al.*, 1998) . Darüber hinaus wurden intrazelluläre neurofibrilläre Bündel als pathologische Begleiter in den Gehirnen von Alzheimererkrankten gefunden (Braak & Braak, 1991), die aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein gebildet werden (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986; Goedert *et al.*, 1988; Kosik *et al.*, 1988; Wischik *et al.*, 1988). Bis heute ist nicht bekannt, wie genau diese postmortalen histopathologischen Marker Einfluss auf die Entwicklung der AD nehmen.

Nach Identifizierung des A β -precursor-Proteins APP (Kang *et al.*, 1987; Weidemann *et al.*, 1989) war man in der Lage, die Generierung des A β -Peptids im Organismus nachzuvollziehen. APP ist ein *single-pass* Typ 1 Transmembranglykoprotein mit einer kleinen zytosolischen C-terminalen Domäne und einem großen luminalen N-Terminus (Abb. 1.1). Die Funktion des APP ist weitestgehend unbekannt, allerdings wird vermutet, dass es eine Rolle bei der Regulation des Neuronenwachstums, bei der Zelladhäsion und bei der Migration von neu differenzierten Neuronen im Cortex spielt (Turner *et al.*, 2003). APP kann auf unterschiedliche Weise proteolytisch gespalten werden (Abb. 1.1). Der nicht-amyloidogene Weg, welcher in den meisten Zelltypen den dominanten APP-Prozessierungsweg darstellt und die Bildung des A β -Peptids verhindert, wird durch die nacheinander folgende proteolytische Spaltung durch α - und γ -Sekretase gewährleistet (Esch *et al.*, 1990). Der alternative amyloidogene Prozessierungsweg wird vor allem in Neuronen bevorzugt und hat die Bildung des A β -Peptids zur Folge (Golde *et al.*, 1992). Dieser wird durch die proteolytische Aktivität der β -Sekretase BACE 1 an der N-terminalen Position 1 der A β -Sequenz eingeleitet (Vassar *et al.*, 1999) und durch die fortführende Prozessierung durch die γ -Sekretase vollendet. Die γ -Sekretase kann dabei den membrangebundenen C-terminalen Teil des A β -Peptids an verschiedenen Stellen spalten, sodass ein heterogener Mix an produziertem A β -Peptid entsteht (De Strooper *et al.*, 1999; Wolfe *et al.*, 1999), wobei das A β_{1-40} und das A β_{1-42} -Peptid als die dominanten A β -Spezies beschrieben sind (Haass & Selkoe, 1993; Scheuner *et al.*, 1996).

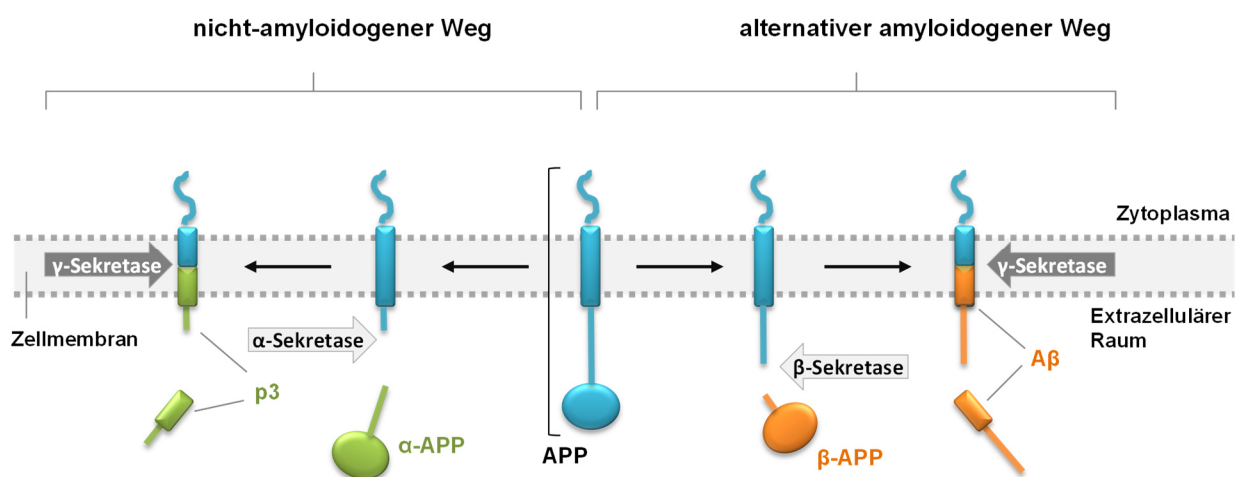


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Prozessierung des A β -precursor-Proteins (APP). Das APP Transmembranglykoprotein wird mittels zwei verschiedener Wege sequenziell gespalten: Der nicht-amyloidogene Weg (links) und der alternative amyloide Weg (rechts). Die Initialspaltung des APP durch die α -Sekretase findet in der Proteinregion statt, welches die Bildung des A β -Peptids verhindert und stattdessen nach γ -Sekretasespaltung das sogenannte p3-Protein generiert. Im Gegenteil dazu bewirkt die Spaltung der β -Sekretase im alternativen amyloidogenen Weg die Bildung des A β -Peptids nach erfolgter γ -Sekretasespaltung. (Die Größe der Elemente zueinander ist nicht maßstabsgetreu dargestellt). Abbildung geändert nach (Cummings, 2004)

Allerdings stellt die A β -Produktion auch in gesunden Menschen einen gewöhnlichen physiologischen Prozess dar (Haass *et al.*, 1992) und besitzt in geringen Konzentrationen eine neuroprotektive Funktion (Puzzo *et al.*, 2008). Demnach kann die Existenz des A β -Proteins allein nicht für die Entstehung von AD verantwortlich sein. Mit der Untersuchung von Familienmitgliedern, unter deren Vorfahren häufiger AD-Erkrankte auftraten, erkannte man, dass Mutationen in Genen, die für die Generierung des A β -Peptids verantwortlich sind, die Entstehung dieser autosomal dominant vererbaren familiären AD (FAD) hervorrufen. Zum Beispiel war der A β_{1-42} -Gehalt im Gehirn aufgrund von erhöhter A β -Generierung durch Mutationen im APP-Gen bzw. in einem der beiden Presenilin-Gene (beide Gene kodieren Komponenten des γ -Sekretase-Komplexes) enorm gesteigert (Suzuki *et al.*, 1994; Haass *et al.*, 1995; Duff *et al.*, 1996; Scheuner *et al.*, 1996). Deshalb wurde zunächst angenommen, dass A β_{1-42} wohl der wichtigste Faktor in der Pathogenese von AD darstellt (Iwatsubo *et al.*, 1994; Findeis, 2007). Da jedoch neben dem A β_{1-42} auch das A β_{1-40} als eine Haupt-A β -Spezies im Serum und in der zerebrospinalen Flüssigkeit von gesunden Versuchspersonen beschrieben ist (Haass & Selkoe, 1993; Scheuner *et al.*, 1996), fragte man nach dem Zusammenhang dieser beiden A β -Formen. Es konnte gezeigt werden, dass das A β_{1-42} schneller aggregiert als das A β_{1-40} (Jarrett *et al.*, 1993). Zudem wurde beobachtet, dass weniger die Quantität des A β_{1-42} in der Entstehung von AD eine Rolle spielt, sondern vielmehr das Verhältnis von A β_{1-42} zu A β_{1-40} Auswirkungen auf die Entstehung und das Fortschreiten der AD besitzt (Kuperstein *et al.*, 2010).

Neben der monomeren Form des A β -Peptids wurde mehrfach beobachtet, dass dieses Peptid auch zu Dimeren, Oligomeren und Protofibrillen aggregieren und letztendlich die typischen histopathologischen Marker, die sogenannten *plaques*, in Gehirnen ausbilden kann (Walsh *et al.*, 1997; Harper *et al.*, 2003; Lesné *et al.*, 2006; Shankar *et al.*, 2008; Rijal Upadhaya *et al.*, 2012). Die Annahme, dass die gesteigerte A β -Aggregatablagerungen im Gehirn die Ursache für die AD-Pathologie darstellen und nachfolgend die Entstehung von neurofibrillären Bündeln, Neuronendefizite, Gefäßbeschädigungen und Demenz hervorrufen, wurde 1992 als die sogenannte Amyloid-Kaskade-Hypothese verfasst (Hardy & Higgins, 1992) (Abb. 1.2). Jedoch war die Charakterisierung dieser *plaques* limitiert. Zudem konnte bisher nur eine schwache Korrelation zwischen dem Schweregrad der Demenz und der Dichte bzw. Lokalisation der *plaques* in Gehirnen von AD-Patienten erkannt werden (Nagy *et al.*, 1995; Mackenzie *et al.*, 1996; Price & Morris, 1999; Knopman *et al.*, 2003; Aizenstein *et al.*, 2008; Savva *et al.*, 2009), sodass diese Hypothese im Wandel ist und man annimmt, dass zusätzliche Faktoren eine Rolle spielen (Selkoe, 2011). Jüngere Veröffentlichungen zeigen, dass ebenso oligomere lösliche A β -Formen an der Entstehung von AD beteiligt sind (Lambert *et al.*, 1998; Walsh & Selkoe, 2007; Shankar *et al.*, 2008; Gandy *et al.*, 2011). Zum Beispiel konnte gezeigt werden, dass synaptische Dysfunktion (Lue *et al.*, 1999), neurofibrilläre Bündel (McLean *et al.*, 1999) und ein klinischer AD-Phänotyp

(Tabaton *et al.*, 1994; Kuo *et al.*, 1996) mit der Präsenz von A β -Oligomeren einhergehen. Zudem wurde veröffentlicht, dass die Konzentration von A β -Oligomeren höher in den Gehirnen von AD-Patienten vorliegt, als in Gehirnen von gesunden Versuchspersonen im gleichem Alter (Shankar *et al.*, 2008; Bao *et al.*, 2012; Savage *et al.*, 2014). Allerdings schließt der Nachweis dieser A β -Oligomere in AD-Gehirnen die Involvierung der A β -*plaques* in der progressiven Degeneration von Neuronen nicht aus. Es gibt Indikationen, dass diffuse, oligomere Zusammenlagerungen sich in umliegender Nachbarschaft von diesen *plaques* befinden (Knowles *et al.*, 1999; Koffie *et al.*, 2009), sodass man annehmen kann, dass extrazelluläre A β -*plaques* als lokales Reservoir für die dynamische Assoziation und Dissoziation von Oligomeren dienen.

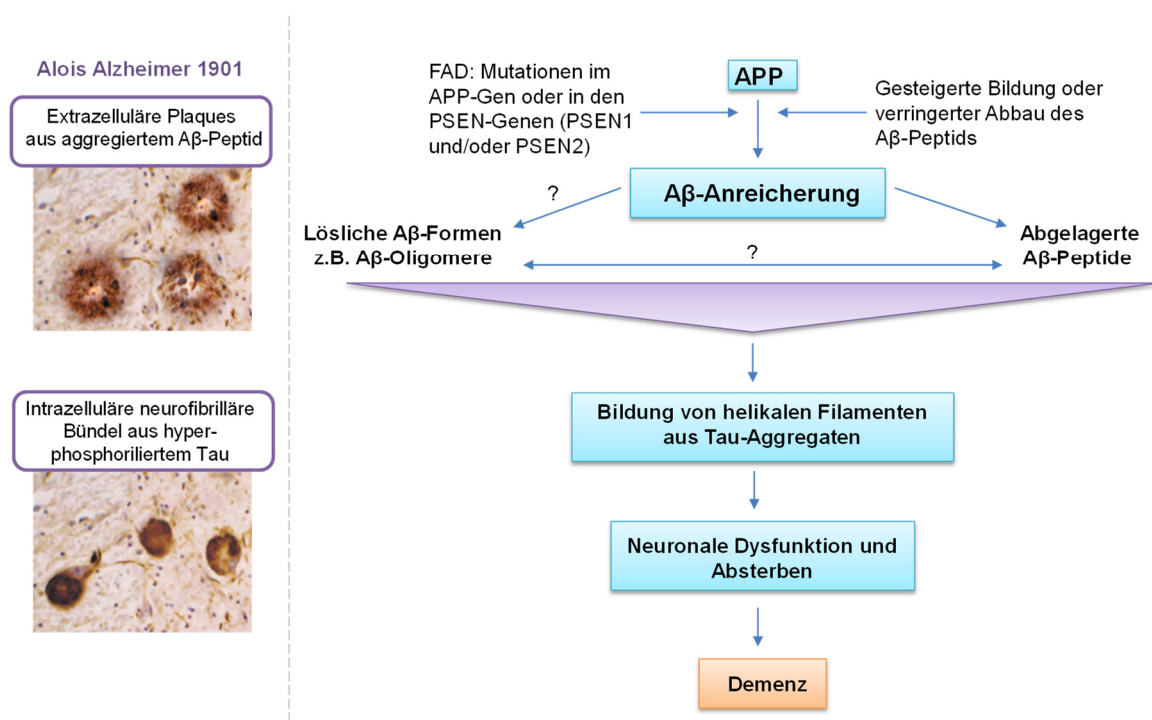


Abb. 1.2: Schema der Hypothese der amyloiden Kaskade.

Links (übernommen aus Cummings, 2004): Grundlegend für die Hypothese der amyloiden Kaskade war die Entdeckung der zwei histopathologischen Merkmale, extrazelluläre *plaques* und intrazelluläre neurofibrilläre Bündel in Gehirnen von AD-Erkrankten durch Alois Alzheimer 1901. Rechts: Die Amyloid-Kaskade-Hypothese postuliert, dass die gesteigerte Generierung und damit verbundene Ablagerung des A β -Peptids im Gehirn ausschlaggebend für die Entstehung von AD ist. Ursache für diese Annahme war die Entdeckung, dass autosomal dominante Mutationen im APP-Gen oder in den PSEN-Genen den Ausbruch einer frühen FAD-Erkrankung (familiäre Alzheimer Erkrankung; < 65 Jahre) bewirken. Die Hypothese wurde über die Jahre modifiziert, da keine lineare Korrelation zwischen den amyloiden Ablagerungen und der Stärke der Ausprägung von Demenz gezeigt werden konnte, sodass man vermutet, dass andere Formen des A β -Peptids, wie lösliche Oligomere, die neurotoxische Form darstellen. Desweiteren kann auch das Zusammenwirken von verschiedenen A β -Formen in unterschiedlichen molekularen Kompositionen die Pathologie von AD beeinflussen. Da die Art der toxischen A β -Spezies und der genaue Mechanismus noch weitestgehend ungeklärt sind, bleibt dieser Teil der Hypothese weiterhin ein stark diskutiertes Feld. Desweiteren gilt es auch die nachfolgende Initiation, die zur Bildung von gepaarten helikalen Filamenten (PHF) aus hyperphosphorylierten Tau-Aggregaten führt, zu untersuchen. Diese Tau-Aggregate gelten als die Verursacher der anschließenden neuronalen Dysfunktion und des Absterbens von Nervenzellen in limbischen Gehirnarealen von AD-Patienten, welches als Konsequenz Demenz zur Folge hat. Abbildung geändert nach (Karran, Mercken, & De Strooper, 2011).

Die Präsenz dieser A β -Oligomere vor der eigentlichen Bildung der A β -*plaques* legt allerdings auch nahe, dass diese oligomeren Formen schon zu einem frühen Zeitpunkt (lange bevor die ersten Krankheitssymptome auftreten) zur Beeinträchtigung der synaptischen Plastizität führen, sodass die *plaque*-Entstehung nur eine Folge der A β -Oligomeren-Anreicherung im Gehirn darstellen könnte (Gao *et al.*, 2010). Man nimmt an, dass die oligomere Toxizität durch die Veränderung von Rezeptor-vermittelten synaptischen Kaskaden, wie z.B. dem NMDA-Rezeptor-abhängigen Mechanismus (De Felice *et al.*, 2007; Ittner *et al.*, 2010) hervorgerufen wird, welcher in verschiedene neurologischen Prozessen, wie Lernen, Gedächtnis und Neurodegeneration, involviert ist. Desweiteren gibt es Studien, dass die A β -Oligomere durch die Bindung an intrazelluläre Proteine, wie mitochondriale oder ER-Proteine, zytotoxisch wirken (Deshpande *et al.*, 2006; Manczak *et al.*, 2011), da beobachtet werden konnte, dass diese Wechselwirkungen in vielen Fällen zur Zellschädigung durch Calciumdisregulation und oxidativen Stress führen und dies letztendlich Apoptose der Nervenzellen bewirkt.

Ebenfalls noch ungeklärt ist das Zusammenwirken des A β -Peptids mit dem zeitlich späterem Auftreten des Tau-Proteins in Form von intrazellulären neurofibrillären Bündeln in der AD-Pathologie. Es wird angenommen, dass die A β -Ablagerung die Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins initiiert und dies die Bildung von gepaarten helikalen Tau-Filamenten (PHF) auslöst. Es konnte gezeigt werden, dass die Tau-Hyperphosphorylierung direkt mit Neuronendegeneration verknüpft ist (Kenneth *et al.*, 2005; Noble *et al.*, 2013). Da jedoch bisher keine Korrelation zwischen der amyloiden *plaque*-Ablagerungen und der Dichte der neurofibrillären Bündel gezeigt werden konnte (Price *et al.*, 2009) und Mutationen im Tau-Protein auch ohne die Detektion von A β -*plaques* zu Neuronenrückgang führen können (Hutton *et al.*, 1998), bleibt das Zusammenwirken dieser beiden Faktoren weiterhin zu erforschen. Neuere Studien zeigen zudem, dass die Involvierung des Tau-Proteins nicht unbedingt nur eine Folge einer A β -Anreicherung darstellen könnte, sondern die A β -Toxizität durch die Anreicherung des Tau-Proteins in Dendriten unterstützt wird. So konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung des NMDA-Rezeptors durch die mit Tau-assoziierte Tyrosinproteinkinase FYN die A β -Toxizität begünstigt (Ittner *et al.*, 2010; Ittner & Götz, 2011). Ebenso konnte auch eine Abhängigkeit der Tau-Hyperphosphorylierung von der Präsenz von A β -Oligomeren in AD-Gehirnen beobachtet werden (De Felice *et al.*, 2008), sodass A β -Oligomere in vieler Hinsicht als Initiator der AD-Pathologie in Frage kommen (Benilova *et al.*, 2012).

1.2 Das Pyroglutamat-3-A β Peptid (A β_{pE3})

1.2.1 Präsenz und Toxizität des A β_{pE3}

Neben der Varianz der C-terminalen Länge des A β -Peptids sind auch N-terminal verkürzte A β -Formen in Gehirnen von AD-Patienten beschrieben und repräsentieren mehr als 60% von allen A β -Spezies in den A β -*plaques* (Miller *et al.*, 1993; Sergeant *et al.*, 2003). Neben dem Volllängenpeptid A β_{1-42} existieren auch N-terminal verkürzte Peptide, wie das A β_{2-42} (Bibl *et al.*, 2012), A β_{3-42} (Güntert *et al.*, 2006), A β_{4-42} (Masters *et al.*, 1985) A β_{5-42} , A β_{8-42} , A β_{9-42} und A β_{11-42} (Näslund *et al.*, 1994; Sergeant *et al.*, 2003). 1986 wurde zum ersten Mal ein Peptid - isoliert aus dem zerebralen Kortex von AD-Patienten - beschrieben, dessen N-Terminus für den Edman-Abbau (Edman & Begg, 1967) blockiert war und so dessen N-terminale Sequenz nicht bestimmt werden konnte (Selkoe *et al.*, 1986; Gorevic *et al.*, 1986). Erst durch Mori und Kollegen war es 1992 mittels Massenspektrometrie möglich nachzuvollziehen, dass es sich um eine N-terminal modifizierte Form des A β_{3-42} handeln musste. Mittels der Anwendung einer Pyroglutamylpeptidase konnte nachgewiesen werden, dass am N-Terminus des Peptids ein Pyroglutamat lokalisiert ist. Saido *et al.*, 1995 konnten durch detaillierte Analyse die differenzielle Verteilung von A β_{1-x} bzw. A β_{3-x} in verschiedenen Gehirnarealen, als auch in den *plaques* selbst zeigen und schlossen somit auf eine frühere Präsenz des A β_{pE3} -Peptids vor der beginnenden A β -Ablagerung. Der gemessene prozentuale Gehalt des A β_{pE3-x} -Peptids zum Gesamt-A β in Gehirnen von AD-Patienten variiert in verschiedenen Veröffentlichungen in Abhängigkeit der verwendeten Methode (siehe Tab. 1.1). Mori *et al.*, 1992 konnten dabei zum ersten mal 15-20 % des A β_{pE3} des Gesamt-A β in Gehirnen von AD-Patienten nachweisen. Es konnte zudem gezeigt werden, dass A β_{pE3-x} sowohl in löslichen Fraktionen als auch in den *plaques* in Gehirnen von AD-Patienten zu einer der dominierenden A β -Varianten neben A $\beta_{1-40/42}$ und Pyroglutamat-modifiziertem A β_{11-42} (A $\beta_{pE11-42}$) gehört (Piccini *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006; Sullivan *et al.*, 2011) (Abb. 1.3).

In der löslichen Fraktion des zerebralen Kortex von gesunden Versuchspersonen ist hingegen das A β_{1-42} -Peptid mit dominierender Präsenz gegenüber A β_{pE3-42} und A $\beta_{pE11-42}$ beschrieben (Piccini *et al.*, 2005), sodass allein die Menge an A β_{pE3-42} in AD-Gehirnen einen Hinweis auf dessen Relevanz in der Pathologie von AD liefert.

Tab. 1.1: Prozentualer Anteil des $A\beta_{pE3-x}$ -Peptids zum Gesamt- $A\beta$ in Gehirnen von AD-Patienten in Abhängigkeit der verwendeten Methode

Fraktion	Methode (kurz)	$A\beta_{pE3}$ -Gehalt zum Gesamt- $A\beta$ in %	Referenz
Homogenat aus unlöslicher Fraktion des zerebralen Cortex	10 % SDS-Lsg., entstandenes Pellet in 100% Ameisensäure	15-20	Mori <i>et al.</i> , 1992
Neuritische <i>plaques</i> isoliert aus dem unlöslichen Homogenat des zerebralen Cortex	5% SDS, 80% Ameisensäure	51	Kuo <i>et al.</i> , 1997
Homogenat aus zerebralem Cortex	direkt in 70 % Ameisensäure	25 (bezogen auf $A\beta_{42}$)	Harigaya <i>et al.</i> , 2000
lösliche Fraktion des zerebralen Cortex	0,2 % DEA	37	Wu <i>et al.</i> , 2013
unlösliche Fraktion des zerebralen Cortex	entstandenes Pellet nach DEA-Behandlung anschließend mit 6M GuHCl gelöst	45	Wu <i>et al.</i> , 2013

Russo *et al.* 2002 konnten zeigen, dass $A\beta_{pE3-40/42}$ -Peptid signifikant Neuronen und Astrozytenzellen in Ihrer Vitalität beeinflusst und im Vergleich zum $A\beta_{1-40/42}$ eine höhere Toxizität im Zellkultursystem aufweist (Russo *et al.*, 2002; Piccini *et al.*, 2005). Ebenfalls konnte mit Hilfe einer neuen transgenen Mauslinie (TBA2) mit gezielter neuronaler Überexpression des zunächst unmodifizierten $A\beta_{Q3-42}$, demonstriert werden, dass anschließend aufgrund einer spontanen bzw. durch die Glutaminylzyklase katalytische Zyklisierung des N-terminalen Glutamins zu Pyroglutamat konvertiertes intrazelluläres $A\beta_{pE3-42}$ zu Neurodegeneration und neurologischen Defiziten führt (Wirhns *et al.*, 2009). Bereits etablierte AD-Mausmodelllinien, wie die konventionelle AD-Mauslinie 5XFAD, die aufgrund von Mutationen in APP- und Presenilin 1-Gen eine erhöhte Expression des $A\beta_{1-42}$ aufweist, zeigten bereits eine typische AD-Pathologie in Form von altersabhängigen Verhaltensdefiziten, Axonopathy, Neurodegeneration und *plaque*-Ablagerung in Mäusen (Oakley *et al.*, 2006 Jawhar *et al.*, 2012). Allerdings wurde bei dieser Mauslinie auch eine Bildung von verkürzten $A\beta$ -Formen- wie $A\beta_{4-42}$, $A\beta_{5-42}$, $A\beta_{3-42}$ und $A\beta_{pE3-42}$, $A\beta_{1-40}$ und $A\beta_{pE3-40}$ nachgewiesen (Witnam *et al.*, 2012). Durch die Kreuzung dieser bereits schon etablierten Mauslinie mit der $A\beta_{pE3-42}$ -Überexpressionslinie TBA2 konnte gezeigt werden, dass die zusätzliche $A\beta_{pE3-42}$ -Expression zu einer verstärkten *plaque*-Bildung und einem gesteigerten löslichen extrazellulären $A\beta_{pE3-42}$ -Gehalt führte, welches die motorischen Fähigkeiten und das Verhalten in dieser neu gekreuzten transgenen Mauslinie (FAD42) negativ beeinflusste (Witnam *et al.*, 2012). Anhand dieser Ergebnisse konnte eine Korrelation zwischen der Menge an gebildetem $A\beta_{pE3-42}$ und dem Ausmaß der AD-Pathologie gezeigt werden. Die Beobachtung, dass signifikant höhere Konzentrationen von $A\beta_{pE3-42}$ in Gehirnen von AD-Patienten im Vergleich zu nichtdementen Versuchspersonen detektiert wurden (Piccini *et al.*, 2005; Schilling *et al.*, 2008),

der charakteristische Lactamring des Pyroglutamats gebildet wird (Abb. 1.4) (Schilling *et al.*, 2003). Ebenfalls ist die Spontanbildung des N-terminalen Pyroglutamats aus Glutamin bzw. Glutamat möglich, wobei gezeigt werden konnte, dass die Geschwindigkeitskonstante der Zyklisierung von Glutamin unter physiologischen pH-Bedingungen $1-2 \times 10^3$ fach größer ist als die von Glutamat (Seifert *et al.* 2009). Die Halbwertszeit von L-Glutaminylpeptiden liegt demzufolge bei einigen Tagen, währenddessen L-Glutamylpeptide eine Halbwertszeit von mehreren Jahren besitzen. Es konnte gezeigt werden, dass die humane QC unter *in vitro*-Bedingungen die Geschwindigkeitskonstante der Glutamatzyklisierung um das $2,2 \times 10^5$ -fache beschleunigt, sodass die Halbwertszeit von N-terminalen L-Glutamyl-Resten auf Stunden bis zu Minuten herabgesetzt werden kann (Seifert *et al.* 2009).

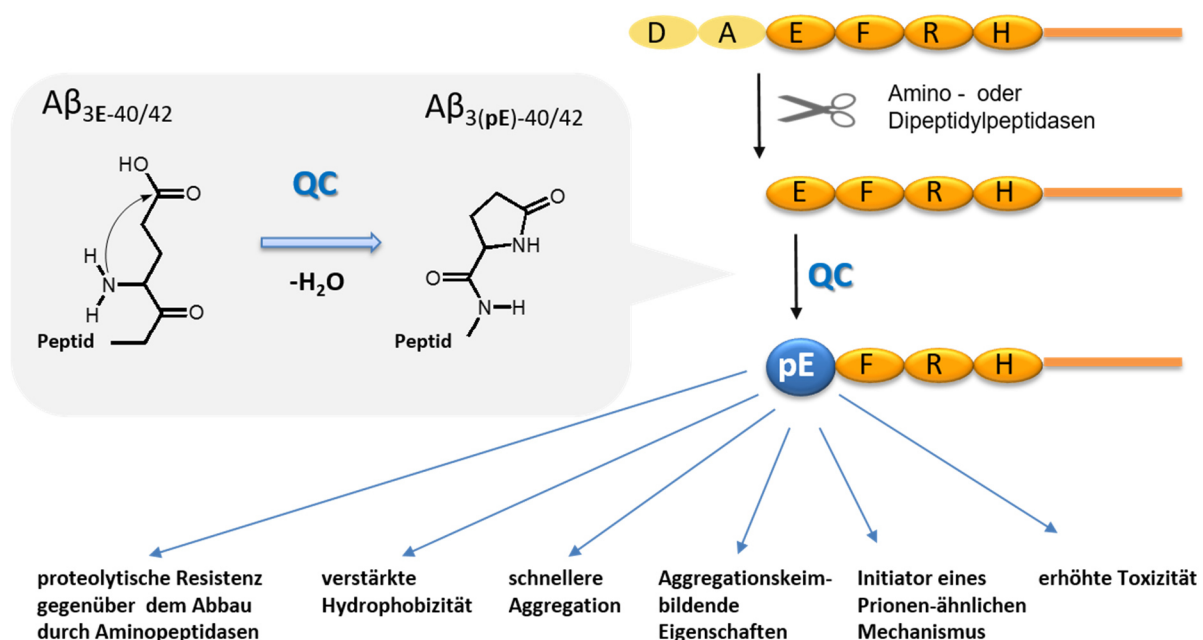


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Generierung von $A\beta_{pE3-x}$ und dessen Eigenschaften

Die ersten beiden Aminosäuren - Aspartat und Alanin - des $A\beta$ -Peptids werden durch einen noch unbekanntem Mechanismus (potentielle Möglichkeiten sind z.B. die Involvierung von Amino-, bzw. Dipeptidylpeptidasen oder Meprin β) vom N-Terminus des Volllängen- $A\beta$ -Peptids entfernt, sodass das N-terminale Glutamat vorliegt. Dieses wird durch den nukleophilen Angriff der Aminogruppe am Kohlenstoffatom der Carboxylgruppe unter Abspaltung von H_2O durch die Glutaminylzyklase (QC) zu Pyroglutamat cyclisiert. Das entstandene pE- $A\beta$ -Peptid besitzt veränderte biochemische Eigenschaften, welches letztendlich zu einer gesteigerten Toxizität verglichen mit dem Volllängen- $A\beta$ -Peptid führt. Abbildung geändert nach (Jawhar *et al.*, 2011)

Die QC-Expression in der Hirnrinde von AD-Patienten ist hochreguliert und korreliert mit der Präsenz von Pyroglutamat-modifiziertem $A\beta$ (Schilling *et al.*, 2008). Darüber hinaus war es möglich, diese pE- $A\beta$ -Produktion *in vivo* und *in vitro* durch QC-Inhibitoren zu blockieren (Cynis *et al.*, 2006; Schilling *et al.*, 2008). Diese Blockierung der QC als auch genetischer QC *knock out* führte sowohl zu einer Reduktion des $A\beta_{pE3-}$, als auch des $A\beta_{40/42}$ -Gehalts und zu einer Verminderung der *plaque*-Ablagerung, verbunden mit der Verbesserung von Verhaltensdefiziten

in verschiedenen AD-Mausmodellen (Schilling *et al.*, 2008; Jawhar *et al.*, 2011). Eine Kreuzung der oben bereits erwähnten konventionellen AD-Mauslinie (5XFAD) mit einer transgenen Mauslinie, welche humane QC (hQC) exprimiert, führte zu einer signifikanten Erhöhung des löslichen $A\beta_{pE3-42}$ -Gehalts in Verbindung mit vermehrter *plaque*-Ablagerung und intensiverer Beeinflussung des motorischen- und Arbeitsgedächtnisses (Jawhar *et al.*, 2011). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass ein *knock out* (KO) der endogenen murinen QC in einer 5XFAD/QC-KO-Kreuzung zu einer Verringerung des Gesamt- $A\beta$, einschließlich dem pE3- $A\beta$ führt und dadurch Verhaltensdefizite der 5XFAD-Mäuse aufgehoben werden konnten. Die Korrelation zwischen dem Pyroglutamat-modifiziertem $A\beta$ und QC-Aktivität liefert demzufolge starke Beweise für die tatsächliche Beteiligung der QC an der $A\beta_{pE3-42}$ -Bildung verbunden mit AD.

Es ist bekannt, dass die Abspaltung der ersten beiden N-terminalen Aminosäuren des $A\beta$ -Peptids und die Bildung des Lactamringes, einhergehend mit dem Verlust von zwei negativen und einer positiven Ladung, zur gesteigerten Hydrophobizität des $A\beta$ -Peptids führt (Saido *et al.*, 1996; Schlenzig *et al.*, 2012). Der hydrophobe N-Terminus bedingt, dass Pyroglutamat-modifizierte $A\beta$ -Peptide gegenüber dem Abbau durch Aminopeptidasen proteolytisch resistent sind (Kuo *et al.* 1998; Saido 1998) und dass die Aggregationsgeschwindigkeit verglichen zur unmodifizierten $A\beta$ -Variante unabhängig vom C-Terminus um das 250-fache gesteigert wird (Schilling *et al.*, 2006; Schlenzig *et al.*, 2009). Zudem ist dieses pE- $A\beta$ -Peptid ebenfalls in der Lage, die Aggregation des $A\beta$ -Volllängenpeptids zu initiieren. So stellen pE- $A\beta$ -Formen potentielle Aggregationskeimbildende Spezies dar (Tekirian *et al.* 1999; Geddes *et al.* 1999).

In einer anderen Studie mit Down Syndrom Patienten, die frühzeitig alzheimerähnlichen Symptome zeigen, wurde mit zunehmenden Alter nachgewiesen, dass die Menge an löslichem $A\beta_{pE3-42}$ im Gehirn steigt, lange bevor die Bildung von amyloiden *plaques* detektiert wird (Russo *et al.*, 1997). Da das $A\beta$ -Vorläuferprotein APP auf dem Chromosom 21 codiert ist, wird es somit bei Patienten mit Trisomie 21 vermehrt gebildet. Aufgrund dieser Studien, vermutet man, dass die Erscheinung von löslichem $A\beta_{pE3-42}$ einen der ersten Marker in der Pathologie von AD darstellt und aufgrund seiner aggregationsfördernden Eigenschaft womöglich als Initiator der AD-Erkrankung fungieren könnte (Schilling *et al.*, 2008; Jawhar *et al.*, 2011).

He & Barrow berichteten 1999, dass neben dem gesteigerten Aggregationsverhalten pE- $A\beta$ -Peptide einen erhöhten Anteil an β -Faltblättern im wässrigen und hydrophoben Medium im Vergleich zum Volllängen- $A\beta$ aufwiesen. Sie vermuteten, dass durch den Verlust der N-terminalen-Ladung die β -Faltblattbildung aufgrund der Reduzierung möglicher unerwünschter Ladungsrückstoßkräfte zwischen den benachbarten Strängen vereinfacht und stabilisiert wird (He & Barrow, 1999). Desweiteren genügen geringe Mengen an $A\beta_{pE3-42}$, um einen Prionen-ähnlichen Mechanismus zu starten (Nussbaum *et al.*, 2013; Matos *et al.*, 2014). Dabei wurde von Matos *et al.* gezeigt, dass im Gegensatz zu den von He & Barrow 1999 veröffentlichten Daten pE- $A\beta$ mehr

aus α -helikalen Elementen und weniger aus β -Faltblattstrukturen im Vergleich zum Volllängen-A β aufgebaut ist (Matos *et al.*, 2014). Es wurde dokumentiert, dass A β_{pE3-42} die β -Faltblattbildung des Volllängen-A β durch direkten Kontakt zu helikalen-Strukturen revertiert und so bewirkt, dass die Bildung von A β -Fibrillen reduziert und die Bildung von präfibrillären Aggregaten, wie Oligomeren, begünstigt wird. Dies zeigt, dass das A β_{pE-42} -Peptid neben seiner eigenen gesteigerten Toxizität auch Eigenschaften besitzt, die Toxizität anderer Peptide zu beeinflussen (Abb. 1.4), sodass man das Peptid auch als hypertoxisch bezeichnet.

1.2.3 A β_{pE3} - Vorkommen

pE3-A β erscheint zu einem sehr frühen Stadium der AD-Erkrankung in Form von perisynaptischen Aggregaten (Mandler *et al.*, 2012) und reichert sich nachträglich in diffusen und kernförmigen *plaques* in sporadischer AD und familiärer AD (Saido *et al.*, 1995; Miravalle *et al.*, 2005) an. Gehirne von Alzheimererkrankten bestehen zu 90 % aus kernförmigen *plaques*, die zu ca 25 % (siehe Tab. 1.1) aus A β_{pE3-X} bestehen (Harigaya *et al.*, 2000; Güntert *et al.*, 2006). Die AD-Erkrankung wurde bisher in drei biochemische Stadien unterteilt, wobei Stadium 1 nur das Vorkommen von A $\beta_{1-40/42}$ -Plaques repräsentiert, währenddessen A β_{pE3} im Stadium 2 (im präklinischen AD-Stadium) und in Stadium 3 gemeinsam mit dem phosphorylierten A β (im symptomatischen AD-Stadium) hinzukommt (Upadhaya *et al.*, 2014).

Der mögliche Einfluss von oligomeren A β -Formen in der Pathologie von AD wurde bereits in 1.1 beschrieben. Allerdings ist die Komposition dieser Oligomere als auch die Beteiligung des A β_{pE3} noch weitestgehend ungeklärt. Wirths *et al.* konnten zum ersten Mal die Präsenz von A β_{pE3} -Oligomeren in postmortem Gehirnschnitten von AD-Patienten mit Hilfe eines oligomerspezifischen A β_{pE3} -Antikörpers (9D5) nachweisen, währenddessen keine Reaktivität in gesunden Menschen detektiert wurde (Wirths *et al.*, 2010). Schlenzig *et al.* veröffentlichten 2012, dass Pyroglutamat-modifizierte A β -Peptide im Vergleich zum A β_{1-x} wesentlich schneller Aggregate, darunter auch Oligomere, bilden und diese aufgrund des modifizierten N-Terminus hydrophobe Oberflächen ausbilden (Schlenzig *et al.*, 2012). Zudem konnte demonstriert werden, dass die synaptische Informationsweitergabe in Gehirnschnitten von Mäusen durch die Zugabe niedriger Konzentrationen an A β_{pE3-42} gehemmt wird und dies in Abhängigkeit von A β -Oligomerpräsenz stattfindet. Von Nussbaum *et al.*, konnte gezeigt werden, dass nur 5 % A β_{pE3-42} genügen, gemischt mit 95 % A β_{1-42} , um zytotoxische *low n*-Oligomere (LNOS) zu bilden. Diese Mischung bewirkt nur dann eine toxische Wirkung auf Neuronenzellen, wenn sie zuvor für 24 h gemeinsam inkubiert wurden, und somit Hybridoligomere entstehen konnten (Nussbaum *et al.*, 2012). Desweiteren waren diese Hybridoligomere bei Behandlung von *tau-knockout* Neuronen nicht zytotoxisch, sodass man vermuten kann, dass nur in Verbindung der beiden Komponenten,

den Hybridoligomeren und dem Tau-Protein, eine Toxizität hervorgerufen wird. Dies könnte die Präsenz beider histopathologischer Marker in AD (siehe Abschnitt 1.1), bestehend aus A β und Tau erklären, wobei zudem eine Korrelation zwischen A β _{pE3} und hyperphosphoryliertem Mikrotubuli-assoziiertem Tau-Protein in post-mortem Gehirnen von AD-Patienten demonstriert werden konnte (Mandler *et al.*, 2014). Es wurde ebenfalls beschrieben, dass die Struktur der oben beschriebenen LNOS sich eindeutig von Oligomeren, die nur aus A β ₁₋₄₂ gebildet wurden, unterscheidet, nachgewiesen durch einen konformationssensitiven Anti-A β -Antikörper (Nussbaum *et al.*, 2012). Piccini *et al.* zeigten zudem, dass ein löslicher A β -Mix, wie er auch in AD-Patienten vorkommt (A β ₁₋₄₂ 36 %; A β _{pE3-42} 48 %; A β _{pE11-42}, 16 %), die Membranpermeabilität von Neuroblastomazellen erhöht und so zu einem verminderten Zellüberleben führt (Piccini *et al.*, 2005). Da bekannt ist, dass A β -Oligomere im Allgemeinen aufgrund ihrer hydrophoben Oberfläche Phospholipidmembranen schädigen bzw. Membranen penetrieren können (Lashuel *et al.*, 2002; Lau *et al.*, 2006), könnte man annehmen, dass dieser lösliche A β -Mix in Form von Hybridoligomeren Membranporen bildet und somit toxisch auf die Zelle wirkt. Die in diesen Hybridoligomeren vorhandenen A β _{pE3}-Peptide könnten aufgrund ihres hydrophoben N-Terminus den hydrophoben Charakter der A β -Oligomere noch verstärken.

1.3 Passive Immuntherapie in AD

Im Moment wird die AD-Erkrankung nur durch symptomatische Medikation behandelt, um die in AD-Erkrankung auftretende Störung der Neurotransmitterbalance auszugleichen. Behandlungsmethoden, die zu einem effektivem Aufhalten bzw. einer Verlangsamung des Fortschritts der AD-Erkrankung beitragen könnten, werden bereits intensiv untersucht (Yiannopoulou & Papageorgiou, 2013). Es wurden bisher mehrere Medikamente getestet, um die Bildung als auch die Ablagerung des A β -Peptids zu regulieren. Neben der Inhibierung der β - und γ -Sekretase durch zielgerichtete Inhibitoren werden auch Antikörper gegen das A β entwickelt. Nach mehr als einem Jahrzehnt Forschungsarbeit ist die anti-A β -Immunotherapie zu einer der erfolgversprechendsten Immuntherapien für die Behandlung von AD geworden (Lannfelt *et al.*, 2014). Eine Anzahl von Arzneimittelkandidaten, welche die Bildung von A β -Aggregaten inhibieren, wurde in klinischen Phasen getestet. Allerdings mussten einige Studien aufgrund von Nebenwirkungen oder wegen ungenügender signifikanter Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten der AD-Patienten abgebrochen werden (Mangialasche *et al.*, 2010).

Neben der aktiven Immunisierung, die durch die Administration des A β -Peptids oder Fragmenten davon zur Generierung von polyklonalen spezifischen Antikörpern (AK) im menschlichen Organismus führt, wurde die passive Immunisierung als die sicherere Methode mit weniger Nebenwirkungen erkannt (Lemere & Masliah, 2010). Zur Vorbereitung einer passiven

Immunisierung werden A β -spezifische AK zunächst in einem Donororganismus (z.B. Maus) generiert (Parental-AK) und nachträglich humanisiert, sodass man monoklonale humanisierte AK erhält. Die Humanisierung ist notwendig, um ein Molekül mit minimaler Immunogenität zu produzieren, ohne dass die Spezifität und Affinität des parentalen nicht-humanisierten AK verloren geht (Riechmann *et al.*, 1988). Dazu überträgt man die Antigenerkennungssequenzen - die sogenannten Komplementaritäts-bestimmenden Regionen (*complementary determining regions*, CDRs, siehe Abschnitt 1.4) - des parentalen AK in einen humanen Gerüstantikörper. Darüber hinaus wurden „vollständig“ humane AK durch die Verwendung von rekombinanten humanen Antikörperbibliotheken (Griffiths *et al.*, 1994; Knappik *et al.*, 2000) als auch mit Hilfe von transgenen Mäusen, welche humane Immunglobuline exprimierten (Green *et al.*, 1994; Lonberg *et al.*, 1994; Lonberg, 2005), generiert. Die Verwendung von humanen AK ermöglicht den vollständigen Ausschluss von immunogenen murinen CDR-Epitopen (Bernett *et al.*, 2010).

Es werden zwei Behandlungsmöglichkeiten unterschieden. Bei der therapeutischen Methode (1) werden die AK einem Patienten zugeführt, welcher bereits erste Symptome einer AD-Erkrankung aufweist. Inwieweit die peripher verabreichten AK das im Gehirn angereicherte A β -Peptid erreichen, wird vielseitig diskutiert, allerdings werden zwei Hypothesen präferiert (Abb. 1.5, A und B). Zum einen postuliert die periphere *sink*-Hypothese, dass der AK das im Blut zirkulierende A β -Peptid bindet und somit den Wiedereintritt des A β -Peptids von der Peripherie in das Gehirn verhindert. Folglich wird das Gleichgewicht des A β -Peptids verschoben, wodurch die Auflösung der abgelagerten A β -Peptide im Gehirn induziert wird (DeMattos *et al.*, 2001; DeMattos *et al.*, 2002). Zum anderen wird davon ausgegangen, dass 0,1 % der administrierten AK die Bluthirnschranke überwinden können und so ihren Zielort erreichen (Lannfelt *et al.*, 2014). Dort angelangt, binden sie an abgelagerte A β -*plaques* und aktivieren über ihren Fc-Teil Mikrogliazellen, welche diese phagozytieren (Schenk *et al.* 1999; Bard *et al.* 2000; Wilcock *et al.* 2004). Da jedoch bisher die Toxizität der A β -*plaques* umstritten ist und immer mehr Studien darauf hindeuten, dass frühe lösliche Formen die eigentlichen Verursacher der AD-Erkrankung darstellen, werden präventive Behandlungsmethoden (2) entwickelt. Bei dieser Methode werden beispielsweise AK verwendet, die lösliche A β -Formen binden und zu einem früheren Zeitpunkt Personen mit präklinischer AD injiziert werden, um so eine A β -Ablagerung zu verhindern (Abb. 1.5 C).

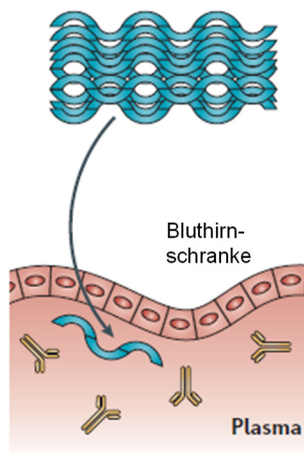
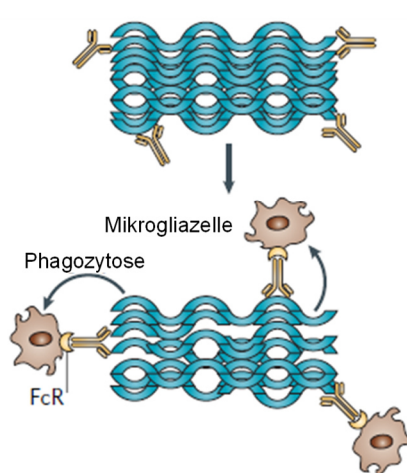
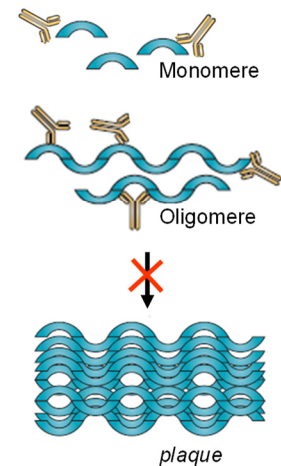
A Periphere sink-Hypothese**B Mikrogliazellen-vermittelte Aβ-plaque-Entfernung****C Entfernung von löslichem Aβ als Prävention**

Abb. 1.5: Darstellung möglicher Strategien zur Behandlung von AD durch Entfernung der Aβ-Ablagerungen bzw. der löslichen Aβ-Formen im Gehirn durch passive Immunisierung

A) Die periphere *sink*-Hypothese geht davon aus, dass die injizierten Antikörper die Bluthirnschranke nicht überwinden können, stattdessen aber Aβ-Peptide im Plasma binden und so aufgrund der Veränderung des Aβ-Gradienten einen Efflux der Aβ-Peptide aus den Aβ-plaques im Gehirn ins Blut initiieren. B) Mit der Annahme, dass 0,1 % der injizierten AK die Bluthirnschranke überwinden, können diese an abgelagerte Aβ-Peptide binden und über ihren Fc-Teil die Phagozytose über Mikrogliazellen vermitteln. C) Mittels der präventiven Entfernung löslicher Aβ-Formen könnte die Bildung von Aβ-plaques verhindert werden. Abbildung geändert nach (Weiner & Frenkel, 2006)

Alle anti-Aβ AK, welche sich aktuell in passiven immunotherapeutischen Studien am AD-Patienten befinden, sind humane bzw. humanisierte AK (Tab.1.2). Die Aβ-Epitope, die als *target* in der passiven Immunotherapie adressiert werden, variieren zwischen dem N-Terminus des Vollängen-Aβ-Peptids (z.B. Bapineuzumab) über die mittlere Region (z.B. Solanezumab) bis hin zum C-Terminus (z.B. Ponezumab) oder auch Kombinationen daraus (z.B. Gantenerumab). Andere AK sind spezifisch gegen konformationelle Epitope gerichtet (z.B. Gammagard) und erkennen somit nur aggregierte Formen des Aβ-Peptids oder Aβ-Protofibrillen (z.B. BAN2401 und Aducanumab). Behandlung von AD-Patienten (in einem Stadium von milder zu moderater Demenz) mit dem humanisierten Aβ-spezifischen AK Bapineuzumab (siehe Tab. 1.2) führten zu einer Reduktion der fibrillären Aβ-Ablagerungen in verschiedenen Gehirnarealen (Rinne *et al.*, 2010). Allerdings verbesserte diese Reduktion nicht die kognitiven Leistungen der Patienten, sodass die Weiterentwicklung dieses AK in Hinblick auf dessen Effizienz notwendig ist. Jedoch wurden bei behandelten Patienten Amyloid-bezogene bildgebende Abnormalitäten (*amyloid-related imaging abnormalities*, ARIA) gefunden, welche für intrazerebrale Blutungen und vasogene Ödeme sprechen (Sperling *et al.*, 2012), sodass die Weiterführung dieses AKs komplett eingestellt wurde. Ebenfalls sind die Studien anderer bisher getesteter therapeutischer Aβ-spezifischer AK (Tab. 1.2) aufgrund ungenügender Wirksamkeit weitestgehend beendet,

sodass die Frage offen bleibt, inwieweit die bisher gewählten A β -Epitope bzw. A β -Fibrillierungsstadien (Monomere, Oligomere Protofibrillen oder *plaques*) die geeigneten *targets* für eine A β -Immunotherapie darstellen. Die Erkennung eines modifizierten A β -Peptids, wie dem A β_{pE3} -Peptid, welches aufgrund seiner aggregationsfördernden und keimbildenden Eigenschaften möglicherweise an der Initiation der A β -Aggregation beteiligt ist und ebenfalls in toxischen Oligomeren vorkommt, könnte daher eine erfolgsversprechende Alternative darstellen.

Tab. 1.2: Passive immunotherapeutische Studien am AD-Patienten

(Moreth *et al.*, 2013; Lannfelt *et al.*, 2014; Scheltens *et al.*, 2016; Cynis *et al.*, 2016)

Firma	AK	A β Epitop	Klinisches Stadium	Kommentar
Elan/Wyeth/ Pfizer	Bapineuzumab (humanisierter 3D6, monoklonal)	N-Terminus (AA 1-5)	zwei Phase III Studien	beendet , zeigte keine ausreichende Wirkung
Eli Lilly	Solanezumab (humanisiert, monoklonal)	Mittlere Region (AA 16-26), bindet nur Monomere	Zwei Phase III Studien	beendet , allerdings positiver Effekt in milder AD. Neue Phase III Studie ebenfalls keine ausreichende Wirkung
ADCS/ Baxter	Gammagard IVIG (human, polyklonal)	konformationelle Epitope (vor allem Dimere)	Phase III	beendet . Verbesserter zerebraler Glukose- Metabolismus und kognitive Stabilisierung in einer kleinen klinischen Studie
Roche/ Morphosys	Gantenerumab (human, monoklonal)	N-Terminus (AA 3- 12) mittlere Region (AA 18-27)	Phase III	beendet . Reduktion von amyloiden Ablagerungen; allerdings wurden ARIAs in Phase I beobachtet
Pfizer	Ponezumab (humanisiert, monoklonal)	C-Terminus des A β 40-Peptids (Monomere, Oligomere, Fibrillen)	Phase II	beendet , zeigte keine ausreichende Wirkung
Genentech/ Roche	Crenezumab (humanisiert, monoklonal)	Monomere, Oligomere und protofibrilläre Formen (AA 13-14 scheinen relevant zu sein)	Phase II	beendet . präventive Studie geplant für frühzeitig erkrankte AD- Patienten (PSEN1- Mutationsträger)
Eisai/BioAr ctic	BAN2401 (humanisiert, monoclonal)	A β -Protofibrillen (> 100 kDa)	Phase IIb	beendet . Phase II Studie geplant in Patienten mit MCI und präklinischer AD
Biogen	Aducanumab (human, monoklonal)	Oligomere und Fibrillen	Phase Ib	Dosisabhängige Verringerung des kognitiven Fähigkeitsverlustes an Patienten mit MCI und milder AD
Eli Lilly	LY3002813 (human, monoklonal)	N-Terminus des A β_{pE3} , <i>plaque</i> -spezifisch	Phase I	Verringerung der amyloiden Ablagerungen verbunden mit einem positiven Florbetapir- PET-Scan

AA: Aminosäure; ADCS: AD kooperative Studie ; IVIG: intravenöses Immunglobulin
MCI: *mild cognitive impairment*; ARIA = *amyloid-related imaging abnormalities*

1.4 Allgemeiner Antikörperaufbau und Generierung eines F_{ab}-Fragments

IgG-Antikörper sind Tetramere von ~ 150 kDa, bestehend aus einem Paar von zwei identischen leichten Ketten (LC) und zwei identischen schweren Ketten (HC), die über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind (Edelman *et al.*, 1969). Desweiteren stärken nichtkovalente Bindungen die Interaktion zwischen leichter und schwerer Kette, wobei auch Glykosilierung der beiden schweren Ketten die Proteinstruktur zwischen den identischen HC-Ketten stabilisieren (Kolenko *et al.*, 2009). Die schwere Kette besitzt eine variable Domäne (V_H) und drei konstante Domänen (C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}) (Abb.1.6A) (Davies *et al.*, 1975). Im Gegensatz dazu besteht die leichte Kette zwar auch aus einer variablen Domäne (V_L) allerdings nur aus einer konstanten Domäne (C_L). Die variablen Domänen der leichten und schweren Kette bilden gemeinsam die Antigen-Bindetasche, wobei die hochselektive Bindung über die CDRs vermittelt wird (Kabat & Wu, 1971) (Abb.1.6B) welche von konservierten Regionen umgeben sind (Wu *et al.*, 1975).

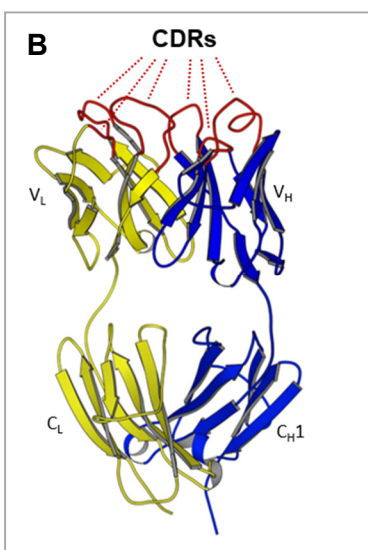
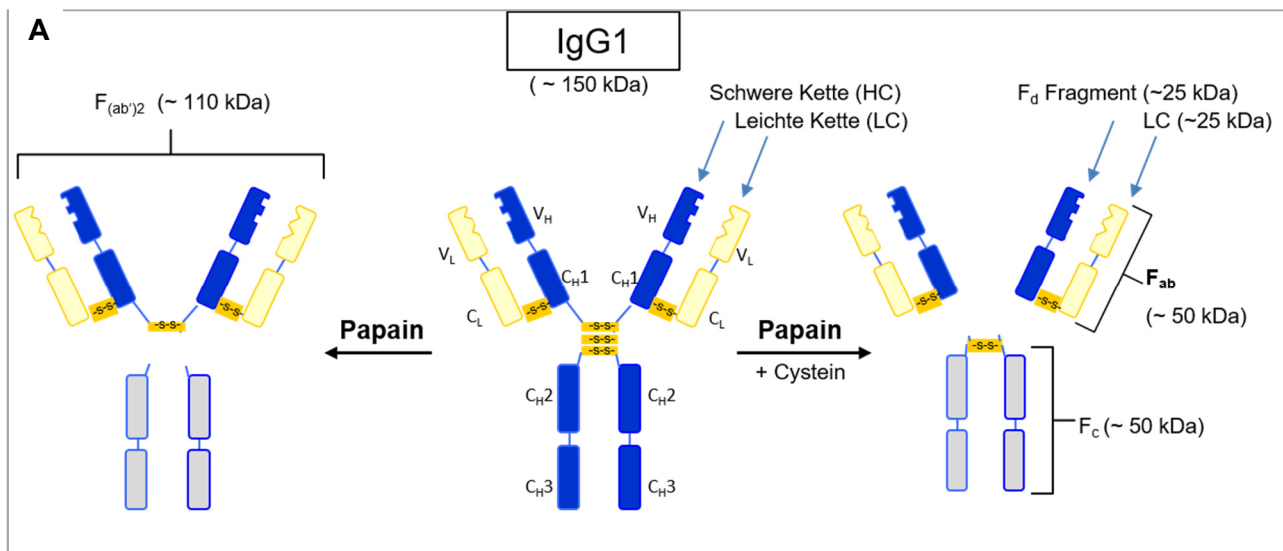


Abb. 1.6: Schema der IgG1-Antikörperspaltung und Generierung eines F_{ab}-Fragments durch Zugabe der Cysteine Papain

A) Ein IgG-Antikörper besteht aus zwei identischen leichten Ketten (gelb) und zwei identischen schweren Ketten (blau) die über Disulfidbrücken (orange) zu einem Tetramer verknüpft sind. Wird ein IgG1-Antikörper mittels Papain unter Zugabe von freiem Cystein gespalten, so erhält man zwei F_{ab}-Fragmente und ein F_c-Fragment (verändert nach (Liddell & Cryer 1991)). Ohne die Zugabe von freiem Cystein ist die Spaltstelle in der Gelenkregion für das Papain nicht zugänglich, sodass die Spaltung weiter C-terminal erfolgt und ein F_{(ab)²}-Produkt generiert wird. Die noch verbleibende Anzahl von intermolekularen Disulfidbrücken nach Papainbehandlung zwischen den beiden schweren Ketten ist unbekannt. Deshalb wurde die Gelenkregion nach Antikörperspaltung hier lediglich nur noch mit einer Disulfidbrücke dargestellt. B) Darstellung der Sekundärstrukturelemente des F_{ab}-Fragments. Das F_{ab}-Fragment besteht aus der leichten Kette (gelb) und dem F_d-Fragment (blau). In den variablen Regionen beider Ketten (V_L und V_H) befinden sich jeweils 3 CDRs (rot).

Diese CDRs bilden strukturelle Schleifen aus (Poljak *et al.*, 1973), die auch als Bindungs/*loops* bezeichnet werden. So besitzt jede Bindetasche sechs dieser hypervariablen *loops*, drei der HC und drei der leichten Kette, welche die Antikörperspezifität und Affinität zum Antigen bestimmen. Die Gelenkregion des Antikörpers befindet sich in der Kontaktfläche zwischen den beiden schweren Ketten. Diese kann mithilfe von Papain, einer Cysteinprotease, gespalten werden (Porter, 1959) (Abb. 1.6A). Abhängig von der Präsenz von Reduktionsmitteln wie freiem Cystein ist es möglich, mittels Papain entweder zwei F_{ab}-Fragmente (*fragment antigen binding*) oder ein F_{(ab)₂}-Fragment zu generieren (Parham *et al.*, 1982; Brown *et al.*, 1987). Ohne die Zugabe von freiem Cystein ist die Gelenkregion aufgrund der oxidierten Antikörper-Cysteine in Form von Disulfidbrücken blockiert, sodass die Spaltung C-terminal der Disulfidbrücken mit der Generierung eines F_{(ab)₂}-Fragments erfolgt (Parham *et al.*, 1982). Der F_c-Teil des Antikörpers wird somit in Abhängigkeit der Spaltstelle mit unterschiedlicher N-terminaler Länge produziert.

Das F_{ab}-Fragment wird gebildet, indem zunächst die Disulfidbrücke(n) in der Gelenkregion durch einen Thiol-Disulfidaustausch (durch Zugabe von freiem Cystein) gelöst und so die Zielspaltstelle des Antikörpers für das Papain zugänglich gemacht wird (Adamczyk *et al.*, 2000). In den meisten Fällen wird das Cystein in niedriger Konzentration dazu gegeben (1-10 mM), da man eine weitere Reduktion der Disulfidbrücken zwischen leichter Kette und schwerer Kette verhindern will (Adamczyk *et al.*, 2000). Das F_{ab}-Fragment besitzt eine Antigenbindetasche und besteht aus der leichten Kette und einem Teil der schweren Kette - dem F_d-Fragment (Abb. 1.6 A rechts, B).

Zudem entsteht nach Papainbehandlung ein F_c-Fragment (*fragment crystallizable*), welches durch eine oder mehrere Disulfidbrücke(n) mit dem identischen Nachbar-F_c-Fragment zu einem 2xF_c-Fragment verbrückt sein kann (Marler *et al.*, 1964; Adamczyk *et al.*, 2000). Der F_c-Teil ist verantwortlich für die Effektorfunktion des AK, welches die Initiation von Phagozytose über Mikrogliazellen als auch die Ausprägung von ADCC (Antikörper-abhängige Zell-vermittelte Zytotoxizität) und CDC (Komplement-abhängige Zytotoxizität) im Körper beinhaltet. Für die Strukturlösung der Antigenbindungsstelle spielt dieser Teil des AK jedoch keine Rolle und soll somit nicht weiter erläutert werden.

Durch die Generierung des F_{ab}-Fragments erhält man einen verkleinerten Bereich des Antikörpers, der für eine Röntgenstrukturanalyse geeignet ist und die nötige strukturelle Information über die Antigenbindung liefert. Aus diesem Grund wird diese Methode vorzugsweise verwendet, um Strukturen von Liganden, gebunden in diesen Antikörperbindetaschen, aufzuklären.

1.5 Publierte F_{ab}/A β -Strukturen

Gardberg *et al.* publizierten zum ersten Mal die Struktur zweier muriner F_{ab}-Fragmente (PFA1 und PFA2), die jeweils im Komplex mit einer kurzen Variante des A β -Peptids (A β ₁₋₈, DAEFRHDS) vorlagen (Gardberg *et al.*, 2007; A β -Bindungsmodus 1 siehe Abb. 1.7). Die Reste des A β -Peptids, die an der Bindung beteiligt waren, entsprechen den Aminosäuren A β (3-7), sodass die beiden N-terminalen Aminosäuren des A β -Peptids - Aspartat und Alanin - aus der Bindetasche des F_{ab}-Fragmentes herausragten. Die Affinitäten lagen bei 60 nM (PFA1) und 280 nM (PFA2). Betrachtet man die Gesamtstruktur dieses A β ₁₋₈-Peptids in der Bindetasche, so zeigt sich, dass es hauptsächlich oberflächenexponiert vorliegt, wobei Phenylalanin und Histidin die beiden einzigen Reste darstellen, die in einer Senke der Bindetasche festgehalten werden. Das hat zur Folge, dass die beiden AK PFA1 und PFA2 auch Kreuzreaktivitäten mit anderen human Proteinen wie z.B. GRIP1 (*glutamate receptor interacting protein*) und ROR2 (*tyrosin protein kinase transmembran receptor*) zeigten, da diese ähnliche Aminosäuresequenzen besitzen. Darüber hinaus wurde publiziert, dass diese beiden AK auch A β _{pE3-8} mit einer um die 50-fach schwächeren Bindung ($K_D = 3-12 \mu\text{M}$) erkennen. Mit der Auflösung der Struktur des F_{ab}/A β _{pE3-8}-Komplexes konnte gezeigt werden, dass das N-terminale Pyroglutamat des A β _{pE3-8}-Peptids überhängt und weniger an der Bindung beteiligt ist (Gardberg *et al.*, 2009).

Ein weiterer A β -AK, dessen Struktur gelöst und publiziert wurde, war der WO2-Antikörper (Miles *et al.*, 2008), welcher bereits zuvor in einigen Studien zur Detektion des A β 1-40/42 Verwendung fand (Ida *et al.*, 1996). Dieser murine Antikörper, im Komplex mit entweder A β ₁₋₁₆ oder A β ₁₋₂₈ zeigte in seiner Struktur keine deutlichen Konformationsunterschiede in der A β -Bindungsregion im Vergleich zum bereits beschriebenen PFA1- und PFA2-Antikörper (Gardberg *et al.*, 2007) (Abb. 1.7A). Lediglich in CDR3 der schweren Kette konnte eine unterschiedliche Orientierung des *loops* detektiert werden. Die Ausrichtung der A β -Seitenketten war allerdings fast identisch, sodass man sagen kann, dass Phe4-His6 des A β -Peptids die notwendigen Aminosäureseitenketten für die N-terminale A β -Erkennung sind und somit das Kernepitop darstellten. Von Basi *et al.* wurden drei weitere AK publiziert, deren F_{ab}-Strukturen im Komplex mit A β ₁₋₇ alle ähnlich waren. Ebenso zeigten sie die gleiche Bindungsart, wie sie zuvor auch von Gardberg und Miles demonstriert wurden, sodass man zunächst annahm, dass das A β -Peptid N-terminal nur eine Konformation besitzt und sich diese deshalb in allen bisher publizierten F_{ab}-Komplexen widerspiegelt (Basi *et al.*, 2010). Diese These wurde dadurch verstärkt, dass die N-terminale Konformation des A β ₁₋₇ mit der bereits ebenfalls gelösten Struktur des A β ₁₋₄₀ in der Bindetasche desselben AK übereinstimmte. Allerdings besaßen diese drei AK trotz des gleichen A β -Bindungsmodus (BM) verschiedene Fähigkeiten kontextabhängige Angstdefizite (*contextual fear deficits*) in AD-transgenen Mäusen zu revertieren. Man vermutete, dass diese Differenzen durch eine unterschiedliche Bindung an A β -Monomere, Dimere, Oligomere bzw. A β -Aggregate,

hervorgerufen werden könnten (Bard *et al.*, 2003; Basi *et al.*, 2010). Die einzigen strukturellen Unterschiede, die wiederum hauptsächlich in der Konformation des CDR3-*loops* der schweren Kette aller drei Antikörper detektiert wurden, könnten der Grund für die unterschiedliche Therapieeffizienz in Mäusen sein. So wurde geschlussfolgert, dass die offene Konformation des HC-CDR3-*loops* im AK12A11 die Bindung von A β -Dimeren bzw. Multimeren zulässt und so nach Administration in transgenen Mäusen die Verbesserung der kognitiven Eigenschaften bewirkt.

Die F_{ab}-Struktur des A β -spezifischen AK Gantenerumab (ein AK welcher bereits in der klinischen Phase III getestet wurde, siehe Tab. 1.2), welcher sowohl den N-Terminus als auch die mittlere Region des A β -Peptids erkennt, stellt einen zweiten Bindungsmodus dar (A β -Bindungsmodus 2; Abb. 1.7B) (Bohrmann *et al.*, 2012). Das A β ₁₋₁₁-Peptid zeigt dabei ebenfalls eine ausgedehnte Struktur entlang der Antigenbindungsregion des Antikörpers, allerdings befindet sich das Aspartat 1 des A β -Peptids an dem CDR3-*loop* der schweren Kette (H3), währenddessen im Bindungsmodus 1 dort der C-Terminus des A β -Peptids lokalisiert ist. Das heißt, dass im Vergleich zu den bisher publizierten anderen Strukturen das A β -Peptid um 180° gedreht in der Bindetasche vorliegt. Da jedoch die Koordinaten in der PDB nicht zugänglich sind, konnte das genaue Epitop nicht weiter analysiert werden.

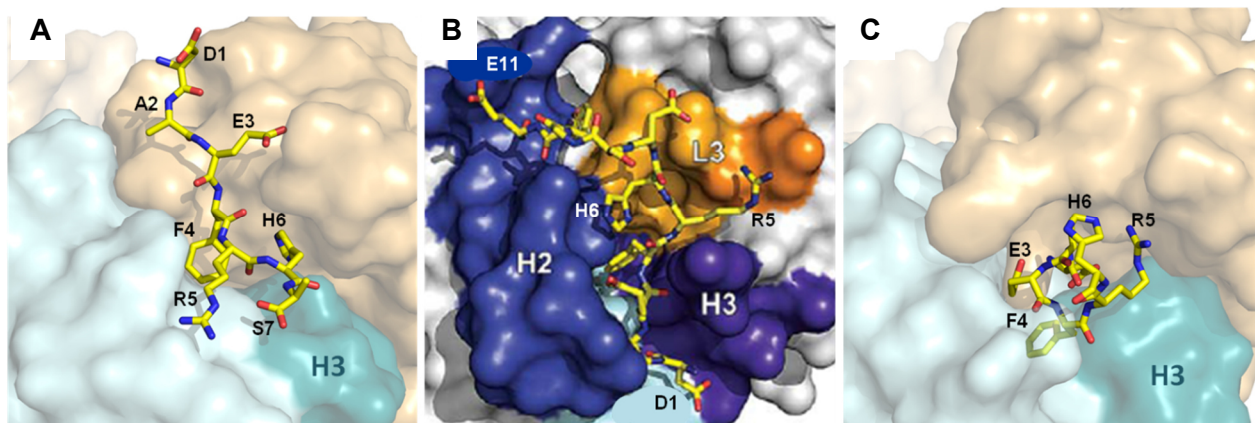


Abb. 1.7: Darstellung der N-terminalen A β -Bindung in der Antigenbindetasche verschiedener F_{ab}-Strukturen
 A) Exemplarisch für alle bis 2010 publizierten F_{ab}-A β -Strukturen ist hier die Struktur des A β ₁₋₇-Peptids (gelb) in der Bindetasche des AK12A11 (PDB:3IFL) gezeigt (Basi *et al.*, 2010). Aspartat 1 (D1) und Alanin 2 (A2) ragen aus der Bindetasche heraus, währenddessen Phenylalanin 4 (F4), Arginin 5 (R5) und Histidin 6 (H6) das Kernepitop für die Bindung darstellen. Der CDR3-*loop* der schweren Kette (H3) ist dunkelcyan eingefärbt und befindet sich am C-Terminus des A β ₁₋₇-Peptids (A β -BM 1). B) Struktur von Gantenerumab (Koordinaten sind nicht verfügbar in der PDB) repräsentiert den A β -BM 2. Übernommen aus (Bohrmann *et al.*, 2012). Aspartat 1 (D1) befindet sich in der Nähe des CDR3-*loop* (H3). Das A β -Peptid₁₋₁₁ liegt oberflächenexponiert vor. C) Struktur von Bapineuzumab (PDB: 4HIX): N-Terminus des A β ₁₋₆-Peptids liegt zwischen der Kontaktfläche von schwerer und leichter Kette. Histidin 6 (H6) stellt den C-Terminus des kurzen Peptids dar und ragt aus der Bindetasche heraus. Die Struktur von Bapineuzumab repräsentiert den A β -BM 4.

Tab. 1.3: Bisher veröffentlichte F_{ab}/A β -Strukturen

Antikörper	A β -Antigen	Fab/A β PDB code	K _D in nM (Monomer)	BM	Kernepitop	Referenz
PFA1	1-8 pE3-8	2IPU 3EYS	60-120 3000	1	₄ FRH ₆	Gardberg <i>et al.</i> 2007
PFA2	1-8 pE3-8	2ROW	160-280 12200	1	₄ FRH ₆	Gardberg <i>et al.</i> 2007
WO2	1-16, 1-28	3BKJ, 3BAE		1	₄ FRH ₆	Miles <i>et al.</i> 2008
12A11	1-7 1-40	3IFL 3IFN	8,4	1	₄ FRH ₆	Basi <i>et al.</i> 2010
12B4	1-7	3IFO	54,5	1	₄ FRH ₆	Basi <i>et al.</i> 2010
10D5	1-7	3IFP	24,5	1	₄ FRH ₆	Basi <i>et al.</i> 2010
Gantenerumab	1-11	-	0,6-17	2	<i>D</i> ₁ ₄ FRH ₆ Y ₁₀	Bohrmann 2012
Aducanumab	1-11	-	-	3	₃ EFRH ₆	Bussiere <i>et al.</i> , 2014 WO/2014/089500
Bapineuzumab	1-28 1-10	4HIX	2,1	4	₁ DAEFR ₅	Miles <i>et al.</i> 2013 Feinberg <i>et al.</i> 2014
3D6	1-7 1-5 1-40	4ONF 4ONG	3-5	4	₁ DAEFR ₅	Feinberg <i>et al.</i> 2014 DeMattos <i>et al.</i> 2012 Feinberg <i>et al.</i> 2014
Ponezumab	17-40	3U0T	0.3	*	₃₀ AIIGLMVG GVV ₄₀	La Porte <i>et al.</i> 2012
Solanezumab	12-28	4XXD	0,004	*	K ₁₆ F ₁₉ F ₂₀ D ₂₃	Crespi <i>et al.</i> , 2015

BM = Bindungsmodus, kursiv markiertes Epitop: aufgrund von fehlenden Koordinaten nur vermutet.

* Solanezumab/Ponezumab bindet in der mittleren bzw. C-terminalen Region des A β -Peptids und kann daher nicht den vier N-terminalen A β -Bindungsmodi zugeordnet werden, da es einen unabhängigen BM darstellt.

Ebenfalls ist die Struktur des mit dem WO/2014/089500-Patent (Bussiere *et al.*, 2014) veröffentlichten A β -spezifischen Antikörpers Aducanumab nicht erreichbar. Allerdings wird beschrieben, dass das A β -Peptid in der Bindetasche eine ausgedehnte Struktur einnimmt, ähnlich des oben gezeigten Bindungsmodus 1 des 12A11-Antikörpers. Jedoch variiert das gebundene A β -Kernepitop leicht, da neben den Aminosäuren F4-H6 zusätzlich das Glutamat 3 des A β -Peptids in eine Einbuchtung zwischen LC und HC integriert, sodass man diese Bindung als A β -Bindungsmodus 3 deklarieren kann (Tab. 1.2).

Eine andere Struktur eines A β -spezifischen F_{ab}- Fragments wurde von Miles *et al.* 2013 veröffentlicht (Miles *et al.*, 2013). Diese Struktur des in der klinischen Phase bereits getesteten humanisierten AK Bapineuzumab (Tab.1.1) zeigt, dass der N-Terminus des A β -Peptids in der internen Kontaktfläche zwischen leichter und schwerer Kette eingeschlossen wird, sodass die Aminosäureseitenketten ₁DAEFR₅ das Epitop darstellen (A β -Bindungsmodus 4; Abb. 1.7C). Das nachfolgende Histidin 6 des A β -Peptids ragt aus der Bindetasche heraus und spielt eine geringere Rolle als in der Erkennung des A β -Peptids durch die Antikörper PFA1/PFA2, WO2, 12A11, Gantenerumab oder Aducanumab. Der N-Terminus des A β -Peptids selbst zeigt darüber hinaus eine helikale Struktur, beginnend mit dem Aspartat 1. Der murine Parentalantikörper (3D6)

des humanisierten AK Bapineuzumab, dessen $F_{ab}/A\beta$ -Struktur erst nachträglich 2014 veröffentlicht wurde, zeigt in seiner $A\beta$ -Bindungsregion die gleiche Ausrichtung der CDRs als auch des gebundenen kurzen $A\beta$ -Peptids (Feinberg *et al.*, 2014). So ist anzunehmen, dass die wichtigen Bindungsdeterminanten bereits schon in der Struktur des murinen Parentalantikörpers enthalten sind, die anschließend in den humanisierten AK übernommen werden. Die Strukturaufklärung der murinen Antikörper ist daher von großer Bedeutung und spielt eine zentrale Rolle in der Entwicklung von therapeutischen Antikörpern. Zusammenfassend wurden für die N-terminale Bindung bisher 4 verschiedene $A\beta$ -Bindungsmodi beschrieben.

1.6 $A\beta_{pE3}$ -spezifische Antikörper

Innerhalb der letzten 5 Jahre wurden verschiedene Antikörper gegen das $A\beta_{pE3}$ -Peptid entwickelt und in diversen Studien getestet. Zum Beispiel zeigte der AK 9D5 (siehe auch Abschnitt 1.2.3) in einer passiven Immunisierungsstudie gegen niedrig molekulare $A\beta_{pE3}$ - Oligomere in 5XFAD-Mäusen eine Verringerung der generellen *plaque*-Ablagerung und eine Abnahme des $A\beta_{pE3}$ -Gehalts sowie eine therapeutische Verbesserung der kognitiven Leistungen (Wirhth *et al.*, 2010).

Einem $A\beta_{pE3}$ -spezifischen AK, welcher nur *plaque*-gebundenes $A\beta_{pE3-42}$ erkennt, stellt der mE8-AK dar. Dieser zeigte nach Behandlung von transgenen PDAPP-Mäusen eine Verringerung der $A\beta$ -*plaques* ohne Nebenwirkungen (DeMattos *et al.* 2012), allerdings nur in einer therapeutischen Anwendung und nicht in einer vorbeugenden Studie. Im Mai 2013 startete Eli Lilly eine Phase-1-Studie mit 100 Patienten, welche milde kognitive Beeinträchtigungen als auch Alzheimer Erkrankung aufwiesen. Die Teilnehmer zeigten nach mE8-Behandlung einen positiven amyloiden Florbetapir-PET-Scan, welcher mit der Abnahme von amyloiden Ablagerungen einhergeht (Tab.1.2). Die Studie ist allerdings bis heute noch nicht beendet (<https://clinicaltrials.gov>). Ebenfalls wurde bei der *Alzheimer's Association International Conference* in Kopenhagen 2014 von Eli Lilly bekannt gegeben, dass eine gleichzeitige Behandlung von Mäusen mit dem $A\beta_{pE3}$ -spezifischen AK me8 und einem β -Sekretase-BACE 1-Inhibitor zur Reduktion von kompakten und diffusen Plaques führt, wobei angenommen wird, dass ein synergistischer Effekt durch die Verwendung solch einer kombinatorischen Therapie auftritt (www.alzforum.org).

Ein weiterer $A\beta_{pE3}$ -spezifischer AK (mAb07/1), welcher *in vitro* sowohl monomeres, oligomeres und fibrilläres $A\beta_{pE3}$ erkennt, wurde bereits in einer Pilotstudie in einer AD-transgenen Mauslinie (APP^{swe}/PS1 Δ E9) präventiv und therapeutisch getestet (Frost *et al.*, 2012). In dieser Studie wurden die Mäuse in einem Alter von 5,8 - 13,8 Monaten, in der die $A\beta$ -Ablagerung erst beginnt, zunächst präventiv wöchentlich mit dem AK immunisiert. Nach dieser präventiven Behandlung war der $A\beta_{pE3}$ - als auch der generelle $A\beta$ -Gehalt und die fibrillären amyloiden Ablagerungen im Cortex, Hippocampus und Cerebellum reduziert, was dafür spricht, dass das $A\beta_{pE3}$ -Peptid an der Aggregation und/oder der Ablagerung von multiplen $A\beta$ -Spezies beteiligt sein könnte. Gleiche

Ergebnisse wurden auch in einer therapeutischen Anwendung erzielt. Man kann daher annehmen, dass der AK sein *target* bereits vor der A β -Ablagerung im Gehirn als auch mit fortschreitendem Krankheitsbild detektiert. Er muss also in der Lage sein, sowohl lösliches als auch abgelagertes A β_{pE3} -Peptid zu binden.

1.7 Zielstellung der Arbeit

Die bisher dargelegten Ergebnissen aus *in vitro* und *in vivo* Studien zeigen, dass A β_{pE3} eine ausschlaggebende Rolle in der Entstehung von AD haben muss, sodass dieses modifizierte A β -Peptid als vielversprechendes therapeutisches *target* genutzt werden könnte. Die bisher durchgeführten immuntherapeutischen Studien gegen dieses *target* beschränken sich bisher auf Arbeiten mit transgenen AD-Mäusen als auch einer beginnenden Phase 1 Studie an 100 Patienten in Behandlung mit dem humanisierten A β_{pE3} -Antikörpers LY3002813 von Eli Lilly. Allerdings konnten erste Erfolge des A β_{pE3} -spezifischen AK ohne das Auftreten von Nebenwirkungen dort bereits demonstriert werden (siehe Abschnitt 1.6). Strukturelle Eigenschaften dieser Art der spezifischen N-terminalen A β -Bindung sind bisher noch völlig ungeklärt, lediglich die N-terminale Bindung des A β_{1-x} konnte in vier verschiedenen Bindungsmodi gezeigt werden (siehe Abschnitt 1.5). Da die A β -Immunotherapie im Moment noch eine der vielversprechendsten Methoden für die Behandlung der Alzheimer Erkrankung darstellt, ist die Erforschung der AK/A β -Bindungen ein wichtiger Punkt für die Entwicklung von therapeutischen Antikörpern geworden.

Im Vorfeld der Arbeiten wurden von der Probiodrug AG drei verschiedene Hybridomklone selektiert, die murine A β_{pE3} -spezifischen AK sekretieren. Bei einem dieser AK handelt es sich dabei um den bereits von Frost *et al.* 2012 getesteten mAb07/1, der in der folgenden Arbeit als Antikörper c#6 bezeichnet wird. Dieser AK lag für die experimentellen Analysen bereits in gereinigter Form vor, währenddessen die Genotypisierung und Expression der AK-Gene von AK c#24 und c#17 als auch deren Proteinreinigung eine beginnende Aufgabe dieser Arbeit darstellt. Mittels Oberflächenplasmonresonanz sollen zunächst die Affinitäten der drei AK bestimmt und untereinander verglichen werden, wobei das Assoziations- und Dissoziationsverhalten des A β_{pE3} -Peptids untersucht werden soll. Zur Aufklärung des Bindungsmodus sollen mittels Röntgenkristallografie die Strukturen der F_{ab}-Fragmente im Komplex mit ihren A β_{pE3} -Bindungspartnern analysiert werden. Darüber hinaus stellt ein weiteres Ziel dieser Arbeit die funktionelle Analyse der AK dar. Dazu soll in einem konzentrationsabhängigen Thioflavin T-Fluoreszenz-Assay der Einfluss der AK auf die A β -Fibrillenbildung getestet und mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie die Morphologie der Fibrillen mit Zugabe der AK untersucht werden.

Mit Hilfe der Analyse der thermodynamischen Bindungseigenschaften und der Aufklärung der strukturellen Merkmale drei verschiedener $A\beta_{pE3}$ -spezifischen AK im Komplex mit ihrem Liganden ist es möglich, die molekularen Besonderheiten verschiedener Bindungsmodi zu betrachten. Ebenfalls könnten die strukturellen Daten genutzt werden, um den Mechanismus der $A\beta_{pE3}$ -Bindung zu verstehen und darüber hinaus Bindungsdeterminanten zu identifizieren, die für das Struktur-basierte Design eines therapeutischen humanisierten Antikörpers in der $A\beta$ -Immuntherapie von Bedeutung ist.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien- und Materialverzeichnis

2.1.1 Chemikalien

Tab. 2.1: Chemikalien

chemische Substanz	Hersteller
Acrylamid/Bisacrylamid; Rotiphorese 30	Roth (Karlsruhe)
Agar-Agar	Roth (Karlsruhe)
Agarose	PEQlab (Erlangen)
APS	Roth (Karlsruhe)
Bromphenolblau	Serva (Heidelberg)
Coomassie Brillant Blau G 250	Roth (Karlsruhe)
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich (Schnelldorf)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (Schnelldorf)
Essigsäure	Roth (Karlsruhe)
Ethanol >99,9%	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid-Lösung 1 %	Roth (Karlsruhe)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	ICN (Aurora, USA)
L-Glutamin	Invitrogen (Karlsruhe)
Glycerol	Roth (Karlsruhe)
Glycin	Roth (Karlsruhe)
HEPES	Roth (Karlsruhe)
Kaliumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
Kaliumhydroxid	Roth (Karlsruhe)
Kaliumsulfat	Roth (Karlsruhe)
Magermilchpulver	Roth (Karlsruhe)
Magnesiumchlorid	Merck (Darmstadt)
Magnesiumsulfat	Roth (Karlsruhe)
Methanol	Roth (Karlsruhe)
s-Mercaptoethanol 98 %	Sigma-Aldrich (Schnelldorf)
Natriumchlorid	AppliChem (Darmstadt)
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat	Roth (Karlsruhe)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe)
Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydroxid	Roth (Karlsruhe)
TEMED	Roth (Karlsruhe)
Pepton	Duchefa (Haarlem, Niederlande)
Phosphorsäure	Sigma-Aldrich (Schnelldorf)
Ponceau-S	Merck, Darmstadt
Salzsäure 37 %	Roth (Karlsruhe)
Tris	Roth (Karlsruhe)
Tween 20	Roth (Karlsruhe)

2.1.2 Kits

<i>CloneJet™ PCR Cloning Kit</i>	Fermentas (St. Leon-Roth)
<i>GeneJET™ Plasmid Mini Prep Kit</i>	Fermentas (St. Leon-Roth)
<i>JETQUICK PCR Product Purification Spin Kit 50</i>	Genomed (Lohne)
<i>NucleoSpin® RNA II Purification Kit</i>	Macherey Nagel (Duren)

Amine Coupling Kit GE Healthcare (München)
IsoStrip Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit Roche

Kristallisations-*screening*-Kits

für das initiale *screening*:

Hampton Research
 Molecular Dimension Morpheus™
 Sigma Crystallization Basic Kit
 Sigma Crystallization Extension Kit
 Sigma Crystallization Low Ionic Strength Kit
 Sigma Crystallization Cryo Kit
 Jena Bioscience JBScreen classic
 Jena Bioscience JBScreen JCSG ++

Kristallisations-Additiv-Screening-Kit

Hampton Research

2.1.3 Standards

PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder Fermentas (St. Leon-Roth)
PEQlab DNA-Ladder Plus (100 bp) PEQlab (Erlangen)

2.1.4 Peptide

Alle in den Bindungsstudien verwendeten C-terminal verkürzten humanen A β -Peptide (A β ₁₋₁₈, A β ₂₋₁₈, A β ₃₋₁₈, A β _{pE3-18}, A β ₄₋₁₈, A β _{pE3-18}D7A) als auch das murine A β -Peptid (mA β _{pE3-18}) und das im *dot blot* verwendeten volllängen A β -Peptide A β _{pE3-40} wurden von der Firma Probiodrug synthetisiert. Die Synthese der Peptide wurde durch das standardisierte Verfahren, der sogenannten *fmoc solid phase peptide synthesis*-Methode, hergestellt (Chan & White, 2000). Dazu wurden die Peptide in einem 60 μ mol-Ansatz an Biotin-PEG-Novatag™ oder Rink-Amid-Harz (Merck Millipore) synthetisiert. Die Synthese wurde an einem vollautomatischen Symphony Synthesizer (Rainin) durchgeführt. Fmoc-Aminosäuren wurden durch Zugabe einer äquimolaren Menge von TBTU/NMM in DMF aktiviert. Die Fmoc-Entschützung wurde mit 20 % Piperidin in DMF vorgenommen. Abspaltung des Harzes und Entfernung aller Seitenkettenschutzgruppen wurde durch die Inkubation mit einem Mix aus TFA/EDT/TIS/dH₂O (94:2.5:2.5:1) für 4 h erreicht. Die Peptide wurden durch die Zugabe von kaltem Diethylether gefällt. Die Rohpeptide wurden durch Filtration, Lösen in Acetonitril/Wasser und anschließende Reinigung durch präparative

HPLC (Acetonitril/dH₂O-Gradient; Phenomenex Luna C(18) Säule) gereinigt. Die Reinheit und Identität der Peptide wurde durch analytische HPLC und MALDI-MS überprüft.

Die volllängigen A β -Peptide A β ₁₋₄₂ und A β _{pE3-42}, welche in den Fibrillierungsstudien im ThT-Assay verwendet wurden, wurden bei der Firma Bachem bestellt.

2.1.5 Enzyme und dafür benötigte Lösungen

dNTP-Mix Promega	(Mannheim)
DTT (0,1 M)	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
<i>First strand buffer</i> (5 x) Invitrogen	(Groningen, Niederlande)
Ligationspuffer Fermentas	(ST. Leon-Roth)
<i>Phusion</i> DNA-Polymerase (2 U/ μ l)	New England Biolabs (Schwalbach)
<i>Phusion</i> HF-Puffer (5 x)	New England Biolabs (Schwalbach)
Reaktionspuffer für Ligation (2 x)	Fermentas (St. Leon-Roth)
SuperScript™ III Reverse Transkriptase	Invitrogen (Karlsruhe)
T4 DNA-Ligase (3 U/ μ l)	Fermentas (St. Leon-Roth)

2.1.6 *E. coli*-Stämme und Zellen

<i>E. coli</i> (DH5 α)	Invitrogen (Karlsruhe)
Hybridomazellen	Probiodrug AG (Halle, Saale) in Kooperation mit BioGENES GmbH (Berlin)

2.1.7 Plasmide

pJET1.2/ <i>blunt Cloning Vector</i>	Fermentas
--------------------------------------	-----------

2.1.8 Oligonukleotide

2.1.8.1 Oligo (dT)-Primer für die cDNA-Synthese

Der für die cDNA-Synthese verwendete Oligo (dT)-Primer stammte von der Firma Invitrogen (Karlsruhe). Oligo (dT)-Primer: 5`-TTTTTTTTTTTTTTTT-3`

2.1.8.2. Primer für die Amplifikation der Antikörperketten-DNA-Sequenz

Die Primer für die Amplifikation der DNA-Sequenz der leichten und schweren Antikörperkette (Tab. 2.2) stammen von der Firma Metabion (Martinsried)

Tab. 2.2: Primerbibliothek zur Amplifikation der Antikörperketten-DNA-Sequenz

Antikörperkette	Primername	Sequenz
forward-Primer Lv 5'	MKV1	ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTG
	MKV2	ATGGAGWCAGACACACTCTGYTATGGGTG
	MKV3	ATGAGTGTGCTCACTCAGGTCCTGGSGTTG
	MKV4	ATGAGGRCCCCTGCTCAGWTTYTTGGMWTCTTG
	MKV5	ATGGATTTWCAGGTGCAGATTWTCAGCTTC
	MKV6	ATGAGGTKCYTGYTSAGYTYCTGRGG
	MKV7	ATGGGCWTCAAGATGGAGTCACAKWYYCWGG
	MKV8	ATGTGGGGAYCTKTTTTYMMTTTTTCAATTG
	MKV9	ATGGTRTCCWCASCTCAGTTCCTTG
	MKV10	ATGTATATATGTTTGTTCATTTCT
	MKV11	ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCC
reverse-Primer Lc 3'	MKC	ACTGGATGGTGGGAAGATGG
forward-Primer Hv 5'	MHV1	ATGAAATGCAGCTGGGGCATSTTCTTC
	MHV2	ATGGGATGGAGCTRTATCATSYTCTT
	MHV3	ATGAAGWTGTGGTTAAACTGGGTTTTT
	MHV4	ATGRACTTTGGGYTCAGCTTGRTTT
	MHV5	ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCTT
	MHV6	ATGGCTTGTCYTRGSGCTRCTTCTG
	MHV7	ATGGRATGGAGCKGGRTCTTMTCTT
	MHV8	ATGAGAGTGCTGATTCTTTTTGTG
	MHV9	ATGGMTTGGGTGTGGAMCTTGCTATTCCTG
	MHV10	ATGGGCAGACTTACATTCTCATTCTG
	MHV11	ATGGATTTTGGGCTGATTTTTTTTATTG
	MHV12	ATGATGGTGTAAAGTCTTCTGTACCTG
reverse-Primer Hc 3'	MHCG1	CAGTGGATAGACAGATGGGGG
MHCG2a	CAGTGGATAGACCGATGGGGC	
MHCG2b	CAGTGGATAGACTGATGGGGG	
MHCG3	CAAGGGATAGACAGATGGGGC	

Modifizierte Basenpaarung: **R** = A oder G; **Y** = C oder T; **S** = C oder T; **W** = A oder T; **K** = G oder T; **M** = A oder C

2.1.8.3. pJet1.2-Sequenzierungsprimer

Die zur Sequenzierung des Inserts in pJet1.2 verwendeten Primer stammten von GATC (Köln). pJet 5`seq: 5`-ACTGCTTTAACACTTGTGCCTGAACAC-3`

pJet 3`seq: 5`-ACGGTTCCTGATGAGGTGGTTAGC-3`

2.1.9 Medien und Zusätze für die Zellkultur

DMEM⁺-Medium:

DMEM/F-12

+ 15 % (v/v) FBS *Ultra-Low* IgG

+ 0,06 mg/ml Gentamycin

+ 1 % MEM-NEAA

DMEM/F-12

Invitrogen (Karlsruhe)

besteht unter anderem aus 0.5 mM NaHCO₃; 2,5 mM L-Glutamin; 17,5 mM D-Glukose, Vitaminen und Aminosäuren. Die genaue Zusammensetzung ist auch unter <http://www.lifetechnologies.com/de/de/home/technical-resources/media-formulation.55.html> nachzulesen.

FBS *Ultra-Low IgG* (Invitrogen (Karlsruhe):

Zusammensetzung nicht bekannt, besitzt allerdings eine Reihe an wichtige Wachstumsfaktoren. Der IgG-Gehalt ist < 0,1 µg/ml

Gentamycin

Invitrogen (Karlsruhe)

H –SFM⁺

H-SFM
+ 0,06 mg/ml Gentamycin

H –SFM

Invitrogen (Karlsruhe)
Besteht aus < 25 µg/ml Gesamtprotein und enthält bereits 4 mM L-Glutamin. Zugabe von FBS ist nicht notwendig.

LB-Medium:

1% (w/v) Pepton
0,5% (w/v) Hefeextrakt
0,5% (w/v) NaCl

LB-Agar-Amp-Platten:

LB-Medium
+ 1% (w/v) Agar
+ 100 µg/ml Ampicillin

L-Glutamin

Invitrogen (Karlsruhe)

MEM-NEAA

Invitrogen (Karlsruhe)

2.1.10 Kommerziell-erhältliche Puffer

Casy®-Ton

Schärfe System (Reutlingen)

HBS-EP

(10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl,
3 mM EDTA, 0,005% v/v Surfactant P20)
Biacore (Freiburg)

2.1.11 Lösungen und Puffer

2.1.11.1 dot blot

Blockierungslösung:

5% Milchpulver in TBST

Ponceau-S-Lösung:

48 mM Tris-Base 0,5% (w/v) Ponceau-S
39 mM Glycin 1% (v/v) Essigsäure

TBST:	150 mM	NaCl
	20 mM	Tris (pH 7,8)
	6,7 μ M	KCl
	0,05 %	Tween 20

<i>goat-anti-mouse-IgG</i> -HRP (sc-2005)	Santa Cruz
Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (ECL1 & 2)	Thermo Scientific

2.1.11.2 modifizierte Puffer bei der Oberflächenplasmonresonanz-Methode

HBS-EP+T20:	10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,05% v/v Tween20
HBS-EP+NaCl:	10 mM HEPES pH 7.4, 500 mM NaCl , 3 mM EDTA, 0,005% v/v Tween20

2.1.11.3 ThT-Fluoreszenz-Assay

Phosphatpuffer:	50 mM Na ₂ HPO ₄ , 150 mM NaCl, pH8
80 μ M Thioflavin T- (ThT) Stammlösung :	Sigma-Aldrich , gelöst in Phosphatpuffer
100 % 1,1,3,3,3-hexafluoro-2-isopropanol (HFIP):	Sigma-Aldrich
geschwärzte 96-well Assay Mikroplatten mit durchsichtigem Boden	Costa®, Nr. 3631

2.1.11.4 Transmissions-Elektronenmikroskopie

Uranylacetat	1 % (w/v)
Formvar-bedeckte Kupfer- <i>grids</i>	Plano GmbH (Wetzlar)

2.1.12 Geräte und Zubehör

Tab. 2.3: Geräte und Zubehör

Gerät	Typ und Hersteller
AKTA™purifier	GE Healthcare (München)
Biacore 3000	Biacore (Freiburg)
Biacore Zubehör	CM5-Sensorchop (GE Healthcare , München)
Casy® Zellzähler	Schärfe System (Reutlingen)
Chromatographiesäulen	Superdex75, Amersham Biosciences (Freiburg) Protein G-Säule 5 ml, GE Healthcare (München) Protein G-Säule 1 ml, GE Healthcare (München)
CO2-Inkubator	IR Sensor MCO 18 AIC Sanyo (Bad Nenndorf) mit <i>Orbital Shaker</i>
Dialysemembran	Sectra/Por MWCO 6-8000 Da Spectrumbioscience (Breda, Niederlande) Dialyseschlauche <i>Visking Cellulose</i> MWCO 14 kDa, Roth (Karlsruhe)
Elektronenmikroskopie	Zeiss LIBRA 120, Carl Zeiss Microscopy GmbH
Elektrophoreseapparaturen	Agarose-Elektrophoresekammer, OWL Separation Systems (Rochester, USA) Elektrophoresenetzgerät <i>PowerPac Basic</i> Bio-Rad (München) SDS-Elektrophoresekammer Bio-Rad (München) Elektrophoresenetzgerät EPS 301 Amersham Pharmacia Biotech (Nümbrecht)
Flourometer	NOVOstar Microplate Reader, BMG labtech
Fusion Fx7	PeqLab Biotechnologie GmbH
Mini-Inkubator	GFL
pH-Meter	inoLab pH 720, WTW (Weilheim)
Pipettierroboter	Mycrosys SQ, Cartesian
Röntgenanlage	Zinsser-Analytik, Frankfurt/M MicroMax 007 Generator, Rigaku Osmic Spiegeloptik, Rigaku Saturn 944 CCD Detektor, Rigaku
Schüttelkolben	125 ml Corning Incorporated (Corning, USA)
Spektralphotometer NanoDrop™ 2000	Thermo Scientific (Rockford, USA)
Spektralphotometer	Specord S600, Analytic Jena
VP-ITC MicroCalorimeter	MicroCal (Northampton, USA)
Zellkulturflaschen	T-Flaschen 25, 75, 175 und TPP (Trasadingen, Schweiz)
Zentrifugalkonzentratoren	Vivaspin 500 (MWCO 5.000 PES), Sartorius U-Tube™ Concentrator , Calbiochem 6-10, 10 kDa cut off
Zentrifugen	Kühlzentrifuge Allegra™ X-22R, Zentrifugenrotor SX 4250, Beckman Coulter (Krefeld) Kühlzentrifugen Avanti™ J-20 und J-30I , Zentrifugenrotor JLA 16.250, Beckman (München) Zentrifuge Allegra™ 21, Zentrifugenrotor S 4180, Beckman Coulter (Krefeld)

2.1.13 Software

BIAevaluation	Biacore (Freiburg)
CCP4 Program Suite 6.4.0	
ExPASy	Swiss Institute of Bioinformatics (Lausanne, Schweiz)
Microcal	Microcal LLC (USA)
Origin 7.0	OriginLab (Northampton, USA)
PyMOL	Schrödinger (Mannheim)
WinCOOT Version 0.7	

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Ermittlung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mithilfe des Casy® Zellzähler unter Verwendung des Casy®-Ton Puffers durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit einer Dichte von $\sim 2 - 3 \times 10^6$ Zellen/ml zunächst bei 300 x g für 5 Minuten (Zentrifuge Allegra™ 21) herunter zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Zellen wurden in 10 ml vorgewärmtes Medium (37°C) aufgenommen und 100 µl davon für die Zellzahlbestimmung entnommen. Diese wurden 1:10 mit Medium verdünnt und 100 µl dieser Verdünnung anschließend mit 9900 µl Casy®-Ton Puffers versetzt. Die Ermittlung der Zellzahl mittels Casy® Zellzähler erfolgt über die zu vorige Bestimmung der Zellgröße von 6 - 9,5 µm. Dabei wurde die Gesamtzellzahl, als auch tote und lebendige Zellen unterscheiden. Zum erneuten Einsäen der Hybridomazellen wurden nur die lebenden Zellen berücksichtigt.

2.2.1.2 Kultivierung von Hybridomazellen

Niedermolekulare Peptide sind oftmals nur wenig immunogen, sodass die Kopplung eines Trägerproteins am C-Terminus über ein angefügtes Cystein notwendig ist. Aus diesem Grund wurde an das Antigen mit zusätzlichem C-terminalen Cystein (pEFRHDS-C) über dessen freie SH-Gruppe das immunogene Trägerprotein *keyhole limpet hemocyanin* (KLH) gekoppelt. pE-A β -spezifische Antikörper wurden durch die Immunisierung weiblicher BALB/c-Mäuse mit einem Hexapeptid pEFRHDS, konjugiert mit KLH, gewonnen (BioGenes GmbH). Die Generierung der Antikörper-produzierenden Hybridoma-Klone wurde durch die Fusion von Milzzellen der immunisierten Maus mit der Myelomzelllinie SP2/0 erreicht. Die Überstände der Hybridoma-Primärkulturen wurden anschließend bezüglich ihrer Fähigkeit zur Bindung an das A β _{pE3-40} mittels Oberflächenplasmonresonanz (siehe 2.2.4.1) getestet.

Hybridomazellen wurden alle 3 bis 4 Tage umgesetzt, wobei sie eine Zelldichte von $2 \times 10^6 - 3 \times 10^6$ Zellen/ml besaßen. Dazu wurden die nur locker sitzenden Zellen vom Boden abgeklopft und in ein 50 ml Falcon überführt, in denen sie dann anschließend per Zentrifugation für 300 g und 5 Minuten (Zentrifuge Allegra™ 21) vom Überstand getrennt wurden. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen in 10 ml vorgewärmtes DMEM⁺-Medium aufgenommen und die Zellzahl ermittelt (siehe 2.2.1.1). Anschließend wurden sie zu einer Konzentration von 0.5×10^6 Zellen/ml in einem Gesamtvolumen von 20 ml DMEM⁺-Medium in 75 cm², 40 ml DMEM⁺-Medium in 175 cm² oder 80 ml DMEM⁺-Medium in 300 cm² Suspensionsflaschen eingesät. Zusätzlich wurde den nichtadaptierten Zellen frisch aufgetautes L-Glutamin mit der Endkonzentration von 4 mM zugesetzt. Die Zellen wurden im Anschluss bei 37 °C und 5 % CO₂-Sättigung im CO₂-Inkubator gehalten.

2.2.1.3 Expression von A β_{pE3} -spezifischen Antikörpergenen

Die Expression erfolgte über die Kultivierung der Hybridomazellen in Schüttelkolben. Dazu wurden die Zellen zu 0.5×10^6 Zellen/ml in einem Gesamtvolumen von 150 ml Medium in 500 ml-Schüttelkolben oder 300 ml Medium in 1000 ml-Schüttelkolben eingesät und für 6 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂-Sättigung im CO₂-Inkubator bei 80 rpm geschüttelt. Den nichtadaptierten Zellen wurde dabei frisch aufgetautes L-Glutamin mit einer Endkonzentration von 4 mM zu Beginn der Expression zugesetzt. Durch Zentrifugation bei 300 x g für 5 Minuten (Zentrifuge Allegra™ 21) wurde der Überstand geerntet. Die Kultivierung der Zellen wurde solange weitergeführt bis ein Volumen von 1-2 L Zellkulturüberstand erreicht wurde. Anschließend wurde mit der Reinigung der A β_{pE3} -spezifischen Antikörper aus dem Zellkulturüberstand begonnen.

2.2.1.4 Adaption von AK-produzierenden Hybridomazellen an serumfreies Medium

Die AK-produzierenden Hybridomazellen wurden zunächst in DMEM mit fötalem Kälberserum (FBS *low* IgG) kultiviert. Der FBS-Zusatz ist für das Wachstum von nicht-adaptierten Hybridomazellen notwendig, da sich in ihm eine Anzahl von Wachstumsfaktoren befindet. Die Präsenz von FBS-haltigen Proteinen wie BSA störte die Reinigung der produzierten AK nicht (siehe Anhang, Abb. 6.1A), allerdings ist es möglich, dass ein geringer Anteil an bovinen IgG-Molekülen im verwendeten FBS die Produktion an A β_{pE3} -spezifischen AK kontaminiert. Deshalb sollten die AK-produzierenden Hybridomazellen zunächst an serumfreies Medium adaptiert werden. Die Adaption der Hybridomazellen fand über eine schrittweise Gewöhnung der Zellen an serumfreies Hybridomamedium (H-SFM) statt. Zunächst wurden die Zellen mit 25 % H-SFM und 75 % DMEM⁺ kultiviert und anschließend der H-SFM-Gehalt auf 50 %, 75 % und schlussendlich auf 100 % SFM erhöht. Dabei wurden die Zellen mit jeder Mediumsveränderung mindestens zwei Passagen mit einer Dichte von 0.5×10^6 Zellen/ml in einem Gesamtvolumen von 20 ml in 75 cm² Suspensionsflaschen kultiviert, um sich an die neuen Gegebenheiten anzupassen. Die Menge an zugeführtem L-Glutamin nahm mit Zunahme des H-SFM ab (3 mM in 25% H-SFM, 2 mM in 50 % H-SFM, 1 mM in 75 % H-SFM), da sich im H-SFM bereits 4 mM L-Glutamin befindet.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 RNA-Isolation und cDNA-Synthese der murinen Antikörper

Von jeder Hybridomazelllinie wurden 5×10^6 Zellen bei 300 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 350 μ l RA1 Puffer des *Nucleo Spin*® *RNA II Kit* (Macherey-Nagel) aufgenommen und die RNA nach Herstellerangaben isoliert. Nach DNase1 Behandlung wurde die RNA von der Säule eluiert durch zweimaliges Waschen mit 40 μ l RNase freiem ddH₂O. 1 μ l RNA (~700 ng/ μ l) wurden zunächst mit 1 μ l oligo dT-Primer (10 μ M) and 1 μ l dNTPs (10 mM) bei 65°C für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 4 μ l 5x *first strand buffer* (Invitrogen), 2 μ l 100 mM DTT (Invitrogen), 0,5 μ l *SuperScriptIII Reverse Transkriptase* (Invitrogen) und 1,5 μ l ddH₂O zugefügt und die cDNA durch die Inkubation von 5 min bei 25 °C, 50 min bei 50 °C und 15 min bei 70 °C gewonnen.

2.2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifikation der Nukleotidsequenz der murinen leichten und schweren Antikörperkette von c#17 und c#24

1 μ l cDNA wurde als *template* mit 5 μ l 10x Pfu-Polymerase Puffer (Promega), 1 μ l dNTPs (10 mM), 1,5 μ l *forward*-Primer (10 μ M), 1,5 μ l *reverse*-Primer (10 μ M) und 0,5 μ l PFU-Polymerase (2-3 U/ μ l, Promega) in einem Gesamtvolumen von 50 μ l ddH₂O verwendet. Die 5' variablen *forward*-Primer für die Amplifikation der Sequenz für die leichte Kette und die schwere Kette, sowie die *reverse*-Primer sind in Tabelle 2.1 (2.1.10.2) aufgelistet.

Die DNA-Amplifikation wurde durch die Verwendung eines PCR-cyclers (Eppendorf) mit folgendem Programm (siehe Tab. 2.4) gewonnen.

Tab. 2.4: PCR-Programm zur DNA Amplifikation

Anzahl der Zyklen	Reaktionsschritt	Dauer	Temperatur
1	Denaturierung	2 min	95 °C
	Denaturierung	1 min	95 °C
30	Primer-Anlagerung	30 s	50 °C
	Replikation	2 min	72 °C
1	finale Verlängerung	5 min	72 °C

Die Länge der amplifizierten DNA wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Ein Produkt in Verwendung der cDNA des Hybridomaklons 24 entstand mit der Kombination der Primer-Paare MKV1/MKC, welche an die Sequenzen der LC binden und MHV7/MHCG1, die für die Amplifikation der Sequenz der HC notwendig sind. Ein Produkt in Verwendung der cDNA des Hybridomaklons 17 entstand ebenfalls mit der Kombination der Primer-Paare MKV1/MKC für die

Amplifikation der LC-Nukleotidsequenz und MHV4/MHCG2b für die Amplifikation der HC-Nukleotidsequenz. Die DNA-Sequenzen sind im Anhang (siehe Anhang, Abschnitt 6.2) hinterlegt. Um die PCR-Fragmente von der *template*-cDNA zu separieren, wurden die beiden Ansätze separat auf ein 1% Agarosegel geladen und aus dem Gel eluiert.

2.2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Desoxyribonukleinsäuren nach ihrer Größe wurde die Agarosegelelektrophorese eingesetzt. Zur Herstellung der Agarosegele (0,8 -1 %) wurde die entsprechende Menge in 70 ml 1x TAE-Puffer (40 mM Tris/HCl pH 8,0; 61,2 mM Essigsäure; 1 mM EDTA) durch Aufkochen gelöst. Zur Detektion der DNA-Banden wurden anschließend Ethidiumbromid mit einer Endkonzentration von 0,6 µg/µl zugegeben. Die Proben wurden in 1x Agarose-Ladepuffer (*Loading Dye* von Fermentas) aufgenommen und anschließend mittels Elektrophorese bei 120 V für 30 min in 1x TAE-Puffer aufgetrennt. Die Detektion der Banden erfolgte unter UV-Strahlung. Die Banden mit einer ungefähren Größe von 450 bp wurden aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA aus dem Gel mittels Gelelution gewonnen.

2.2.2.4 Gelelution

Die Gelelution wurden nach Herstellerangaben mittels des Gelelutions-Kits (*JETQUICK PCR Product Purification Spin Kit 50* von Genomed) durchgeführt und die gebundene DNA in einem Volumen von 50 µl ddH₂O eluiert.

2.2.2.5 Ligation der amplifizierten DNA-Fragmente in den pJET1.2-Vektor

Die aus der PCR-amplifizierte und anschließend aufgereinigte DNA wurde unter Verwendung des *CloneJet™ PCR Cloning Kit blunt-end* in den pJET1.2-Vektor ligiert. Dazu wurden zu 3 µl gereinigter DNA, 10 µl 2x Reaktionspuffer, 5 µl Nuklease-freies Wasser, 1 µl pJET1.2 Vektor (50 ng/µl) und 1 µl T4 DNA-Ligase gegeben und für 10 min bei RT inkubiert.

2.2.2.6 Chemotransformation

50 µl chemokompetente DH5α-Zellen wurden mit 100 ng Plasmid versetzt. Die Probe wurde für 30 min auf Eis, anschließend für 45 s bei 42 °C und abermals für 2 min auf Eis inkubiert. In Folge wurden 400 µl LB-Medium dazu gegeben und je 50 µl auf LB-Agar-Platten mit 100 µg/µl Ampicillin ausplattiert. Nach 16 h Inkubation bei 37 °C wurden einzelne Kolonien gepickt und zum Animpfen von 3 ml LB-Medium mit 100 µg/µl Ampicillin verwendet. Im Anschluss wurden die Kulturen erneut für 16 h bei 37 °C inkubiert.

2.2.2.7 Kolonie-PCR

5 µl 5x *Go Taq* Puffer wurden mit 1 µl dNTPs (10 mM), 1 µl *forward*-Primer (10 µM), 1 µl *reverse*-Primer (10 µM) und 0,25 µl *Go Taq* DNA-Polymerase (5 U/µl) in einem Gesamtvolumen von 25 µl pipettiert. Anschließend wurden einzelne Kolonien gepickt und dem vorgelegten PCR-Mix zugeführt. Mittels eines PCR Programms von 1 Zyklus Denaturierung bei 95 °C für 2 min, 30 Zyklen Denaturierung bei 95 °C für 30 s, Primer-Anlagerung bei 59 °C für 30 s, Replikation bei 72°C für 1,5 min - und 1 Zyklus finale Verlängerung bei 72 °C für 5 min wurden die PCR-Fragmente generiert und anschließend mit Hilfe einer 1 % Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

2.2.2.8 Isolierung von Plasmid-DNA und DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Präparation von Plasmiden erfolgte nach Herstellerangaben des *GeneJET™ Plasmid Mini Prep Kits* (Fermentas) und die gereinigten Plasmide wurde in 50 µl ddH₂O aufgenommen. Die DNA wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm (Spektralphotometer NanoDrop™ 2000, Thermo Scientific) gemessen und die DNA-Konzentration mittels folgender Gleichung berechnet: $c_{DNA} = E_{260} \cdot A \cdot VF$. A entspricht dabei der Absorptionseinheit von 50 µg/ml für doppelsträngige DNA (bei einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm) und VF dem Verdünnungsfaktor.

2.2.2.9 DNA-Sequenzierung

Um das Insert der Plasmide zu sequenzieren, wurden 30 µl Plasmidlösung mit einer Konzentration von 50 ng/µl an die Firma GATC (Köln) gesendet. Mithilfe der Kettenabbruchmethode nach SANGER (Sanger *et al.*, 1977) konnte die DNA-Sequenz der variablen Region der schweren und leichten Kette der Aβ_{pE3}-spezifischen AK mit der Verwendung des pJet 5`seq – pJet 3`seq-Primer ermittelt werden.

2.2.2.10 Analyse der IgG-Unterklasse und der Genfamilie

Die konstanten Bereiche der schweren Ketten wurden anhand des *IsoStrip Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit* durch die Firma BioGenes GmbH (Berlin) einer Unterklasse der IgG-Antikörper zugeordnet. Um die Genfamilie der murinen Antikörper zu spezifizieren, wurden die einzelnen Aminosäuresequenzen mittels der *Immunogenetics* Bibliothek (<http://www.imgt.org/blast/>) untersucht.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Reinigung der monoklonalen Antikörper aus Überständen von Hybridomazellkulturen

Etwa 2 L Zellkulturüberstand wurde zunächst für 30 min bei 16000 rpm und 4 °C mittels der Kühlzentrifugen Avanti™ J-20 und J-30I zentrifugiert und der Überstand in einem Verhältnis von 1:1 mit Equilibrierungspuffer (40 mM Natriumphosphat, pH 7,0) versetzt. Zur Reinigung der monoklonalen Antikörper wurde das *Äkta Purifier System* und eine 5 ml Protein-G-Säule verwendet. Die Säule wurde zuerst mit 5 Säulenvolumen (SV) ddH₂O gespült und anschließend mit 5 SV Bindungspuffer (20 mM Natriumphosphat, pH 7,0) äquilibriert. Mit einer Flussgeschwindigkeit von 2 bis 4 ml/min wurde die Probe über eine Probenauftragspumpe auf die Säule geladen. Nach Beendigung des Probenauftrags erfolgte eine kurze weiterführende Behandlung mit Bindungspuffer, an die sich eine Waschphase (2 M NaCl, 40 mM Natriumphosphat, pH 7,0) mittels eines kontinuierlichen Gradienten bis zu 50 % des Puffers über 5 SV bei einem Fluss von 2,5 ml/min anschloss. Die anschließende Elution wurde mit Elutionpuffer (2 M KSCN, 40 mM Natriumphosphat, pH 7,0) über einen kontinuierlichen Gradienten bis zu 100 % des Puffers über 5 SV bei gleichbleibender Flussgeschwindigkeit durchgeführt. Die *peak*-Fraktionen wurden mittels SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert, die AK-enhaltenden Fraktionen vereinigt und die daraus resultierenden 20 bis 25 ml zweimal gegen 2 L PBS (138 mM NaCl, 8 mM Natriumphosphat, 1,5 mM Kaliumphosphat, 3 mM KCl, 2 mM EDTA, pH 7,13) mit Hilfe eines Dialyseschlauchs von der Firma Roth (MWCO 14 kDa) dialysiert. Abweichungen vom Protokoll sind im Ergebnisteil und Anhang speziell beschrieben.

2.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels UV/VIS-Spektroskopie

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte bei einer Absorption von 280 nm spektroskopisch. Mittels des Lambert-Beerschen Gesetzes kann aus der Absorption und dem Extinktionskoeffizienten die Konzentration berechnet werden.

$$E = \epsilon \cdot c \cdot d$$

E Absorption bei 280 nm

ϵ Extinktionskoeffizient bei 280 nm ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$)

c Proteinkonzentration (M)

d Schichtdicke der Probe (cm)

Für die Berechnung des Extinktionskoeffizienten wurde die Anzahl der aromatischen Aminosäuren des Proteins einbezogen (Pace *et al.*, 1995). Der mittels *Expassy*-Software

(<http://web.expasy.org/protparam/>) berechneten Extinktionskoeffizienten der einzelnen Antikörper und F_{ab}-Fragmente sowie deren separaten AK-Ketten sind in Tab. 2.5 gelistet. Ebenso wurden die Extinktionskoeffizienten der C-terminal verkürzten A β -Peptidvarianten, welche von der Firma Probiobdrug synthetisiert wurden, mit dieser Methode berechnet und sind aufgelistet.

Tab. 2.5: Molekulargewicht und Extinktionskoeffizienten der verwendeten Proteine/Peptide

Proteinname	MW Gesamtprotein in g/mol	MW LC in g/mol	MW HC bzw. F _d in g/mol	ϵ der LC in M ⁻¹ ·cm ⁻¹	ϵ der HC/F _d in M ⁻¹ ·cm ⁻¹	ϵ des Gesamtproteins in M ⁻¹ ·cm ⁻¹
c#6	146401,2	24146,0	49054,6	30160	83600	227520
F _{ab} c#6	48160,1	24146,0	24014,1	30160	49640	79800
c#24	144899,0	24109,9	48339,6	30160	83600	227520
F _{ab} c#24	47409,1	24109,9	23299,2	30160	49640	79800
c#17	148406,6	24054,7	50148,6	28670	81540	220420
F _{ab} c#17	48584,1	24054,7	24529,4	28670	48610	77280
	MW inclusive TFA	MW	TFA 114,02 g/mol			
A β ₁₋₁₈ Pbio	3279,06	2594,94	x6			1490
A β ₂₋₁₈ Pbio	3163,98	2479,86	x6			1490
A β ₃₋₁₈	2664,3	1980,18	x6			1490
A β _{pE3-12} Pbio	1875,85	1647,81	x2			1490
A β _{pE3-18}	2532,18	1962,08	x5			1490
A β ₄₋₁₈ Pbio	2963,72	2279,6	x6			1490
mA β _{pE3-18} Pbio	2750,1	2294,6	x4			-
A β _{pE3-18D7A}	2490,1	1920	x5			1490
A β _{pE3-40} *	4695,7	4125,6	x5			1490

m=murin

* Sequenz von A β _{pE3-40}: pEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV-OH

2.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Gelelektrophorese von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde nach LAEMMLI (Laemmli, 1970) durchgeführt. Zu analysierende Proben unter reduzierenden Bedingungen wurden mit 4-fach SDS-Probenpuffer (225 mM Tris/HCl pH 6,8; 4 % (w/v) SDS; 50 % (v/v) Glycerin; 0,5 % (w/v) Bromphenolblau; 1% (v/v) β -Mercaptoethanol) versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C aufgeköcht. Zu analysierende Proben unter nicht-reduzierenden Bedingungen wurden mit 5x SDS-Probenpuffer versetzt (225 mM Tris/HCl pH 6,8; 5 % (w/v) SDS; 50 % (v/v) Glycerin; 0,5 % (w/v) Bromphenolblau) ohne anschließendes Aufkochen.

Puffer für die SDS-PAGE:

Sammelgelpuffer: 1 M Tris/HCl pH 6,8

Trenngelpuffer: 1,5 M Tris/HCl pH 8,8

SDS-PAGE-Laufpuffer : 25 mM Tris/HCl pH 8,3; 0,1 % (w/v) SDS; 187 mM Glycin

Für die Auftrennung der Proteinproben wurden 12 % ige Polyacrylamidgele verwendet, die nach folgendem Schema (Tab. 2.6) pipettiert wurden.

Tab. 2.6: Zusammensetzung der 12% Polyacrylamidgele

Bestandteil	12 % Trenngel	5 %ige Sammelgel
ddH ₂ O	3,3 ml	2,1 ml
Trenngelpuffer	2,5 ml	-
Sammelgelpuffer	-	0,38 ml
30 % Acrylamid	4	0,5
10% (w/v) SDS	100 µl	30 µl
10%(w/v) APS	100 µl	30 µl
TEMED	10 µl	5 µl

Die Gele wurden bei einer Stromstärke von 28 mA (120 V) pro Gel für 1 Stunde laufen gelassen. Im Anschluss erfolgte eine Färbung mit Coomassie-Farbstoff unter Inkubation des Gels mit SDS-PAGE –Färbelösung (45 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau G 250) für 1h. Die Entfärbung wurde mit Entfärbelösung (45 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure) durchgeführt.

2.2.3.4 dot blot

Das lyophilisierten Peptid A β _{pE3-40} (synthetisiert von Probiodrug AG) wurden wie in 2.2.6.1 beschrieben zunächst in HFIP gelöst, aliquotiert, eingefroren und kurz vor der Verwendung erneut in 0.1 M NaOH gelöst und in Phosphatpuffer (50 mM Natriumphosphat, 150 mM NaCl, pH 8,0) aufgenommen. 1 µl Peptidkonzentrationen von 20 ng/µl wurden auf eine Nitrozellulose Membran (Whatman) gespottet (entspricht 4,85 µM). Nach Trocknung wurde die Membran mit Ponceau S-Lösung angefärbt und nach Entfärbung mit bidestilliertem Wasser (ddH₂O) diese mit 5% Milchpulver in TBST-Puffer für 30 Minuten inkubiert. Nach kurzem Waschen mit TBST-Puffer wurde die Membran mit 1.5 µg/ml primärem Antikörper (c#6, c#24, c#17 und MCP1) in 5 % Milchpulver-TBST-Puffer für eine Stunde behandelt. Anschließend wurde die Membran 3 x 5 Minuten mit TBST-Puffer gewaschen und mit dem in TBST 1:1000 verdünntem sekundären Antikörper (*goat-anti-mouse-IgG*-HRP, siehe Material) für 1 Stunde behandelt. Nach Zugabe eines ECL1/2-Mixes in einem Verhältnis von 1:1 zu der Membran wurde diese für 5 min inkubiert und die Signale unter Ausschluss von Licht mit Hilfe des Fusion Fx7 detektiert. Nach 1 min

Belichtungszeit wurde die Aufnahme gestoppt. Die Signale der Membran, die mit dem Kontrollantikörper behandelt wurde, wurde für 10 Minuten aufgenommen.

2.2.3.5 Verdau des murinen Antikörpers zum F_{ab}-Fragment

Die Antikörper wurden mit der Cysteinprotease Papain oberhalb seiner Gelenkregion gespalten. Diese Protease erkennt spezifisch diese Region, wobei deren Effektivität unter Zugabe von Cystein gesteigert wird. Cystein liegt bei einem pH-Wert von 7 als Thiolat vor und kann die Disulfidbrücke in der Gelenkregion für das Enzym Papain besser zugänglich machen. Dies geschieht, indem diese Disulfidbrücke durch einen Thiol-Disulfidaustausch mittels Zugabe von Cystein gespalten wird (Adamczyk *et al.* 2000). Nach Zugabe von aktiviertem Papain zum Antikörper wurde der Ansatz 24 Stunden bei 37 °C inkubiert.

500 µl einer 6 mg/ml-Antikörperlösung (c#6 und c#17) wurden durch die Zugabe von 250 µl Papain (7BAEE) des Pierce® Fab Preparation Kit (44985) verdaut. (Die Unitdefinition beschreibt dabei, dass ein Unit 1 µmol BAEE pro Minute bei 25 °C in einem pH-Wert von 6,2 hydrolysiert.) Nach 24 Stunden wurde die vollständige Spaltung des Antikörpers mittels SDS-PAGE überprüft. Da es nicht möglich war, den Antikörper c#24 unter gleichen Bedingungen vollständig zu spalten, wurde 300 µl Enzym Papain mit gesteigerter proteolytischer Aktivität (16-40 BAEE) für den Verdau von 500 µl einer 3 mg/ml-Antikörperlösung verwendet.

2.2.3.6 Reinigung des F_{ab}-Fragmentes mittels Affinitätschromatographie an Protein G

Vor der Reinigung wurde der gespaltene Antikörper zunächst über Nacht in einen Bindungspuffer (20 mM Natriumphosphat, pH 7,0) dialysiert. Alle weiteren Puffer, die für die Reinigung des F_{ab}-Fragmentes verwendet wurden, wurden entgast und bei 4 °C gelagert. Für die Reinigung wurde das *Äkta Purifier System* verwendet. Die Reinigungsprozedur beginnt mit der Equilibrierung der Protein-G-Säule mit 5 SV Bindungspuffer. Mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min wurden ca. 10 mg gespaltener AK mit einer Konzentration von etwa 2,5 mg/ml auf eine 1 ml Protein-G Chromatographiesäule geladen. Nach Auftrag wurde die beladene Säule mit 10-20 SV Bindungspuffer gewaschen, um Verunreinigungen und ungebundenes Material zu entfernen, bis die Absorption bei 280 nm die Basislinie wieder erreicht hatte. Nachfolgend wurde das gebundene F_{ab}-Fragment (c#6 und c#24) mit Elutionspuffer (0,1 M Glycin-HCl, pH 2,7) eluiert und sofort durch die Zugabe von 1 M Tris-HCl pH 9,0 tropfenweise neutralisiert, bis der pH-Wert jeder eluierten Fraktion wieder neutral war (pH 7,0-7,5). Das F_{ab}-Fragment des AK c#17 wurde nicht über die Protein-G Säule gebunden und befand sich in den Durchflussfraktionen, sodass eine Neutralisierung des F_{ab}-Fragmentes in diesem Falle nicht nötig war. Eine Abtrennung des F_{ab}-Fragmentes des AK c#17 zum Fc-Fragment war jedoch trotzdem über diese Methode möglich, da im Gegensatz zum AK c#6 und AK c#24 das Fc-Fragment an die Protein-G Säule gebunden hat.

Anschließend wurden die Fraktionen mittels 12 % SDS-PAGE analysiert. Die Fraktionen, welche das F_{ab}-Fragment enthielten, wurden vereinigt und weiter über Gelfiltration gereinigt.

2.2.3.7 Reinigung des F_{ab}-Fragments durch Gelfiltration

2 ml einer ~ 2,5 mg konzentrierten Proteinlösung des F_{ab}-Fragments wurden auf 500 µl mittels Vivaspin 500 Zentrifugalkonzentratoren (MWCO 5.000 PES) der Firma Sartorius aufkonzentriert. Für die Gelfiltration wurde eine Superdex-75 Säule verwendet und zunächst zweimal mit 2 SV entgastem ddH₂O gewaschen. Anschließend wurde die Säule mit 2 SV Austauschpuffer (20 mM Natriumphosphat, 150 mM NaCl, pH 7,0) equilibriert. 250 µl der aufkonzentrierten Proteinlösung wurden mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min geladen. Nach 12 min wurde der Protein-*peak* fraktioniert und so von Verunreinigungen aus den umgebenen Fraktionen getrennt. Die restlichen 250 µl wurden in gleicher Weise gereinigt und die Protein-*peaks* aus beiden Läufen vereinigt. Die Vorbereitung der Proteinproben für die Kristallisation ist in 2.2.5 beschrieben.

2.2.3.8 AK-Deglykosylierungsversuche mit PNGase F

Für die Deglykosylierung des AK c#17 wurde PNGase F (NEB) verwendet. Dazu wurden 10 µg des AK mit 2 µl PNGase F (500.000 U/ml) versetzt und nach Herstellerangaben denaturierend in einem Reaktionsvolumen von 20 µl für 24 h bei 37°C behandelt.

2.2.4. Interaktionsstudien

2.2.4.1 Aktivitätsnachweis der AK-enthaltenen Fraktionen nach Protein-G-Affinitätschromatographie (2.2.3.1) mittels Oberflächenplasmonresonanz (OPR) durch Verwendung eines Aβ_{pE3-40} gekoppelten OPR-Chip

Zunächst wurde Aβ_{pE3-40}-Peptide (synthetisiert durch S. Manhart, Probiobdrug AG) an einen CM5-Sensorchip gekoppelt. Das synthetisierte Peptid wurde zuvor in HFIP bei -80 °C gelagert und auf Raumtemperatur aufgetaut. Das HFIP ist durch Öffnen des *tubes* unter dem Abzug über Nacht verdampft. Mit der Zugabe von 10 mM Natriumacetat, pH 5,0 wurde das Peptid auf eine Konzentration von 1 mg/ml verdünnt.

Der verwendete CM5-Sensorchip besitzt eine carboxylierte Dextranmatrix. Für die Kopplung des Aβ_{pE3-40}-Peptide wurde die Aminkopplungsmethode benutzt. Dafür wurden 0.4 M 1-Ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC) und 0.1 M N-Hydroxysuccinimide (NHS) des *Amine Coupling Kit* in einem Verhältnis von 1:1 gemixt und durch die Injektion mit einer Flussgeschwindigkeit von 10 µl/min für 8 min die CM5-Sensorchipoberfläche aktiviert. Anschließend erfolgte durch die Zugabe von 50 µg/ml des gelösten Aβ_{pE3-40}-Peptids mit einer Flussgeschwindigkeit von 10 µl/min für 5 min die Kopplung des Peptids an den Chip. Für die

Kopplung wurde ein milder saurer pH-Wert verwendet (10 mM Natriumacetat, pH 5,0) um eine zunächst nichtkovalente Bindung des Peptids (positive Nettoladung) an die Sensoroberfläche durch elektrostatische Anziehung zu erzielen. Durch die Reaktion der zwei A β -Lysine (Position 16 und 28) mit den aktivierten Carboxylgruppen auf der Oberfläche wurde das A β _{pE3-40}-Peptid kovalent an den Chip gebunden.

Die freien Estergruppen wurden durch Zugabe von 100 μ l 1M Ethanolamin (pH 8,5) mit einer Flussrate von 10 μ l/min deaktiviert. Nicht-immobilisierte Peptide wurden durch die Injektion von 30 μ l 0,1 M Glycin pH 1,7 mit einem Fluss von 30 μ l/min dazugegeben und anschließend der Chip mit HBS-EP Puffer über Nacht gespült. Ein Bindungssignal von 1000 RU wurde nach dieser Methode erreicht und beschreibt den A β _{pE3-40}-gekoppelten Sensorchip als gesättigt. Dieser Chip wurde für den Nachweis von A β _{pE3}-spezifischen Antikörpern in den Reinigungsfractionen verwendet. Dazu wurden 5 μ l Fraktion in 495 μ l HBSEP verdünnt und anschließend analysiert. Die Proteinkonzentration in der Elutionsfraktion wurde spektroskopisch bestimmt und anschließend eine 2 μ g/ml-Proteinlösung für die OPR- Messung injiziert.

2.2.4.2 Ermittlung der Antikörperaffinität zu verschiedenen A β -Peptidvarianten mittels OPR

Die Affinität von murinen Antikörpern zum A β _{pE3}-Peptid wurde durch kinetischer Analysen mittels dem BIAcore 3000 durchgeführt. Ein CM5-Sensorchip wurde dazu mit einem α -Mausantikörper (PA1 28555; Thermo Scientific) gekoppelt, um anschließend den A β _{pE3}-spezifischen Antikörper zu binden. Dieser sollte als *target* für den zugegeben Liganden (z.B. das A β _{pE3-18}-Peptid) dienen. Für die Kopplung der Sensoroberfläche des CM5-Chip mit der primären Aminogruppe des α -Mausantikörpers wurden zunächst wie oben beschrieben (2.2.4.1) NHS und EDC gemischt. Mit einer Flussgeschwindigkeit von 10 μ l/min wurde die Flusszelle mit 100 μ l des NHS/EDC-Gemisches für 7 min behandelt. Der α -Mausantikörper wurde auf 42,4 μ g/ml in Immobilisierungspuffer (10 mM Natriumacetat pH 5,0) verdünnt und davon 450 μ l für 45 min nach Herstellerangaben injiziert. Die freien Estergruppen wurden durch dreimalige Zugabe von 70 μ l 1 M Ethanolamin (pH 8,5) mit einer Flussgeschwindigkeit von 10 μ l/min deaktiviert. Um die unspezifisch gebundenen α -Mausantikörper vom SPR-Chip zu entfernen, wurden zunächst 30 μ l 0,1 M Glycin pH 1,7 mit einem Fluss von 30 μ l/min dazugegeben und anschließend der Chip mit HBS-EP-Puffer für 1 h gespült. 16300 *response units* (RU) des α -Mausantikörper wurden so auf dem SPR-Chip immobilisiert.

Der murine A β _{pE3}-spezifischen Antikörper wurden auf 25 μ g/ml in HBS-EP-Puffer verdünnt und 70 μ l Probe mit einer Flussgeschwindigkeit von 10 μ l/min injiziert, sodass ein RU-Signal von 1500 gebundenem murinen Antikörper erreicht wurde. Anschließend wurde der Chip mit einem Fluss von 100 μ l/min solange mit HBS-EP-Puffer gewaschen, bis das RU-Signal stabil war. Danach konnten die kinetischen Messungen durchgeführt werden. Mit einer Flussgeschwindigkeit von

30 $\mu\text{l}/\text{min}$ wurden 240 μl der Peptidlösung injiziert und eine Progresskurve der Assoziation aufgezeichnet (k_{on}). Um das Dissoziationsverhalten des Peptids zu untersuchen, wurde nach Peptidinjektion der Chip für 3000 s mit HBS-EP-Puffer gewaschen, sodass anschließend eine Progresskurve der Dissoziation (k_{off}) gemessen werden konnte. Die Sensogramme wurden nach der Messung mittels der BIAcore Software (BIAcore 3000) nach einem einbindigen Modell mit der Gleichung $\frac{dR}{dt} = k_{\text{on}} \cdot C \cdot (R_{\text{max}} - R) - k_{\text{off}} \cdot R$ analysiert, wobei R die Konzentration des Komplexes [AB] darstellt. Unabhängig davon wurden die K_D -Werte berechnet, indem die gemessenen RU-Werte der Plateauphase gegen die Peptidkonzentrationen aufgetragen wurden. Dabei wurde zunächst von der Bildung eines Komplexes AB aus den einzelnen Molekülen A (Peptid) und B (Antikörperbindungstasche) mit einer Geschwindigkeitskonstante k_{on} ausgegangen, die in einer Gleichgewichtsreaktion mit einer Geschwindigkeitskonstante k_{off} auch wieder dissoziieren können: $A + B \xrightleftharpoons[k_{\text{off}}]{k_{\text{on}}} AB$ (1). Die Assoziationskonstante K_A berechnet sich aus der Division der im Komplex gebundenen Moleküle (AB) durch die Konzentration der einzelnen Moleküle, die nach Komplexbildung im Gleichgewicht noch vereinzelt vorliegen. Somit erhalten wir folgende Gleichung: $K_A = \frac{AB}{A \cdot B}$ (2). Die Konzentration des Antikörpers B im Gleichgewicht entspricht dabei der Ausgangskonzentration B_0 mit Abzug der Moleküle, die im Komplex gebunden sind $B = B_0 - AB$. Die Abnahme der Konzentration des Peptids nach Bindung kann hingegen vernachlässigt werden, da die Menge an gebundenem Peptid gegenüber der eingesetzten Peptidkonzentration sehr viel kleiner ist. Damit wurde die Gleichung (2) folgendermaßen modifiziert: $K_A = \frac{AB}{A(B_0 - AB)}$ (3). Wird die Gleichung mit A multipliziert und AB ausgeklammert (siehe Abb. 2.1), bewirkt dies, dass der AB-Komplex heraus gekürzt werden kann. Da wir eine Gleichung benötigen, die uns die Änderung der Anzahl an Komplexen AB in Abhängigkeit der eingesetzten Peptidkonzentration anzeigt, muss die Gleichung nach dem übrig gebliebenen AB-Parameter umgestellt werden und man erhält: $AB = \frac{B_0}{\frac{1}{K_A \cdot A} + 1}$ (4). Um die Gleichung zu vereinfachen, ist es sinnvoll, die rechte Seite der Gleichung mit der Multiplikation von $\frac{K_A \cdot A}{K_A \cdot A}$ zu erweitern und man erhält nach Herauskürzen von $K_A \cdot A$ die Gleichung $AB = \frac{B_0 \cdot K_A \cdot A}{1 + K_A \cdot A}$. Da in der SPR-Messung die Ausgangskonzentration der Antikörperbindungstaschen B_0 nur über die maximale Beladung des AK-gekoppelten SPR-Chips mit gebundenem Peptid in relativen RU-Einheiten zu ermitteln ist, wird diese Größe als maximales Bindungsvermögen R_{max} beschrieben. Bei konstanter AK-Konzentration steigt die Menge an gebildeten Komplexen AB mit steigender Peptidkonzentration an, bis ein Maximum erreicht ist, da nach fortlaufender Bindungsreaktion nicht mehr genügend freie Antikörperbindungstaschen frei sind. Dieser Sättigungseffekt wird ebenfalls durch R_{max} ausgedrückt. Darüber hinaus kann die Konzentration des entstanden Komplexes AB im Gleichgewicht ebenfalls nur in Form der gemessenen relativen RU-Einheiten

dargestellt werden, sodass der AB-Parameter durch $R_{\text{equilibrium}}$ (R_{equ}) angezeigt wird. Ersetzt man nun noch die Konzentration des eingesetzten Peptids A durch c, dann erhält man die Gleichung (5) (siehe Abb. 2.1).

(1)	$A + B \xrightleftharpoons[k_{\text{off}}]{k_{\text{on}}} AB$	
(2)	$K_A = \frac{AB}{A \cdot B}$	$B = B_0 - AB$ $AB \ll A_0, A = A_0$
(3)	$K_A = \frac{AB}{A(B_0 - AB)}$	$\cdot A$ Ausklammern von AB
	$K_A \cdot A = \frac{AB}{\cancel{AB}(\frac{B_0}{AB} - 1)}$	Kehrwert + 1
	$\frac{1}{K_A \cdot A} + 1 = \frac{B_0}{AB}$	nach AB umstellen
(4)	$AB = \frac{B_0}{\frac{1}{K_A \cdot A} + 1}$	$\cdot \frac{K_A \cdot A}{K_A \cdot A}$
	$AB = \frac{B_0 \cdot K_A \cdot A}{\frac{K_A \cdot A}{K_A \cdot A} + K_A \cdot A} = \frac{B_0 \cdot K_A \cdot A}{1 + K_A \cdot A}$	
(5)	$R_{\text{equ}} = \frac{R_{\text{max}} \cdot K_A \cdot c}{1 + K_A \cdot c}$	

Abb. 2.1: Schema zur Ermittlung der Gleichung für die Berechnung der Assoziationskonstante

Gegeben ist uns nur die eingesetzte Ausgangskonzentration des Peptids A_0 . Da die Menge des gebundenen Peptids im Gleichgewicht wesentlich kleiner als die eingesetzte ist ($AB \ll A_0$), entspricht die Konzentration des freien Peptids im Gleichgewicht der Ausgangskonzentration ($A=A_0$). Durch die Messung von mindestens 5 Bindungsereignissen bei 5 verschiedenen Peptidkonzentrationen kann den Punkten eine Kurve angepasst werden, die mathematisch durch Gleichung (5) beschrieben werden kann. Mit Hilfe dessen lassen sich die Assoziationskonstante K_A und das maximale Bindungsvermögen R_{max} ermitteln.

Diese Gleichung spiegelt eine Annäherung an die gemessenen Werte wieder und es ist uns möglich, die fehlenden Parameter K_A und R_{max} zu berechnen.

2.2.4.3 Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)

Wenn Proteine vom freien Zustand in den gebundenen Zustand übergehen, kommt es zu einer Umverteilung nichtkovalenter Wechselwirkungen, wobei Wärme vom System aufgenommen (endothermer Prozess) oder abgegeben (exothermer Prozess) werden kann. Mittels der Methode der Isothermalen Titrationskalorimetrie können Protein/Protein-Interaktionen thermodynamisch charakterisiert werden, wenn sie mit Wärme - oder Enthalpieänderungen verbunden sind.

In dieser Arbeit wurde ein VP-ITC MicroCalorimeter der Firma MicroCal (Northampton, USA) verwendet. Dieses Kalorimeter entspricht einem Kompensations-Kalorimeter, welches aus einer Referenz- und einer Probenzelle besteht, die von einem adiabatischen Gehäuse ummantelt werden. Die beiden Zellen werden durch ein elektrisches Heizelement verbunden. Dadurch ist es möglich, den Leistungsunterschied der Zellheizungen zu detektieren und durch die Änderung der Heizleistung die beiden Zellen auf konstanter Temperatur zu halten (isothermal). Durch die Vermischung beider Bindungspartner kann die freigesetzte oder aufgenommene Reaktionswärme in der Probenzelle detektiert werden und durch Heizleistungskompensation die gleiche Temperatur wie in der Referenzzelle aufrecht erhalten werden. Das eigentliche Messsignal ist also die zeitabhängige Zufuhr bzw. Abfuhr von Energie durch die Heizelemente der Probenzelle. ITC-Messungen liefern dabei ein weites thermodynamisches Profil der Wechselwirkung, da die Assoziationskonstante K_A (und damit verbunden die freie Bindungsenthalpie $\Delta_B G$), die Stöchiometrie (N) und die Bindungsenthalpie ($\Delta_B H$) bestimmt werden können. Betrachtet man eine einfache Protein/Liganden-Interaktion, ergibt sich die Gleichgewichtsassoziationskonstante K_A aus:

$$P + L \rightleftharpoons PL$$

$$(Gl.2.1) \quad K_A = \frac{[PL]_{eq}}{[P]_{eq} \cdot [L]_{eq}}$$

Über den Masseerhaltungssatz (Gl.2.2 und Gl.3.3) und der Gleichung von K_A (Gl.2-1) erhält man Gleichung 2-4:

$$(Gl.2.2) \quad [P]_0 = [P]_{eq} + [PL]_{eq}$$

$$(Gl.2.3) \quad [L]_0 = [L]_{eq} + [PL]_{eq}$$

$$(Gl.2.4) \quad K_A = \frac{[PL]_{eq}}{([P]_0 - [PL]_{eq}) \cdot ([L]_0 - [PL]_{eq})}$$

Diese Gleichung lässt sich nach der Konzentration des gebildeten Protein/Liganden-Komplexes $[PL]$ auflösen.

$$(Gl.2.5) \quad [PL] = \frac{1}{2} \left([P]_0 + [L]_0 + \frac{1}{K_A} \right) - \sqrt{\frac{\left([P]_0 + [L]_0 + \frac{1}{K_A} \right)^2}{4} - [P]_0 [L]_0}$$

Die 1. Ableitung $d[PL]/d[L]$ beschreibt die Abhängigkeit der Änderung der Protein/Liganden-Komplexkonzentration $d[PL]$ von der Änderung der Gesamtkonzentration des zugegebenen Liganden $d[L]_0$, welche in jedem Titrationsschritt erhöht wird.

$$(Gl.2.6) \quad \frac{d[PL]}{d[L]_0} = \frac{1}{2} + \frac{\left[1 - \frac{1}{2} \left\{1 + \frac{1}{K_A \cdot [P]_0}\right\} - \frac{[L]_0}{2 \cdot [P]_0}\right]}{\sqrt{\left\{\frac{[L]_0}{[P]_0}\right\}^2 - \frac{2[L]_0}{[P]_0} \left\{1 - \frac{1}{K_A \cdot [P]_0}\right\} + \left\{1 + \frac{1}{K_A \cdot [P]_0}\right\}^2}}$$

Die Wärme, die bei der Zugabe des Liganden entsteht und gemessen werden kann, kann durch folgende Gleichung beschrieben werden.

$$(Gl.2.7) \quad dQ = \Delta_B H \left(\frac{d[PL]}{d[L]_0} \right)_{P_0, L_0} \cdot \Delta[L]_0 V$$

$\Delta_B H$ stellt dabei die Bindungsenthalpie und V das Reaktionsvolumen (Volumen der Messzelle) dar. Mit den Gleichungen 2.6 und 2.7 können die Assoziationskonstante K_A und die Bindungsenthalpie $\Delta_B H$ bestimmt werden. Eine ausführliche Erläuterung der Herleitung und der Auswertung der Gleichungssysteme ist in der Literatur nachzulesen (Indyk & Fisher, 1998).

Die Änderung der Gibbs-Energie $\Delta_B G$ wird durch die Gleichung 2.8 beschrieben, wobei R die universelle Gaskonstante und T die absolute Temperatur darstellen.

$$(Gl.2.8) \quad \Delta_B G = -R \cdot T \cdot \ln K_A$$

Zudem kann die freie Bindungsentropie $\Delta_B S$ mittels der Gibbs-Helmholtz-Gleichung kalkuliert werden:

$$(Gl.2.9) \quad \Delta_B G = \Delta_B H - T \cdot \Delta_B S$$

Mittels der Methode der ITC konnten die thermodynamischen Parameter der Bindung zwischen dem $A\beta_{pE3-18}$ -Peptid und dem F_{ab} -Fragment $c\#6$, $c\#24$ und $c\#17$ untersucht werden. Dazu wurde zunächst das F_{ab} -Fragment über Nacht in ITC-Puffer (150 mM NaCl, 25 mM Natriumphosphat, 25 mM Kaliumphosphat, 1 mM EDTA, pH 7,4) bei 4 °C dialysiert. Nach Dialyse wurde der Puffer entnommen und für das Lösen des lyophilisierten Peptids (synthetisiert von H.H. Ludwig, Probiodrug AG) verwendet, sodass das F_{ab} -Fragment als auch das Peptid im identischen Puffer vorlagen. Vor der ITC-Messung wurde die Konzentration des F_{ab} -Fragments ($\epsilon_{clone\#6} = 79800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; $\epsilon_{clone\#17} = 77280 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; $\epsilon_{clone\#24} = 79800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) und des Antigens ($\epsilon = 1490 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) mittels UV/VIS Spektroskopie bestimmt. Zunächst wurde das F_{ab} -Fragment mit einer Konzentration von 1 μM in die Probenzelle pipettiert. Anschließend wurde eine Lösung von 10 μM Antigen in die Probenzelle durch 15 Injektionszyklen zugeführt. Diese Injektionen (1 x 2 μl and 14 x 21 μl) wurden in einem Intervall von 5 min programmiert. Die Messung der gebildeten Reaktionswärme wurde bei 20 °C durchgeführt. Darüber hinaus wurde eine Leermessung

vorgenommen, bei der die Reaktionswärme mit dem gleichem Titrationsverfahren des Antigens in den ITC-Puffer gemessen wurde. Die Reaktionswärme bei der ITC-Messung des Antigens zum F_{ab} -Fragment wurde mit dem Wert der Leermessung korrigiert. Für die Messung der Antikörper mit dem Antigen $A\beta_{3-18}$ wurde eine Antikörperkonzentration von $4 \mu\text{M}$ in die Probenzelle vorgelegt und das Antigen mit einer Konzentration von $80 \mu\text{M}$ schrittweise dazu gegeben. Die Analyse der Rohdaten und die Bestimmung der Assoziationskonstante K_A , der Reaktionsstöchiometrie N , der Bindungsenthalpie ΔH und der Entropie ΔS wurde mit der Origin Software MicroCal ermittelt.

2.2.5 Proteinkristallisation und Strukturlösung

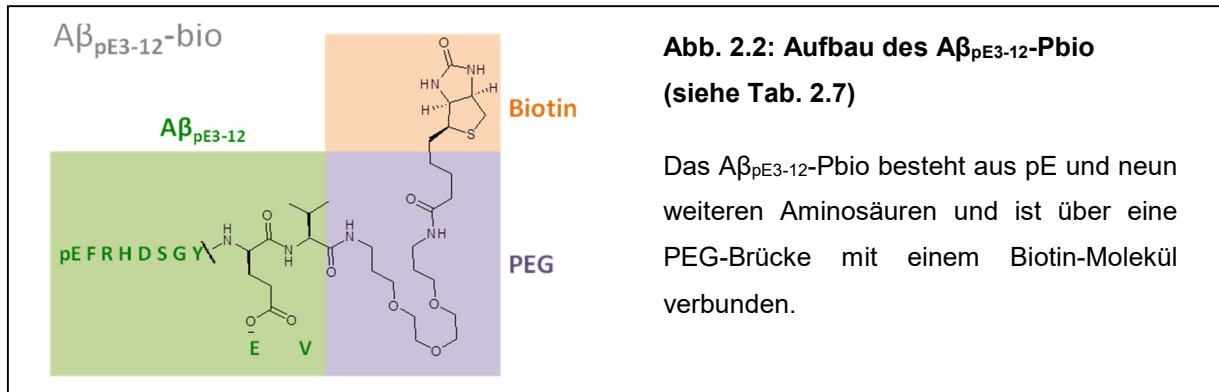
2.2.5.1 Präparation der F_{ab} -Kristallisationsansätze

In dieser Arbeit führten sechs verschiedene Kristallisationen zur Bildung von Proteinkristallen, welche geeignete Startpunkte ergaben, um die Strukturen drei verschiedener F_{ab} -Fragmente und deren Komplexe zu lösen. Die verwendeten Proteinlösungen sind in Tab. 2.7 aufgelistet. Die Probe des F_{ab} -Fragments wurde dazu zunächst gegen einen niedrig molaren Tris-Puffer (10 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 6,9) über Nacht mittels der Dialysemembran von Spectra/Por (MWCO 6-8000 Da) dialysiert und auf ca. 9 mg/ml mit einem U-Tube™ Concentrator (Calbiochem 6-10, 10 kDa cut off) konzentriert. Das verwendete $A\beta$ -Peptid wurde im gleichen Tris-Puffer gelöst und seine Konzentration mittels UV/VIS-Spektroskopie und einem Extinktionskoeffizienten von $1490 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ermittelt. Eine Ausnahme bildete das **$mA\beta_{pE3-18-Pbio}$ -Peptid**, welches im Gegensatz zum **$A\beta_{pE3-18}$** - und **$A\beta_{pE3-12Pbio}$ -Peptiden** kein Tyrosin besitzt, sodass die Verwendung eines Extinktionskoeffizienten für die Berechnung der Konzentration über die Absorption nicht möglich war. Somit wurde die für die Konzentrationsbestimmung notwendige Peptidmasse über die genaue Einwaage mittels einer Feinwaage bestimmt. Der PEG-Biotin-Anker des **$mA\beta_{pE3-18-Pbio}$ -Peptids** bzw. des **$A\beta_{pE3-12Pbio}$ -Peptids** ist in Abb. 2.2 gezeigt.

Anschließend wurde das jeweilige Peptid mit dem F_{ab} -Fragment in einem äquimolaren Verhältnis von 1:1 (siehe Tab. 2.7) über Nacht bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert, sodass die Endkonzentration des F_{ab} -Fragments 8 mg/ml betrug. Verhältnisabweichungen zwischen AK und $A\beta$ -Peptid sind in der Tabelle angegeben. Die Struktur des F_{ab} -Fragments c#6 ohne Ligand wurde trotz Zugabe des $A\beta_{pE3-12Pbio}$ aus der gleichen Präparation unter anderen Kristallisationsbedingungen erhalten.

Tab. 2.7: Überblick über die durchgeführten Kristallisationen und deren AK/ $A\beta$ -Verhältnis

Protein	Ligand	M_{Ligand} in g/mol	AK/ $A\beta$
F_{ab} c#6	$A\beta_{pE3-12Pbio}$	1990,0	1:1
F_{ab} c#6	-	-	-
F_{ab} c#24	$A\beta_{pE3-18}$	2646,2	1:1,2
F_{ab} c#17	$A\beta_{pE3-12Pbio}$	1990,0	1:1,2
F_{ab} c#17	$mA\beta_{pE3-18-Pbio}$	2819,7	1:1,2
F_{ab} c#17	-	-	-



2.2.5.2 Proteinkristallisation

Die Bildung von Proteinkristallen ist eine notwendige Voraussetzung für die anschließende Röntgenkristallstrukturanalyse. Die eigenständige Trennung der Proteinmoleküle von der Proteinlösung und ihre periodische Aneinanderreihung ermöglicht die Bildung eines Kristallgitters. Zur Überführung einer Proteinlösung in eine kristalline Form ist es notwendig, die Löslichkeit des Proteins herabzusetzen, welches durch die Verwendung von Fällungsmitteln, auch Präzipitantien genannt, erfolgen kann. Die Löslichkeit der Proteine verschiebt sich mit Veränderung der Präzipitantkonzentration. So sind mit Steigerung der Präzipitantkonzentration geringere Proteinkonzentrationen nötig, um eine Proteinlösung vom untersättigten Bereich in Richtung des übersättigten Bereiches zu verschieben. Dies kann in Form eines Proteinlöslichkeitsdiagramms (auch Phasendiagramm genannt) bildlich abgebildet werden (siehe Abb.2.3A). Der Übergang zum metastabilen Bereich kann auch als Löslichkeitsgrenze (orange) beschrieben werden. Das metastabile System benötigt im Allgemeinen einige Störungs- bzw. Aktivierungsereignisse um die kinetische Barriere gegenüber dem Gleichgewicht des Proteins in Lösung zu überwinden. In einer übersättigten Proteinlösung, welche sich noch im metastabilen Bereich befindet, liegt das Protein noch in einer löslichen *single-phase* im Gleichgewicht vor. Wird die Aktivierungsbarriere überwunden, separiert sich von der löslichen übersättigten Proteinlösung eine proteinreiche Phase ab, was auch als Phasentrennung bezeichnet wird. Im günstigsten Fall handelt es sich bei der proteinreichen Phase um einen Kristall, aber auch das Ausfallen von Präzipitanten oder die Bildung von *liquid phases* (z.B. Proteinöltropfen) sind unerwünschte proteinreiche Phasen.

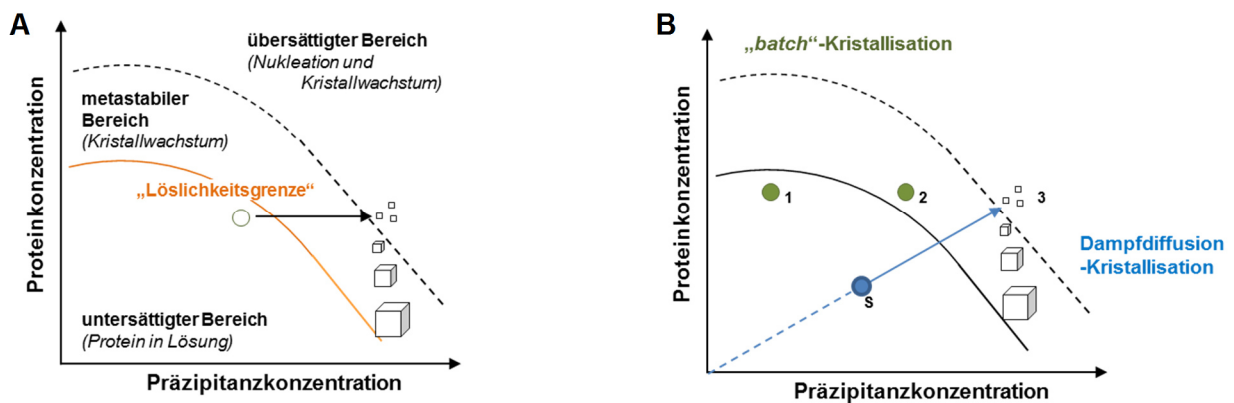


Abb. 2.3: Proteinlöslichkeitsdiagramm

A) Die Proteinkonzentration ist gegen die Präzipitantkonzentration aufgetragen. Proteine in Lösung aus dem unterschättigten Bereich können durch Anstieg der Präzipitantkonzentration in Richtung des übersättigten Bereichs verschoben werden, um unter geeigneten Bedingungen Kristalle zu bilden (Nukleation). Durch das Wachstum der Kristalle sinkt die Proteinkonzentration in der Lösung, sodass die Proteinlösung in den metastabilen Zustand zurückfällt und die Kristalle dort weiter wachsen können. Wird die Löslichkeitsgrenze erreicht, findet das Kristallwachstum ein Ende. B) Bei der *batch*-Kristallisation unter isolierten Bedingungen (nichtpermeables Öl) ist es notwendig, verschiedene experimentelle Startpunkte (z.B. verschiedene Präzipitantkonzentrationen) zu testen (1, 2 oder 3) um in den Bereich der Nukleation zu gelangen. Bei der Dampfdiffusionskristallisation wird aufgrund der Dampfdiffusion neben der Steigung der Präzipitantkonzentration auch die Proteinkonzentration in nur einem Experiment erhöht, sodass das Durchlaufen verschiedener Bedingungen im Phasendiagramm möglich ist und somit die Chance auf eine geeignete Kristallkeimungsbedingung erhöht wird.

Durch die Erhöhung der Proteinkonzentration im Proteinlösungstropfen kann die Löslichkeit des Proteins verringert und somit die Kristallisation begünstigt werden. Um diese Erhöhung zu erzielen ohne die Startproteinkonzentration ändern zu müssen, macht man sich den Effekt der Dampfdiffusion (*vapor diffusion*) mit Verwendung von zwei unterschiedlich konzentrierten Präzipitantlösungen zu nutze. Dafür verwendet man eine Reservoirolösung, deren Präzipitantkonzentration höher ist als die Präzipitantkonzentration im Proteinlösungstropfen. Durch die Diffusion der Wassermoleküle in einem geschlossenen System über die Gasphase vom Kristallisationstropfen zur Reservoirolösung erhöht sich die Konzentration des Proteins als auch die des Präzipitanz im Tropfen, sodass die Proteinlösung in den metastabilen und dann in den übersättigten Bereich übergehen kann (Abb.2.3B). In der metastabilen Phase kann die Bildung von Kristallen noch nicht stattfinden, sondern lediglich das stabile Weiterwachsen von bereits bestehenden Kristallen. Wird die Löslichkeit der Proteinlösung weiter herabgesetzt, gelangt diese in den übersättigten Bereich und Proteinmoleküle können unter geeigneten Bedingungen Kristallisationskeime bilden (Nukleation). Das Durchlaufen unterschiedlicher Protein- und Präzipitantkonzentrationen von nur einem experimentellen Startpunkt (S) eröffnet dabei das Abdecken mehrere Bedingungen, um eine geeignete Bedingung im übersättigten Bereich für das Kristallwachstum zu erreichen.

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Dampfdiffusionsmethoden genutzt. Je nach Lage des Kristallisationstropfens wird zwischen der Methode des hängenden Tropfens (*hanging-drop vapor diffusion*) und der Methode des sitzenden Tropfens (*sitting-drop vapor diffusion*) unterschieden. Als effektive *screening*-Methode haben sich Kristallisationsansätze im Nanoliterbereich etabliert (Santarsiero *et al.*, 2002; DeLucas *et al.*, 2003). Diese wurden mittels der *sitting-drop vapor-diffusion-Methode* und mit Hilfe eines Pipettierroboters (Cartesian Microsys, Zinsser-Analytik, Frankfurt/M.) bei 13 °C angefertigt. Dabei wurden 200 nl Kristallisationspuffer mit 200 nl Proteinlösung in Form eines sitzenden Kristallisationstropfens vereinigt und neben 40 µl einer Reservoirolösung in einem *96-well-screening*-Format lokalisiert. Für alle in der Arbeit beschriebenen F_{ab} -Fragmentlösungen wurden für das initiale *screening* je acht verschiedene kommerziell erhältliche Kristallisations-*screening*-Kits verwendet (siehe 2.1.2). Die Pufferbedingungen, in denen Kristalle gewachsen waren, die zur Strukturlösung der Proteine bzw. Proteinkomplexe verwendet wurden, sind im Ergebnisteil beschrieben (siehe auch Tab. 3.4). Teilweise wurde die Methode des hängenden Tropfens (*hanging-drop vapor diffusion*) angewandt, um nach dem initialen *screening* in reproduzierter Bedingung größere Kristalle zu generieren. Dazu wurden 1 µl Proteinlösung mit 1 µl Pufferlösung auf einem schraubbarem Deckel vereinigt und dieser kopfüber gegenüber 500 µl Reservoirolösung positioniert.

2.2.5.3 Datensammlung und Röntgenstrukturanalyse

Der Proteinkristall wird durch die in drei Dimensionen aneinandergereihte Elementarzelle (*unit cell*) gebaut, welche durch die Achsen a , b und c und die Winkel α , β und γ definiert ist (Abb. 2.4A).

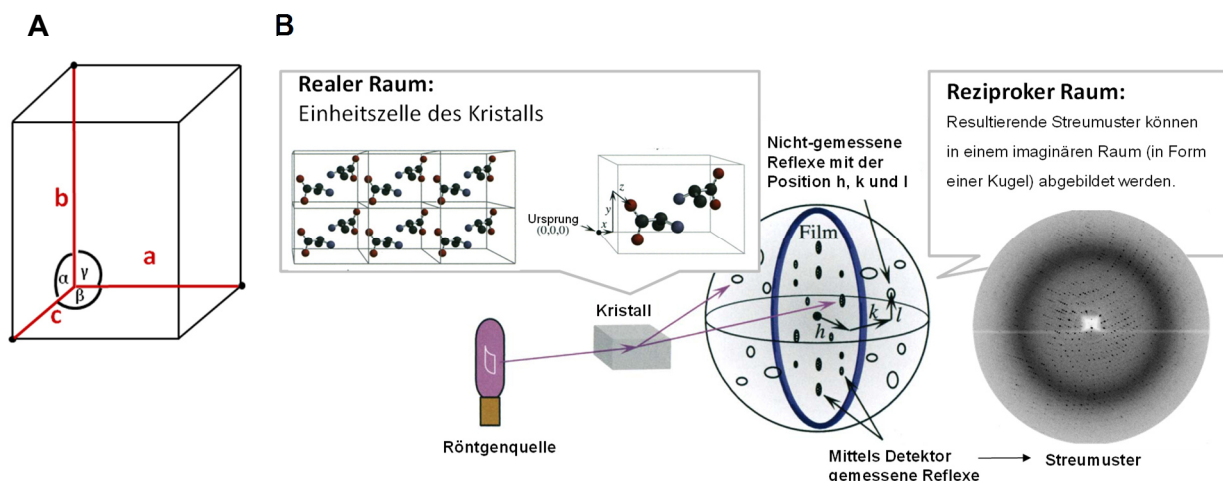


Abb. 2.4: Vergleich von Realem Raum versus Reziprokem Raum

A) Die Einheitszelle des Kristallgitters ist definiert durch die drei Achsen a , b und c und die drei Winkel α , β , γ . B) Die Einheitszellen des Kristalls stellen den realen Raum dar, wobei die Positionen der Atome des Proteins in der Einheitszelle durch die Indizes x , y und z beschrieben sind. Nachdem ein Röntgenstrahl auf einen Proteinkristall trifft und ein Teil der entstehenden Reflexe auf dem Detektor abgebildet wird, entsteht ein zweidimensionales Streumuster (rechts). Würde man alle gebildeten Reflexe visuell darstellen wollen, dann würde ein dreidimensionaler Raum entstehen, welcher auch als Kugel beschrieben werden kann. Die Position der Reflexe sind in diesem Raum durch die Miller'schen Indizes h , k und l beschrieben und sind invers zu den Indizes x , y und z der Einheitszelle. Abbildung geändert nach (Rhodes *et al.*, 2010).

Nachdem ein Röntgenphoton (Welle) der Strahlungsquelle auf ein Elektron eines Atoms im Proteinkristall trifft, beginnt das Elektron zu oszillieren und wird zu einer sekundären Röntgenquelle mit unveränderter Wellenlänge, allerdings einer abgeänderten Amplitude und einer Phasenverschiebung von 180° . Die umgebenen Elektronen erzeugen ebenfalls eine Streuung durch das Initialphoton, allerdings mit einer gegenüber dem ersten Elektron verschobenen Phase, da die Positionen der Elektronen variieren. Aus der Summe dieser reflektierten Wellen entsteht zunächst eine „unscharfe“ gestreute Interferenzstrahlung. Durch die Aneinanderreihung der Elementarzelle im Kristall konzentriert sich die gestreute Strahlung in diskrete scharfe Maxima (Beugungsmaxima) und kann von einem Detektor registriert werden. Die Summe aller Reflexe wird als Streumuster (Abb.2.4) bezeichnet. Jedes Atom mit seiner Anzahl von Elektronen und seiner Position in der Elementarzelle hat Einfluss auf das durch die Röntgenstrahlen erzeugte Streumuster. Die konkreten Beugungsmaxima dieses Streumusters können mathematisch durch die Fourier-Transformation beschrieben werden:

(Gl.2.10)

$$F(hkl) = \int_{\text{Zelle}} \rho(xyz) \exp[2\pi i(hx + ky + lz)] dx dy dz$$

$F(hkl)$ stellt damit eine Fourier-Transformation der Elektronendichte $\rho(xyz)$ der Moleküle in der Elementarzelle dar. Die Umkehrung der Fourier-Transformation ergibt:

(Gl.2.11)

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{-h}^h \sum_{-k}^k \sum_{-l}^l F_{hkl} \cdot \exp[-2\pi i(hx + ky + lz - \alpha_{hkl})]$$

Die Strukturfaktoramplituden F_{hkl} werden direkt aus den Intensitäten der Beugungsreflexe durch die Datensammlung erhalten, da sie proportional zu der Quadratwurzel der gemessenen Intensitäten (I_{hkl}) der einzelnen Reflexe sind. Die Parameter h , k und l (Miller'sche Indizes) bestimmen die Positionen der Reflexe im reziproken Raum (siehe Abb.2.4). Sie sind ebenfalls aus einer Anzahl an Streumustern zu kalkulieren und invers zu den drei Dimensionen x , y und z der Einheitszelle. Der Ausdruck α_{hkl} stellt die Phase (Phasenwinkel) für jeden einzelnen Reflex dar, allerdings kann diese nicht direkt aus dem Beugungsexperiment erhalten werden (Phasenproblem der Röntgenstrukturanalyse). In dieser Arbeit wurde die Methode des Molekularen Ersatzes (*molecular replacement*, MR) (Rossmann, 2001) verwendet, um die Phasen zu bestimmen. Dazu verwendet man im Allgemeinen eine bekannte Struktur (Suchmodell), die der Zielstruktur ähnlich ist. Eine Sequenzidentität von mehr als 30 % ist dabei in vielen Fällen erfolgversprechend. Durch die Positionierung des Suchmodells kann die Position und die Orientierung der unbekanntes Struktur in der Einheitszelle ermittelt werden. Die Phasen

des richtig in der Zelle positionierten Suchmodells dienen unter Einbeziehung der Strukturfaktoramplituden des Zielproteins dazu, die Elektronendichteverteilung der Zielstruktur zu ermitteln und somit die Struktur zu lösen. Für tiefer gehende Informationen in Hinblick auf das *molecular replacement* kann in verschiedener Literatur nachgelesen werden (Crowther & Blow, 1967; Rossmann & Blow, 1962).

Die Datensammlung der optimierten Kristalle (siehe Ergebnisteil Tab.3.4) des $F_{ab} c\#6/A\beta_{pE3}$ und $F_{ab} c\#17/A\beta_{pE3}$ fand am hauseigenen Röntgengenerator (Kupferdrehanoden-Röntgengenerator mit einer Wellenlänge von 1.5418 Å; RA Micro 007, Rigaku Europe) mit Hilfe eines CCD-Detektor (SATURN 944+, Rigaku Europe) bei -173 °C statt, um Strahlungsschäden zu vermeiden (Garman & Schneider, 1997; Garman, 1999). Um die Bildung von Eiskristallen zu verhindern, wurde zunächst getestet, ob ein Kryoschutz notwendig ist. Eine Pufferlösung, zusammengesetzt aus der jeweiligen Reservoirlösung und 20 % Ethylenglycol (v/v) wurde als Inkubationslösung genutzt, bevor der Kristall auf dem Goniometerkopf in den Stickstoffstrom bei einer Temperatur von 100 K positioniert wurde. Die Expositionsdauer der Einzelaufnahmen mit Röntgenstrahlen variierte, je nach Streueigenschaften des Kristalls, zwischen 60 und 90 s. Die Datensammlung des $F_{ab} c\#24/A\beta_{pE3}$ -Kristalls wurden am SYNCHROTON (BESSY *beamline* 14.1, Helmholtz-Zentrum, Berlin) bei einer Wellenlänge von 0.9184 Å und mit einem 3x3 CCD Detektor (MX-225, Rayonics) durchgeführt. Die gemessenen Datensätze wurden mittels des Programms XDS (Kabsch, 1993) indiziert, integriert und skaliert und die initialen Phasen mittels des Programms Phaser (McCoy *et al.*, 2007) bestimmt. Die Phasenbestimmung wurde mit der Methode des Molekularen Ersatzes mit Hilfe eines Suchmodells durchgeführt. Da sich über manuelle Sequenzidentitätsanalysen kein geeignetes Suchmodell finden ließ, wurde das Programm Balbes (Long *et al.*, 2008) der CCP4 Suite (Collaborative Computational Project, 1994) benutzt, um das optimale MR-Suchmodell zu identifizieren. Resultierend daraus wurde für das $F_{ab} c\#6$ and $F_{ab} c\#24$ – Molekül die 3D-Struktur des Anti-Cholera-Toxin-Antikörper- F_{ab} -Fragments (PDB-Code:1ZEA, Scheerer *et al.*, 2007) verwendet. Als Suchmodell für das $F_{ab} c\#17$ kam ein hydrolytisches Antikörper- F_{ab} -Fragment (PDB Code: 2DQT, Oda *et al.*, 2007) zur Anwendung. Vor dem *molecular replacement* wurden alle Solvens-, Inhibitor-und Puffermoleküle aus der pdb-Datei des Suchmodells entfernt und der Besetzungsgrad (*occupancy*) der Aminosäurereste, welche zwischen Such- und Zielstruktur nicht übereinstimmten, initial auf den Wert Null gesetzt, um eine Verzerrung der Elektronendichten durch das Suchmodell (*model bias*, siehe 2.2.4.5) zu vermeiden (Read, 1986).

2.2.5.4 Manuelle Strukturanpassung und Strukturverfeinerung

Die aus dem *molecular replacement* erhaltene Struktur sowie die primäre Elektronendichteverteilung aus der Fourier-Transformation (Gleichung 2.9) unterscheiden sich noch grundlegend von der finalen Struktur, da noch Aminosäuren des Suchmodells vorhanden sind und durch die Aminosäuren der Zielstruktur ersetzt werden müssen. Zudem ist eine

Optimierung von Atompositionen und Torsionswinkel sowie das Einfügen von Wassermolekülen, Ionen und Liganden notwendig. Diese manuelle Strukturanpassung wurde für alle in dieser Arbeit generierten Strukturen mit Hilfe des Programms COOT (Emsley *et al.*, 2010; Emsley & Cowtan, 2004) durchgeführt. Die anschließende Strukturverfeinerung (*refinement*), die sowohl die Änderungen der manuellen Strukturanpassung in der Berechnung der neuen Elektronendichte berücksichtigt als auch computergestützte Optimierung von x , y und z und den B-Faktoren einberechnet, wurde mit dem Program Refmac5 (Murshudov, Vagin, & Dodson, 1997) der CCP4 Suite (Collaborative Computational Project, 1994) bzw. mit dem Program PHENIX (Adams *et al.*, 2002, 2011) durchgeführt (siehe Tab. 6.4). Die verbesserten Koordinaten korrigieren dabei die Phaseninformation, was zu einer korrekteren Elektronendichte für eine fortführende Strukturanpassung führt. In die Verfeinerung einbezogene falsche Koordinaten hingegen verschlechtern die Elektronendichteverteilung, welches sich in dem sogenannten R_{work} -Faktor (Gl.2.10) widerspiegelt. Dieser Parameter ist ein Maß für den Unterschied von gemessenen Strukturfaktoramplituden des Experiments F_{obs} (beobachtet= *observed*) zu den berechneten Strukturfaktoramplituden F_{calc} (berechnet= *calculated*) der Strukturanpassung

(Gl.2.10)

$$R_{\text{work}} = \sum_{hkl} \frac{||F_{\text{obs}}(hkl)| - |F_{\text{calc}}(hkl)||}{|F_{\text{obs}}(hkl)|}$$

Je kleiner dieser Wert ist, desto besser stimmt die gebaute Struktur mit den gemessenen Daten überein. Eine weitere Qualitätskontrolle der verfeinerten Struktur drückt der Parameter R_{free} aus. Dieser wird nur mit einem kleinen Set von stichprobenartig ausgewählten Intensitäten – dem *test set* – aus dem ursprünglichen Datensatz berechnet. Er beschreibt in jedem Stadium der Verfeinerung, wie gut die gegenwärtige Struktur eine Teilmenge der gemessenen Intensitäten (die nicht in der Verfeinerung enthalten sind) vorhersagt.

Der Effekt, dass das Suchmodell die zu verfeinernde Elektronendichte so beeinflusst, dass anstelle der korrekten Elektronendichte eine dem Suchmodell angepasste Dichte entsteht, wird als „*model bias*“ bezeichnet. Dieser Verzerrungseffekt kann auftreten, wenn die kalkulierten Phasen des Suchmodells die Rekonstruktion der Elektronendichte dominieren und somit eine verfälschte Elektronendichte entsteht. Durch Einbauen von Atomen in eine verfälschte Elektronendichte senkt sich ebenfalls der R_{work} -Wert, allerdings vergrößert sich dabei der Abstand zum R_{free} -Wert. Im Allgemeinen ist der R_{free} während der Zwischenstadien der Verfeinerung höher als der R_{work} , wobei die beiden Werte in einer gut verfeinerten Struktur nicht mehr als 5 % abweichen sollten.

Im Unterschied zu allen anderen Kristallen besaß der Kristall des F_{ab} -Fragments *c#6* ohne Liganden eine merohedrale Verzwilligung. Der Verzwilligungsoperator ($h, -k, -l$) wurde mit dem

Programm Phenix xtriage bestimmt. Mittels des Britton-Tests für Verzwilligung wurde der Britton α -Wert von 44 % ermittelt.

2.2.5.5 Berechnung der Oberflächenkomplementarität (sc) und der Antikörper/Liganden-Kontaktfläche (A_{AL})

Die Oberflächenkomplementarität wurde unter Linux mit dem Program SC CCP4 (Lawrence & Colman, 1993) ermittelt. Dafür wurden die alternativen Konformationskoordinaten unter Pymol entfernt. Der sc -Wert (*surface complementarity*) beschreibt die Komplementarität der Bindungspartner zueinander und liegt zwischen 0 und 1.

Die Antikörper/Liganden-Kontaktfläche wurde mit Hilfe der Software QtPISA v1.18 unter Verwendung der Kristallstrukturdaten mit CCP4 berechnet. Zunächst ist dafür die Ermittlung der *ASA* (*accessible surface area*) notwendig. Diese wird durch die Verwendung einer Kugelapproximation definiert, die mit einem Radius von 1.4 Å über die Oberfläche des gesamten Moleküls rollt (Abb.2.5). Diese werden von der Software sowohl für den Liganden allein (1), für den Komplexpartner (LC oder Fd-Fragment) (2) als auch für Liganden und Komplexpartner im Komplex (3) berechnet. Die verborgene *ASA* (*buried ASA*, *bASA*) beschreibt die Fläche, die vom Lösungsmittel verborgen bleibt. Sie ergibt sich für den Liganden ($bASA_L$) aus der Differenz von (1)-(3) bzw. für den Interaktionspartner ($bASA_I$) aus (2)-(3). Die schlussendliche Antikörper/Liganden-Kontaktfläche A_{AL} (in Å²) wird aus der halben Summe der verborgenen *ASA* des Liganden und dem Interaktionspartner kalkuliert.

$$\text{d.h. } A_{AL} = (bASA_L + bASA_I)/2$$

Separat wurde die Kontaktfläche für die LC zum $A\beta_{PE3}$ -Liganden (A+L) und F_d-Fragment zum $A\beta_{PE3}$ -Liganden (B+L), als auch zwischen LC und F_d-Fragment (A+B) kalkuliert.

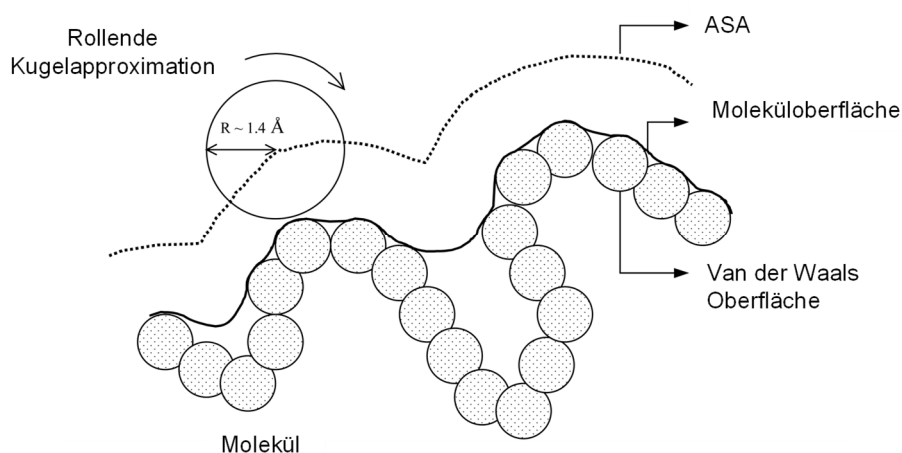


Abb. 2.5: Definition der accessible surface area (ASA)

Kugelapproximation mit einem Radius von 1.4 Å rollt bildlich betrachtet auf der Oberfläche des Moleküls entlang und definiert so die Größe und Zugänglichkeit der ASA und der Van-der-Waals-Oberfläche.

2.2.6 Funktioneller Antikörper-Test

2.2.6.1 Thioflavin T (ThT)- Fluoreszenz-Assay

Mit Verwendung des Thioflavin-T als potentieller fluoreszierender Marker kann die Entstehung von amyloiden Strukturen gemessen werden (Vassar & Culling, 1959). ThT besteht aus einem Benzylamin- und einem Benzathiol-Ring, welche um die gemeinsame C-C-Bindung frei rotierbar sind (Abb. 2.6). Dabei ist es möglich Photonenanregung durch diese Rotation zu tilgen. Es wird angenommen, dass bei Einlagerung in eine A β -Fibrille diese freie Rotation der Ringe unterbunden wird (Biancalana & Koide, 2010) und dadurch der angeregten Zustand des Moleküls erhalten bleibt, was zu einer Änderung des Emissionsmaximum von 445 nm zu 482 nm führt. Diese Fluoreszenzänderung kann mit Hilfe eines Spektrofluorometers gemessen werden.

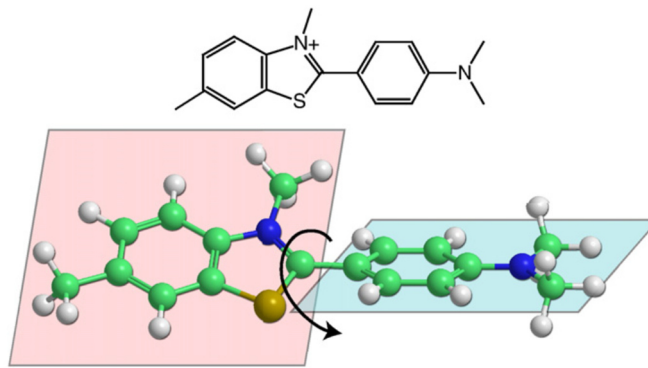


Abb. 2.6: Struktur von Thioflavin T

Durch die frei-drehbare C-C-Bindung zwischen dem Benzathiolring und Benzylamin können Photonenanregungen getilgt werden.

Die Bildung von A β ₁₋₄₂- und A β _{pE3-42}- Fibrillen wurde durch die Inkubation von 20 μ M ThT-Lösung mit 10 μ M monomerem A β ₁₋₄₂/ A β _{pE3-42} (Bachem H1368 /H4796) in Phosphatpuffer (50 mM Natriumphosphat, 150 mM NaCl, pH 8,0) detektiert.

1 mg lyophilisiertes Peptid wurde zunächst in 1 ml 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-isopropanol (HFIP) gelöst und die Konzentration mittels Absorptionmessung bei 280 nm mit Verwendung des Extinktionkoeffizienten von 1490 M⁻¹ cm⁻¹ bestimmt. Anschließend wurden die Probe als Stocklösung aliquotiert, das HFIP unter dem Abzug verdampft und die trockenen Pellets bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Kurz bevor das Aggregationsexperiment startete, wurde der Peptidfilm durch Zugabe von 0,1 M NaOH gelöst (5 % des finalen Volumens). Anschließend wurde das restliche Volumen mit Phosphatpuffer und weiteren 5 % 0,1 M HCl (bezogen auf das Endvolumen) versetzt, um die Peptide zu neutralisieren. So befinden sich letztendlich in einem Endvolumen von zum Beispiel 2000 μ l 100 μ l 0,1 M NaOH und 100 μ l 0,1 M HCl. Das Peptid hatte dann eine Konzentration von 20 μ M und wurde anschließend 1:1 mit ThT-Lösung zu einem Endvolumen von 150 μ l für den ThT-Fluoreszenz-Assay verdünnt, welcher anschließend

gestartet wurde. Je nach Experiment beinhalteten die 150 μl Endvolumen auch die Zugabe von verschiedenen Konzentrationen der Antikörper (Endkonzentration der Antikörper: 0,5 μM , 1 μM , 2 μM , 4 μM). Die Proben wurden in eine schwarze 96-well Mikroplatte pipettiert, mit einem adhäsiven Film bedeckt und bei 37 °C in einem Plattenleser inkubiert. Routinemäßig wurde die Messung der Peptidprobe in drei *wells* pro Platte ausgeführt und der Mittelwert der Fluoreszenzeinheiten für die Auswertung kalkuliert. Die Fluoreszenzintensität wurde alle 20 min bei einer Anregungswellenlänge von 440 nm und einer Emissionswellenlänge von 490 nm mit dem Spektrofluorometer NOVOstar Microplate Reader gemessen.

2.2.6.2 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)

Um die Bildung von Fibrillen nachzuweisen, wurden Proben negativ kontrastiert durch die Behandlung mit einer 1 % (w/v) -igen Uranylacetat – Stammlösung. Gelagert wurde diese Lösung bei 4 °C unter Lichtabschluss. Es wurden 10 μl der Probe der Aggregationsreaktionen entnommen und auf Formvar-bedeckte Kupfer-*grids* (Plano GmbH, Wetzlar) pipettiert. Anschließend wurden die *grids* dreimal mit je 40 μl destilliertem Wasser gewaschen und durch die Zugabe von 20 μl 1% Uranylacetat negativ kontrastiert. Die Peptidaggregate wurden durch die Verwendung eines Zeiss LIBRA 120 Transmissions-Elektronenmikroskops (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen) beobachtet, welches bei 120 kV und unter Anleitung von Dr. Dr. Gerd Hause (Biozentrum, MLU Halle-Wittenberg) betrieben wurden. Die Bilder wurden durch den Einsatz einer *Dual-Speed on axis SSCCD* Kamera (BM-2k-120; TRS, Moorenweis) aufgenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung von drei Pyroglutamat-Amyloid-beta-(A β _{pE3})-spezifische Antikörpern c#6, c#17 und c#24

A β _{pE3}-spezifische Antikörper wurden durch die Generierung von Hybridomaklonen über die Immunisierung von Mäusen mittels dem Hexapeptid pEFRHDS, welches an KLH konjugiert wurde von der Firma BioGenes GmbH (Berlin) gewonnen. Die Selektion der Antikörperproduzierenden Zellen wurde im Vorfeld durch ELISA-Experimente sowie Oberflächenplasmonresonanz-Messungen von der Firma Probiodrug durchgeführt. So konnten drei Hybridomaklone - Klon#6, Klon#17 und Klon#24 – isoliert werden, welche verschiedene A β _{pE3}-spezifische Antikörper produzieren. Die konstanten Bereiche der schweren Ketten wurden durch die Firma BioGenes GmbH (Berlin) einer Unterklasse der IgG-Antikörper zugeordnet (siehe Methoden: 2.2.2.10). Die Antikörper c#6 und c#24 konnten somit der IgG1- und der Antikörper c#17 der IgG2b-Unterklasse zugeordnet werden.

Im Folgenden werden diese Antikörper mit der Nomenklatur ihrer Klone (c#6, c#17 und c#24) benannt und miteinander verglichen. Für die folgenden Analysen wurden zunächst die Antikörper aus den Zellkulturüberständen der Hybridomazellen gereinigt und isolierte RNA aus den Zellen für den Erhalt der Aminosäuresequenz der drei zu charakterisierenden Antikörper genutzt. Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen sollen zum einen die AK/A β _{pE3}-Bindung thermodynamisch als auch strukturell als mögliche Grundlage für die Selektion eines klinischen AK-Kandidaten beschreiben.

3.1.1 Aufreinigung des A β _{pE3}-spezifischen c#17 aus Zellkulturüberständen von Hybridomazellen und Deglykosylierung mittels PNGase F

Zunächst sollten die produzierten Antikörper aus den Zellkulturüberständen der Hybridomazellen gereinigt werden. Hier lag der Antikörper c#6 bereits vor dem Beginn dieser Arbeit in gereinigter Form vor (Probiodrug AG). Nach Adaption der Zellen an serumfreies Medium (siehe Methoden 2.2.1.4) wurde mit der Sammlung der Zellkulturüberstände über mehrere Passagen begonnen, bis 2 L an Volumen gewonnen wurden. Anschließend wurde mit der Aufreinigung der Zellkulturüberstände über eine Protein-G-Säule begonnen (siehe Methoden 2.2.3.1). Bereits BJORCK *et al.* und REIS *et al.* konnten eine Affinität von Antikörpern zu Protein G und A nachweisen (Bjorck & Kronvall 1984; Reis *et al.* 1984), sodass diese Methode als Standardmethode zur Aufreinigung von AK etabliert wurde. Hier ist zunächst exemplarisch die AK- Aufreinigung anhand des AK c#17 gezeigt. Nach Beladung der Protein-G-Säule wurde diese

zunächst mit Bindungspuffer (Abb.3.1A: Fraktion A1-A2) und anschließend mit Waschpuffer (Abb.3.1A Fraktion A3-A5) behandelt. 24 μ l der Auftrags- als auch der Durchflussfraktion, sowie ausgewählte Fraktionen des Waschvorgangs wurden mittels einer 12 % Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) analysiert (Abb. 3.1B).

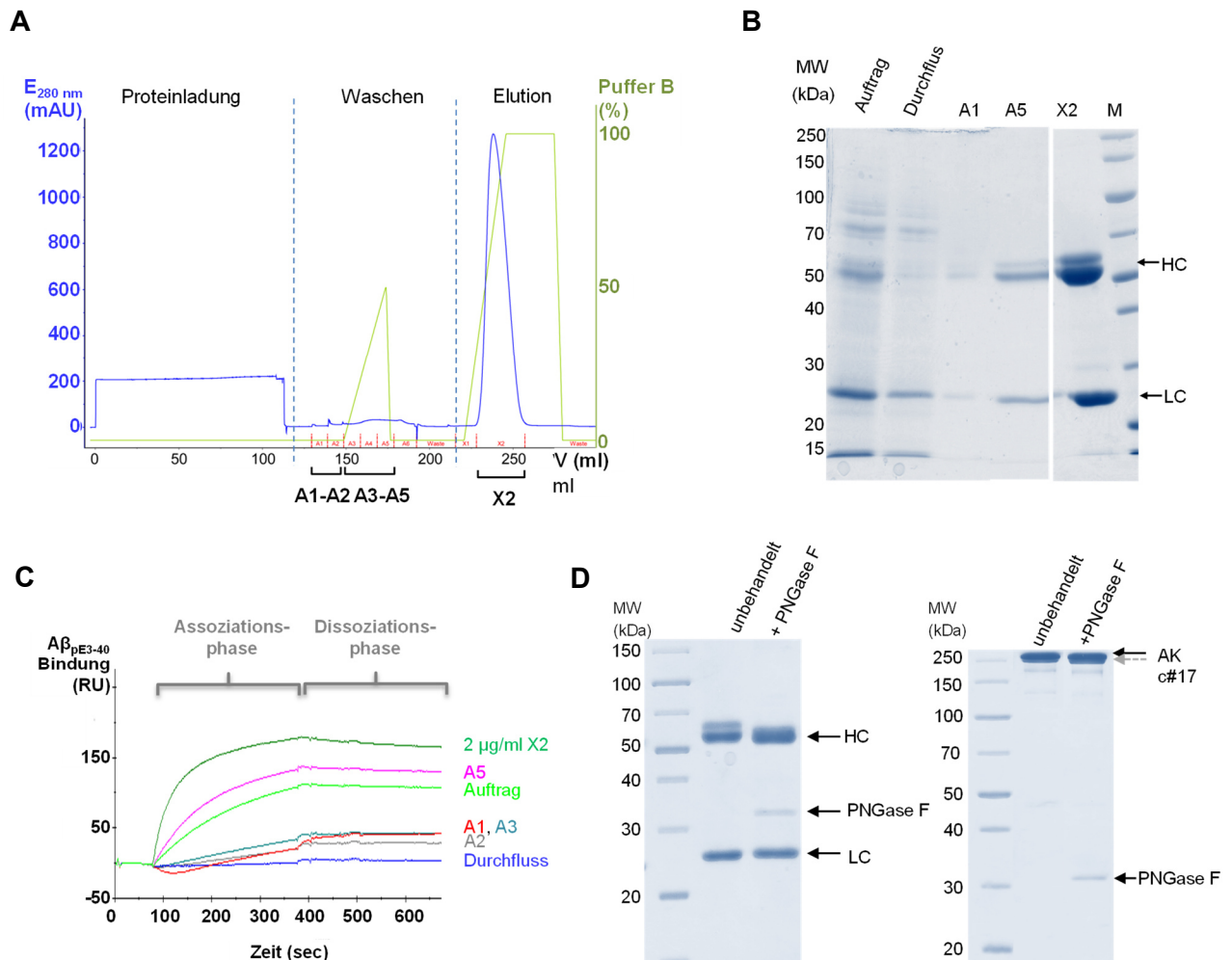


Abb. 3.1: Beschreibung der Reinigung des Antikörpers c#17 mittels Affinitätschromatographie an Protein-G (A-C) und SDS-gelelektrophoretische Analyse der Deglykosylierungsversuche des AK c#17 mit PNGase F (D)

A) Chromatogramm der serumfreien Reinigung des AK c#17 aus 2 L Zellkulturüberstand von Hybridomazellen mittels Protein G-Säule. Die Protein-G-Beladung erfolgte über Nacht bei 4°C mit einem Fluss von 1.5 ml/min. Anschließend wurde die beladene Säule mit Bindungspuffer (Fraktionen A1-A2) und Waschpuffer (A3-B5) gewaschen. Der Waschvorgang und die Elution wurden über die Einstellung eines Gradienten (2.5 ml/min, 10 min) zur Erreichung von 50 % bzw. 100 % Puffer B eingestellt. Puffer A: Bindungspuffer (20 mM Natriumphosphat, pH 7,0), Puffer B: Waschpuffer (2 M NaCl, 40 mM Natriumphosphat pH7,0) bzw. Elutionspuffer (2 M KSCN, 40 mM Natriumphosphat pH7,0). B) 24 μ l der Auftrags- und Durchflussfraktion, sowie der Waschfraktionen A1 und A5, als auch 10 μ g der Elutionsfraktion X2 wurden mittels 12 % SDS-PAGE analysiert und anschließend durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Die HC und LC unter reduzierten Bedingungen sind gekennzeichnet. M = Marker C) Aktivitätsnachweis von $A\beta_{PE3}$ -spezifischen AK c#17 in den erhaltenen Fraktionen aus der Affinitäts-chromatographie an Protein-G mittels OPR: Die Assoziationsphase beschreibt die Bindung des AK an den gekoppelten Chip, währenddessen mit Eintritt der Waschvorgangs die Dissoziationsphase gestartet wird. Die Höhe der Plateauphase in der Dissoziationsphase beschreibt die AK-Bindung in RU und ist proportional zur AK-Menge in der Fraktion. D) Behandlung des AK c#17 mit PNGase F (A). Visualisierung mittels einer 12 % reduzierenden (links) und einer 10 % nicht-reduzierenden SDS-PAGE (rechts). Unter nicht-reduzierenden Bedingungen bleibt der Antikörper (AK) intakt und migriert zwischen 150-250 kDa mit einem berechneten Molekulargewicht von ~150 kDa. PNGase F besitzt ein Molekulargewicht von ungefähr 36 kDa.

Unter reduzierenden Bedingungen werden alle intra- als auch intermolekulare Disulfidbrücken gespalten, sodass die AK in ihre einzelnen Ketten zerfallen. Die LC wird somit von der HC getrennt. Die in der 12 % SDS-PAGE-detektierten Banden in der Elutionsfraktion X2 migrieren bei einer Höhe von ~25 kDa und ~60 kDa, entsprechend der ungefähr erwarteten Größe der LC (berechnetes MW = 24 kDa) und HC (berechnetes MW = 50 kDa) (Abb. 3.1B) des A β_{pE3} -spezifischen AK c#17. Zudem ist eine Doppelbande der schweren Kette zuerkennen, welches auf eine inhomogenen Glykosylierung der schweren Kette hinweist. Um dies zu untersuchen wurden anschließende Deglykosylierungsexperimente durchgeführt (Abb. 3.1D).

Es ist zu erkennen, dass mit Zugabe von 50 % Waschpuffer (2 M NaCl, 40 mM Natriumphosphat pH 7,0) teilweise gebundener AK von der Protein-G-Säule eluiert wird (Abb. 3.1B, Fraktion A5). Trotz des Verlustes an A β_{pE3} -spezifischen AK wurde auf diesen Waschschrift nicht verzichtet, um sicherzustellen, dass nicht detektierbare unspezifisch gebundene Proteine von der Säule entfernt werden. Die Gesamtmenge an gewonnenem gereinigtem Protein in Fraktion X2 beträgt ~24 mg, sodass eine Ausbeute von 12 mg/L Zellkulturüberstand zu verzeichnen ist.

Die Produktion der AK c#6 und c#24 fand ebenfalls in Serum-freien Medium statt (siehe Anhang. Abb. 6.1). Demzufolge ist eine Kontamination der gereinigten Proteine mit bovinem IgG auszuschließen.

Die Aktivität der einzelnen Fraktionen wurde mittels Oberflächenplasmonresonanz (OPR) überprüft. Dazu wurde ein Sensorchip verwendet, auf dem das humane A β_{pE3-40} Peptid kovalent gekoppelt vorlag (siehe Methoden 2.2.4.1). Die Proben der einzelnen Fraktionen (1:100 verdünnt) als auch eine definierte Konzentration der Elutionsfraktion (2 μ g/ml) wurden auf ihr Bindungsverhalten überprüft. Die Bindung des Antikörpers erfolgte über die Injektion der Proben auf den OPR-Sensorchip und wurde mittels eines Sensograms aufgezeichnet, sodass zunächst die Assoziationsphase dargestellt wurde (Abb. 3.1C). Mit der Beendigung der Injektion und Waschung des gekoppelten Sensorchips begann die Dissoziationsphase des gebundenen Antikörpers. Allerdings wurde durch die erneute Bindung des AK an den A β_{pE3-40} -Sensorchip nach Dissoziation die Höhe des Signals nicht verändert, sodass eine Plateauphase erschien. Dieser Effekt wird als permanenter Massentransfer bezeichnet. Es ist jedoch anzunehmen, dass die Menge an intaktem Antikörper in der jeweiligen Fraktion mit der A β_{pE3} -Bindung (gemessen in RU) und somit mit der Höhe des Plateaus in der Dissoziationsphase korreliert. Im Durchfluss konnte keine A β_{pE3} -Bindung detektiert werden, währenddessen in der Auftragsfraktion eine A β_{pE3} -Bindung von ~ 100 RU gemessen wurde, was für die Präsenz von A β_{pE3} -spezifischen-AK im Zellkulturüberstand spricht. Während der Behandlung des an die Protein-G-Säule gebundenen AK wurden ebenfalls AK-Moleküle eluiert, die in den Fraktionen A1-A5 in der OPR-Messung detektiert wurden. Waschfraktion A5 zeigte dabei ein Signal von ~120-150 RU in der OPR-

Messung und weist ebenfalls auf eine vorzeitige Elution des AK von der Säule durch die Zugabe von hochmolarem Salzpuffer (2 M NaCl, 40 mM Natriumphosphat pH 7,0) hin.

Da die Präsenz und Menge des detektierten Proteins mittels SDS-PAGE in den Wasch- als auch in den Elutionsfraktionen (Abb. 3.1B A1-A5, X2) mit der A β_{pE3} -Bindung in der OPR-Messung korrelierte, konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem gereinigten Protein um einen A β_{pE3} -bindenden Antikörper handelte. Die Reinigung des AK c#24 wurde in gleicher Form durchgeführt, sodass für weitere Studien sowohl c#6, c#17 als auch c#24 in gereinigter Form vorlagen. Die Proben wurden zur Analyse auf ein 12 % SDS-Polyacrylamidgel unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetragen, um die Präsenz des assemblierten AK zu überprüfen (siehe Anhang Abb. 6.2). Die Proben aller drei gereinigten AK zeigten eine Bande zwischen 150 und 250 kDa. Vergleichend dazu beträgt das berechnete Molekulargewicht (MW) von c#6 146 kDa, für c#17 bei 148 kDa und für c#24 bei 145 kDa (siehe auch Methoden 2.2.3.2, Tab. 2.5).

Die Präsenz einer Doppelbande der HC des Antikörpers c#17 auf einer Höhe von ca. 60 kDa unter reduzierenden Bedingungen könnte das Auftreten von verschiedenen Glykosylierungsformen beschreiben, da dies bereits für AK in der Literatur gezeigt werden konnte (Grebenu *et al.*, 1992; Jefferis 2009; Kunkel *et al.* 1998). Um dies zu analysieren, wurde der AK mit PNGase F (Peptid-N-Glycosidase F) behandelt (Abb. 3.1D), welche zwischen dem innersten N-Acetylglukosamin von höheren Mannose-, Hybrid- und komplexen Oligosacchariden und dem Asparaginrest von N-glykosidischen Bindungen in Glykoproteinen spaltet. Durch die Behandlung des Antikörpers c#17 mit PNGase F verschwindet die Doppelbande der HC (Abb. 3.1D links) und die untere HC-Bande weist eine etwas schnellere Migration, was für ein niedrigeres Molekulargewicht spricht. In der nicht-reduzierenden SDS-PAGE ist ebenfalls eine leichte Reduktion des Molekulargewichts des AK nach Zugabe von PNGase F zu verzeichnen (Abb. 3.1D rechts). Für weiter Analysen wurden jedoch Antikörper verwendet, die nicht deglykosyliert wurden.

3.1.2 Herstellung der F_{ab}-Fragmente

Für die strukturelle Analyse sollten zunächst kleinere Antikörperfragmente hergestellt werden, da gezeigt werden konnte, dass sich diese Fragmente leichter kristallisieren lassen (Rossi 1968; Rossi *et al.* 1969; Poljak 1973). Dazu wurde der Antikörper mit der Cysteinprotease Papain oberhalb seiner Gelenkregion gespalten (siehe Methoden 2.2.3.5). Die Generierung der F_{ab}-Fragmente wurde mittels nicht-reduzierter und reduzierter SDS-PAGE (Abb. 3.2) überprüft.

Anaysiert man die Proben des Reaktionsansatzes unter nicht-reduzierten Bedingungen mittels einer 12 % SDS-PAGE, so kann man die Entstehung von mehreren Fragmenten beobachten. Währenddessen der ungespaltene Antikörper bei einer ungefähren Größe von 150 kDa migriert

(Abb. 3.2A, Spur 2, 4, 6), ist das F_{ab} -Fragment des Antikörpers c#6 und c#24 im Polyacrylamid-Gel bei einer Größe von unter 40 kDa zu detektieren und bewegt sich unterhalb des von ihm abgetrennten $2xF_c$ -Fragments (Abb. 3.2A, Spur 3 und 5), wobei die Zuordnung der Fragmente erst nachträglich durch das anschließende Trennungsverfahren erfolgte (siehe Abb. 3.3 und Anhang Abb. 6.4). Das entstandene F_{ab} -Fragment des Antikörpers c#17 hingegen migriert bei etwa 50 kDa und läuft somit oberhalb des $2xF_c$ -Fragments (Abb. 3.2A, Spur 7).

Es ist beschrieben, dass in Abhängigkeit der Konzentration des freien Cysteins und Papains die Bildung von entweder einem $2xF_c$ -Fragment oder zwei F_c -Fragmenten divergiert (Adamczyk *et al.* 2000). Nach Papainbehandlung ist ein dominantes Fragment bei einer Größe von 45-50 kDa zu detektieren (Abb. 3.2A, Spur 3, 5 und 7), allerdings sind auch Fragmente bei ca. 20-25 kDa zu beobachten, sodass angenommen werden kann, dass eine Mischung aus $2xF_c$ -Fragmenten und Einzel- F_c -Fragmenten im AK-Spaltungsansatz existieren. Darüber hinaus konnte ein Fragment bei 100 kDa detektiert werden, dessen Entstehung bereits von ADAMCZYK *et al.*, 2000 bei der Behandlung von IgG2b-Antikörpern mit Papain beschrieben wurde. Dabei handelt es sich vermutlich um das so genannte $F_{ab/c}$ -Fragment, welches durch eine unsymmetrische einseitige Spaltung des Antikörpers zustande kommt (siehe Diskussion, Abb. 4.1). Unter reduzierten Bedingungen sind mit Hinblick auf c#6 neben der leichten Kette zwei zusätzliche Fragmente zu identifizieren. Die Identität des Fragments, welches auf einer Höhe von unter 30 kDa läuft, konnte mittels Massenspektrometrie (siehe Anhang Abb. 6.3) dem F_d -Fragment eindeutig zugeordnet werden. Somit muss es sich bei dem verbleibenden Fragment, welches bei einer Höhe von über 30 kDa migriert, um das F_c -Fragment handeln.

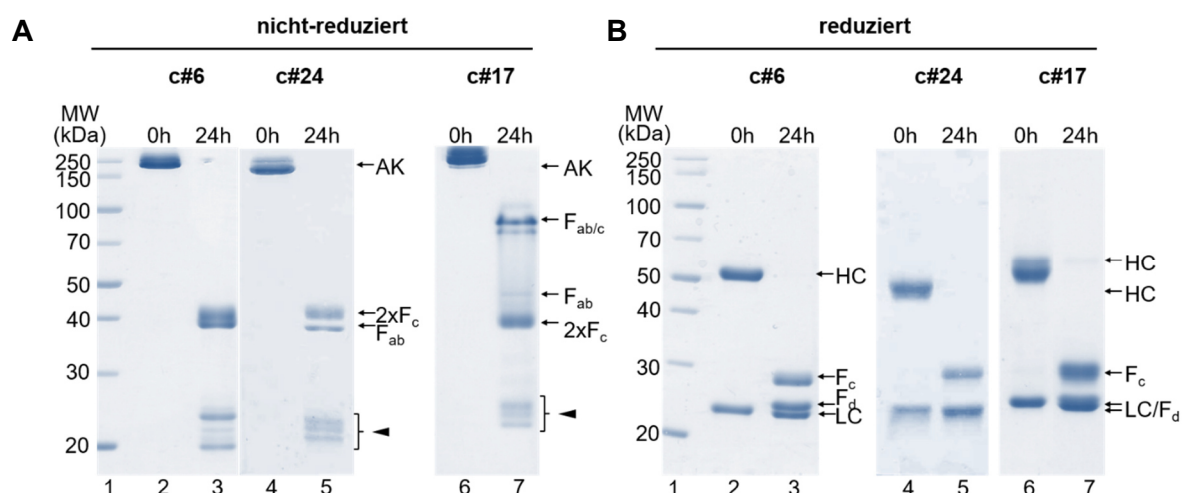


Abb. 3.2: SDS-PAGE zur Analyse der Antikörperspaltung durch die Cysteinprotease Papain

Nach 24 Stunden wurde der Antikörperverdau mittels nicht-reduzierter (A) und reduzierter (B) 12 % SDS-PAGE analysiert. Je $5 \mu\text{g}$ der Probe wurde aufgetragen. A) Unter nicht-reduzierten Bedingungen migriert der ungespaltene Antikörper (AK) bei ca 150 kDa (Spur 2, 4 und 6). Nach Antikörperspaltung (Spur 3, 5 und 7) können zwei Banden detektiert werden, die den Fragmenten $2xF_c$ und F_{ab} zugeordnet werden können. Darüber hinaus entstehen mit Verdau des Antikörpers c#17 das $F_{ab/c}$ -Fragment. Zusätzliche Fragmente zwischen 20 und 30 kDa konnten keinem möglichen Entstehungsprodukt zugeordnet werden (\blacktriangle). B) Unter reduzierten Bedingungen wird der unbehandelte Antikörper in schwere Kette (HC) und leichte Kette (LC) zerlegt (Spur 2,4 und 6). Nach Papainbehandlung entsteht neben der leichten Kette das F_c - und das F_d -Fragment, welches bei der Antikörperspaltung von c#6 aufgrund des unterschiedlichen Laufverhaltens eindeutig den Banden zugeordnet werden kann. Bei der Papainbehandlung der Antikörper c#24 und c#17 läuft das F_d -Fragment auf gleicher Höhe wie die leichte Kette (LC).

Trägt man den Ansatz der mit Papain-gespaltenen Antikörper c#24 und c#17 unter reduzierten Bedingungen auf, so erhält man nur zwei unterschiedlich große Banden (Abb. 3.2B), deren Identität anhand der nachfolgenden Affinitätschromatographie ermittelt werden konnte (siehe Anhang Abb. 6.4 - 6.5). Demzufolge migriert das F_d -Fragment auf gleicher Höhe wie die leichte Kette bei einer Größe von 25 kDa, währenddessen das F_c -Fragment auf der Höhe von ca. 30 kDa zu finden ist, trotz einer annähernd gleichen molaren Masse von 25 kDa. Die berechneten Größen der Fragmente sind im Methodenteil Absatz 2.2.3.2. Tab. 2.5 nachzulesen.

Zur nachfolgenden Trennung des F_{ab} -Fragments von dem F_c -Fragment wurde erneut die Affinitätschromatographie verwendet (siehe Methoden 2.2.3.6). DERRICK and WIGLEY konnten bereits zeigen, dass Protein G das F_{ab} -Fragment von murinen IgG1-AK bindet, sodass erneut die Protein-G-Matrix als Bindungspartner im folgenden Reinigungsverfahren gewählt wurde (Derrick & Wigley 1992). Exemplarisch soll die Trennung der beiden Fragmente des Antikörpers c#6 gezeigt werden. Jeweils 18 μ l der fraktionierten Proben wurden anschließend mittels reduzierender 12 % SDS-PAGE analysiert (Abb. 3.3B links). Das F_c -Fragment, welches bei 30 kDa migriert, konnte somit im Durchfluss detektiert werden (Spur 2-7), wohingegen das F_{ab} -Fragment, bestehend aus leichter Kette und F_d -Fragment, mehrheitlich an der Protein-G-Matrix gebunden hat, sodass es anschließend durch saure Elution in den Fraktionen B10 bis C1 (Abb. 3.3B links, Spur 13-16) separat gesammelt werden konnte.

Vergleicht man nun unter nicht-reduzierenden Bedingungen die gereinigte Fraktion B10 (Abb. 3.3B rechts, Spur 20), mit dem ursprünglichen Auftrag (Abb. 3.3B rechts, Spur 19), in dem sich noch beide Fragmente (F_{ab} -Fragment und F_c -Fragment) befanden, so ist zu erkennen, dass das gereinigte F_{ab} -Fragment die untere Bande des Auftrags darstellte, sodass es sich bei der oberen Bande um das $2x F_c$ -Fragment handeln musste. So war es mit Hilfe dieses Trennungsverfahrens neben der Analyse mittels Massenspektrometrie möglich, die entstandenen Banden den Fragmenten zuzuordnen. Anschließend wurden die Fraktionen A11 bis C1 vereinigt und für eine Größenausschlusschromatographie vorbereitet (siehe Methoden 2.2.3.7), um geringe Mengen vom ungespaltenen Antikörper zu entfernen. Die Reinigung des F_{ab} -Fragments von Antikörper c#17 und c#24 lief unter gleicher Verfahrensweise ab, sodass auch hier eine eindeutige Zuordnung der Proteinbanden möglich war (siehe Anhang, Abb. 6.4 – Abb.6.6). Jedoch konnte beobachtet werden, dass im Gegensatz zu c#6 das F_{ab} -Fragment des IgG2b Antikörpers c#17 nicht an der Protein-G-Matrix gebunden hatte, hingegen aber das $2x F_c$ -Fragment (Anhang Abb. 6.5 und 6.6), so dass ebenfalls eine Trennung der beiden Fragmente erfolgen konnte.

Die gereinigten F_{ab} -Fragmente wurden nach Gelfiltration zum einen für Affinitätsanalysen mittels Isothermaler Titrationskalorimetrie verwendet und zum anderen für Kristallisationsversuche vorbereitet.

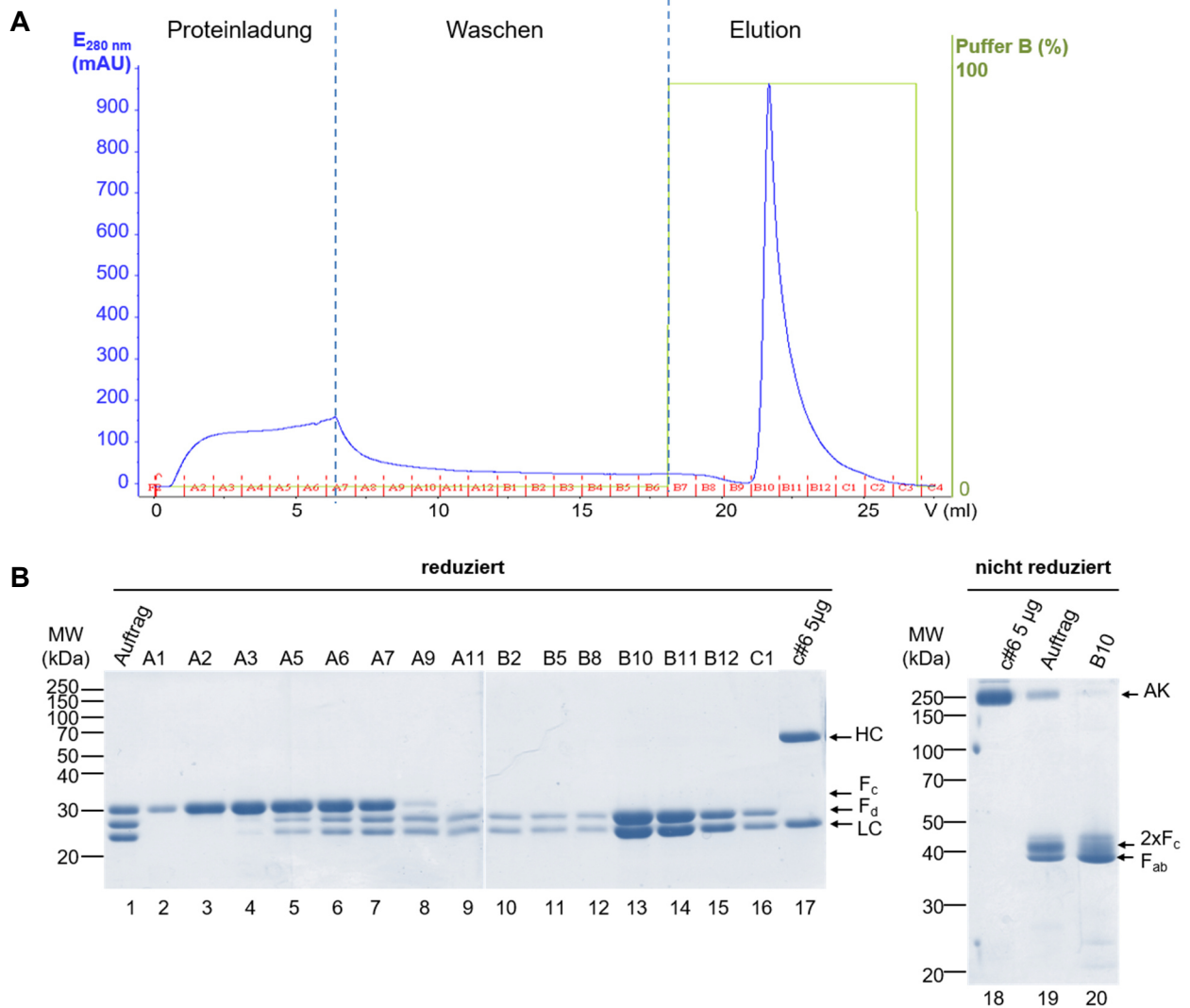


Abb.3.3: Chromatographische Darstellung der Abtrennung des F_{ab} -Fragments c#6 vom $2x F_c$ -Fragment mittels Affinitätschromatographie an Protein G und SDS-PAGE

Der verdauten Antikörper c#6 wurde auf eine Protein-G-Säule geladen. Nach Proteinbeladung von 6 ml begann eine sofortige Fraktionierung in 1 ml Volumen. A) Chromatogramm: Während der Säulenbeladung und Waschung hat ein Teil des Proteins nicht an der Protein-G Säule gebunden. Durch die Beladung von 18 μ l jeder Fraktion mittels einer reduzierenden 12 % SDS-PAGE (B) konnte das F_c -Fragment in den Fraktionen A1-A9 (Spur 2-8) detektiert werden. Nach der Elution ist ein dominanter Peak (Fraktion B10 – C1) im Chromatogramm zusehen (A), welcher mittels SDS-PAGE (B, Spur 13-16) als das F_{ab} -Fragment, bestehend aus LC und F_d -Fragment, identifiziert werden kann. Analysiert man vergleichend den Proteinauftrag und die Peakfraktion B10 mittels einer nicht-reduzierenden 12% SDS-PAGE, so ist zu erkennen, dass es sich bei der unteren Bande in Spur 19 bei einer Höhe von unter 40 kDa um das F_{ab} -Fragment handeln muss, da dies auch in der gereinigten B10 Fraktion (Spur 20) vorkam, währenddessen die obere Bande mit einer Migrationshöhe von über 40 kDa das $2x F_c$ -Fragment darstellt.

3.1.3 Sequenzvergleich drei $\text{A}\beta_{\text{pE3}}$ - spezifischer Antikörper

Die Analyse der variablen Regionen der leichten und schweren Kette in Hinblick auf die Zuordnung zu einer Genfamilie wurde mittels der *Immunogenetics*-Bibliothek (siehe Material Methoden: 2.2.2.10) durchgeführt. Die Gendiversität der variablen Bereiche der murinen Antikörper umfasst für den Kappa-Typ der leichten Kette 19 (IGKV 1-19) (Martinez & Lefranc 1998) und für die schwere Kette 16 Untergruppen (IGHV1-16) (Riblet 2003). Die variablen Regionen der leichten Ketten von c#6, c#24 und c#17 können der Genfamilie IGKV1 zugeordnet werden. Die variable Region der schweren Kette von c#6 und c#24 gehört zur Genfamilie IGHV1, währenddessen V_H von c#17 in die Genfamilie IGHV5 eingeordnet wird. So ist nach den ersten Analysen bereits sichtbar, dass sich der Antikörper c#17 von den anderen beiden Antikörpern anhand seiner differentiellen Antikörperunterklasse IgG2b und einer anderen IGHV-Genfamilie IGHV5 unterscheidet.

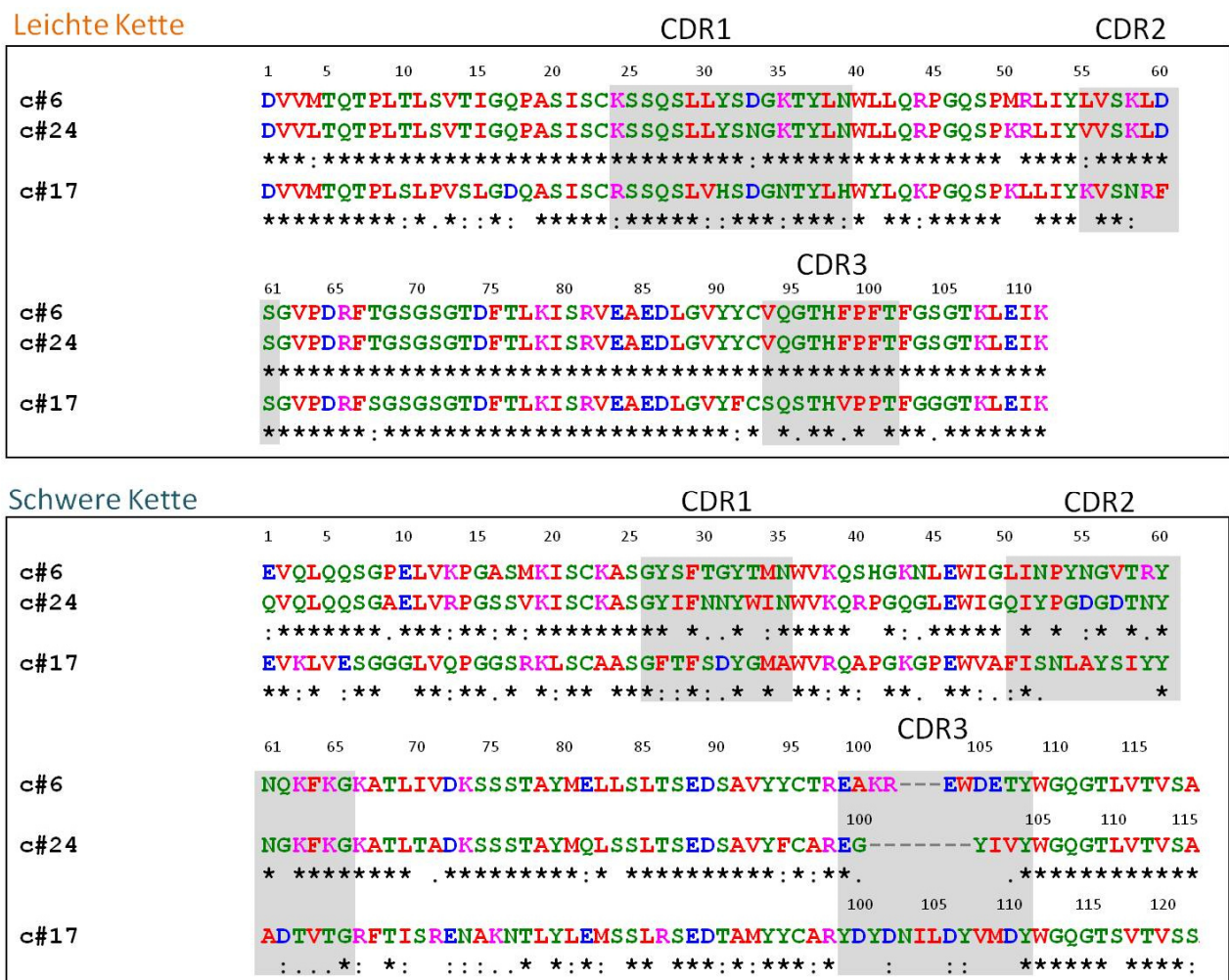


Abb. 3.4: Vergleich der Aminosäuresequenzen der variablen Regionen der leichten und schweren Kette der $\text{A}\beta_{\text{pE3}}$ -spezifischen AK c#6, c#24 und c#17

Die variablen Regionen der Aminosäuresequenzen von AK c#6, c#24 und c#17 wurden mittels der *alignment software* Clustal W miteinander verglichen. Dazu diente die AS-Sequenz des c#6 als Matrize. Die Sequenz der Komplementaritäts-bestimmenden-Regionen (CDR) ist grau eingerahmt. Identische AS sind mit einem „*“ gekennzeichnet, währenddessen Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften mit einem „:“ und mit weniger ähnlichen Eigenschaften mit einem „.“ markiert sind. Der AS-Farbcodex steht für folgende Merkmale: blau - saure AS; rot - kleine hydrophobe AS inklusive aromatische AS außer Tyrosin; magenta - basische AS außer Histidin; grün - AS mit Hydroxyl-, Sulfhydryl- und Amingruppen und Glycin.

Mittels Genotypisierungsexperimente der Antikörper (siehe Methoden 2.2.2.1 - 2.2.2.9) kann gezeigt werden, dass sich alle drei Antikörper in ihren Aminosäuresequenzen der variablen Domänen unterscheiden. Lediglich die Sequenz der leichten Kette des Antikörpers c#6 ist der leichten Kette des Antikörpers c#24 sehr ähnlich und unterscheidet sich nur in 4 Aminosäuren, darunter 2 Aminosäuren in den CDRs (Abb. 3.4). Die Längen der fünf von sechs CDRs ist in allen drei Antikörpern gleich ist, jedoch weist CDR3 der schweren Kette variable Längen auf. Die variablen Domänen der LC bzw. der HC des AK c#24 zeigte eine Sequenzidentität von 96 % bzw. 71 %, währenddessen die LC bzw. der HC des AK c#17 eine geringere Sequenzübereinstimmung von 77 % bzw. 43 % zum AK c#6 aufzeigen (siehe Anhang).

3.2 Interaktionsstudien und Spezifitätsanalysen der A β _{pE3}-spezifischen Antikörpern

3.2.1 Die Antikörper weisen unterschiedliche Assoziations- (k_{on}) bzw. Dissoziationsraten (k_{off}) in den OPR-Analysen auf

Um die Bindungseigenschaften aller drei Antikörper gegenüber dem humanen A β _{pE3}-Peptid zu analysieren, wurden kinetische Messungen mittels der OPR-Methode durchgeführt. Es konnte zuvor beobachtet werden, dass es mit Verwendung des A β _{pE3-40}-Sensorchips während der Dissoziationsphase zu einer erneuten Bindung des bereits dissoziierten Antikörpers kam, sodass lediglich eine Plateauphase anstelle einer Signalabnahme im Sensogram detektiert wurde. Die Ursache kann an der sterischen Behinderung der AK-Moleküle an der Sensorchipoberfläche als auch an der erneuten Assoziation der AK an den Liganden (auch als permanenter Massentransfer bezeichnet) nach bereits erfolgter Dissoziation liegen. Beide Artefakte treten auf, wenn hohe Konzentrationen des freien Bindepartners verwendet werden. Zudem soll zur Bestimmung eines K_D -Wertes ein einbindiges Modell verwendet werden (siehe Methoden 2.2.4.2). Somit muss ein Aviditätseffekt, bei dem der AK über beide verfügbaren Bindungsstellen an zwei gekoppelte Peptide gleichzeitig binden kann, ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund wurde nicht wie in 3.1.2 ein A β _{pE3-40}-Sensorchip verwendet, sondern ein Sensorchip mit einem α -Mausantikörper gekoppelt, welcher als Fänger für die murinen A β _{pE3}-spezifischen Antikörper dienen sollte. Somit kann die Bindung des A β _{pE3-18}-Peptids über kinetische Messungen analysiert werden. Diese Methode sollte den permanenten Massentransfer des freien Bindungspartners verringern, da niedrigere Ligandenkonzentrationen aufgrund der geringen Größe des Peptids für die kinetische Messung notwendig sind und zusätzlich ein Aviditätseffekt von vornherein ausgeschlossen wird.

Nach der jeweiligen Bindung des murinen Antikörpers *c#6*, *c#24* oder *c#17* wurde das $A\beta_{pE3-18}$ -Peptid in der jeweiligen Peptidkonzentration dem gekoppelten OPR-Chip zugeführt. Durch die Aufzeichnung eines Sensogramms konnte die Bindung des Peptids an den immobilisierten murinen $A\beta_{pE3-18}$ -spezifischen Antikörper verfolgt werden. Die Bindung des Peptids kann in Assoziationsphase und Dissoziationsphase unterteilt werden (Abb. 3.5 A). Nach vollständiger Injektion des $A\beta_{pE3-18}$ -Peptids, welche mit der Dauer der Assoziationsphase korreliert, fand im Anschluss eine Sensorchipbehandlung mit HBS-EP-Puffer statt, welche ermöglicht, das Dissoziationsverhalten des $A\beta_{pE3-18}$ -Peptid vom murinen Antikörper zu untersuchen (Dissoziationsphase). Als Negativkontrolle wurde das $A\beta_{pE3-18}$ -Peptid mit einer maximalen Konzentration von 50 nM zum unbeladenen Sensorchip gegeben, welcher nur mit dem primären AK (pAK) gekoppelt vorlag. Dabei konnte keine Bindung detektiert werden (Abb. 3.5.D).

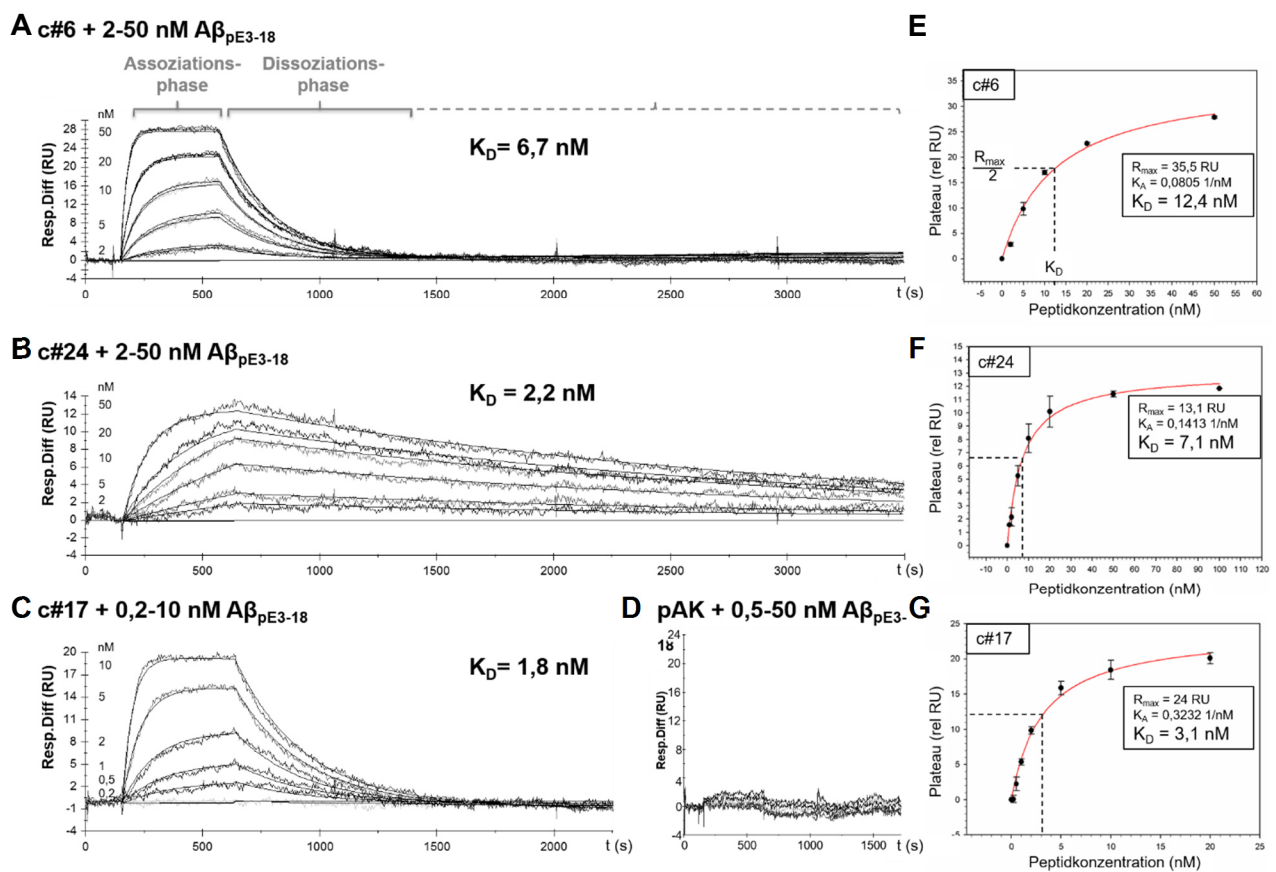


Abb. 3.5: Sensogramme zur K_D -Wertbestimmung der $A\beta_{pE3}$ -spezifischen AK zum $A\beta_{pE3-18}$ -Peptid mittels OPR-Messung

A-C) Transitionen der immobilisierten murinen Antikörper *c#6*, *c#24* und *c#17* nach Zugabe von ansteigenden Konzentrationen des $A\beta_{pE3-18}$ -Peptids. Mittels einem einbindigen Modells der Biacore 3000 Software wurde diesen Transitionen eine Kurve angepasst, die eine Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten k_{on} und k_{off} ermöglicht. Die Ermittlung des K_D -Wertes erfolgte durch $K_D = k_{off}/k_{on}$ (siehe auch Tab. 3.1). D) Zusätzlich wurde getestet, ob das $A\beta_{pE3-18}$ -Peptid an den primären AK (pAK) bindet. E-G) Auftragung der mittels OPR-Messung ermittelten relativen RU-Werte der Plateauphase gegenüber der eingesetzten Peptidkonzentration. Die Ermittlung des K_D -Wertes erfolgte hierbei durch die Ermittlung einer den Punkten angepassten hyperbolen Kurve mit der Gleichung $R_{eq} = (R_{max} \cdot K_A \cdot c) / (1 + K_A \cdot c)$ siehe Methoden 2.2.4.2. $K_D = 1/K_A$

Die Assoziationsphase (Abb. 3.5A) beinhaltet sowohl die Bindung des Peptids an den immobilisierten Antikörper, als auch dessen Dissoziation. Nach Zugabe des Peptids erreicht sie ein Plateau, welches die Menge an gebundenem Peptid im Gleichgewicht repräsentiert. Die Dissoziationsphase hingegen beinhaltet nur die Dissoziation des Peptids, sodass sie die Bindungsaffinität des Antikörpers zum Peptid widerspiegelt. Mit der Verwendung von ansteigenden Peptidkonzentrationen konnte jeweils eine neue Transition aufgezeichnet werden. Mit Hilfe des einbindigen Modells (siehe Methoden 2.2.4.2) konnte den Transitionen eine Kurve angepasst werden, die die Geschwindigkeitskonstanten k_{on} und k_{off} ermittelt (Tab. 3.1). Diese Parameter wurden zum einen zur Berechnung des K_D -Wertes ($K_D = k_{off}/k_{on}$) genutzt, deren Affinität zum $A\beta_{pE3-18}$ -Peptid bei allen drei AK in der gleichen Größenordnung zwischen 2 und 7 nM liegt. Sie spiegeln andererseits aber auch das Bindungsverhalten des Peptids zum AK wieder. So beschreibt der k_{off} -Wert, mit welcher Geschwindigkeitskonstante das $A\beta_{pE3-18}$ -Peptid vom murinen Antikörper dissoziiert.

Tab. 3.1: K_D -Werte zwischen $A\beta_{pE3-18}$ -spezifischen AK und $A\beta_{pE3-18}$ -Peptid berechnet mittels der ermittelten k_{on} und k_{off} -Werten der OPR-Messung

AK c#	k_{on} ($\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{l}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (nM)
6	$6,89\cdot 10^5$	$4,58\cdot 10^{-3}$	6,7
24	$1,76\cdot 10^5$	$0,38\cdot 10^{-3}$	2,2
17	$19,5\cdot 10^5$	$3,46\cdot 10^{-3}$	1,8

Vergleicht man nun die k_{off} -Werte aller drei Antikörper (Tab. 3.1), so ist zu erkennen, dass der k_{off} -Wert von AK c#24 zum $A\beta_{pE3}$ -Peptid etwa um ein 10-faches niedriger liegt, als der k_{off} -Wert von c#6 und c#17. Diese Beobachtung wird auch in den Sensogrammen (Abb. 3.5B) deutlich, die eine Verlängerung der Dissoziationsphase mit Verwendung des murinen Antikörpers c#24 erkennen lässt.

Trägt man die RU-Werte der Plateauphase in Abhängigkeit der Peptidkonzentrationen auf, ist ein hyperboler Verlauf zu erkennen (siehe Abb. 3.5E-G). Da der Antikörper an der OPR-Chipoberfläche gekoppelt ist und das Peptid die frei-in-Lösung bewegliche Komponente darstellt, ist ein Aviditätseffekt ausgeschlossen. Die Berechnung der den Werten angepasste Kurve ist im Material und Methodenteil (Abschnitt 2.2.4.2, Abb. 2.1) dargestellt. Wie in Abb. 3.5E-G gezeigt, konnte anhand der für die Bindung des $A\beta_{pE3-18}$ -Peptids an die Antikörperbindetasche des c#6, c#24 und c#17 die Dissoziationskonstante K_D aus dem Kehrwert der ermittelten Assoziationskonstante K_A ermittelt werden. Die erhaltenen K_D -Werte entsprechen in etwa den ermittelten Werten aus dem einbindigen Modell der Biacore 3000 Software (Tab. 3.1).

Zusammengefasst konnte beobachtet werden, dass alle drei murinen $A\beta_{pE3}$ -spezifischen Antikörper zwar eine ähnliche Affinität zum $A\beta_{pE3}$ -Peptid besitzen, jedoch unterschiedliche Bindungskinetiken.

3.2.2 Spezifität der drei verschiedenen Antikörper

Mit der OPR-Methode sollte ebenfalls getestet werden, wie spezifisch die zu untersuchenden AK gegenüber dem humanem $A\beta_{pE3}$ -Peptid sind. Dazu wurden $A\beta$ -Peptide verwendet, die N-terminal sowohl dem humanen nichtmodifizierten Peptid entsprechen ($A\beta_{1-18Pbio}$) als auch davon ausgehend N-terminale Verkürzungen beinhalten ($A\beta_{2-18Pbio}$, $A\beta_{3-18}$, $A\beta_{4-18Pbio}$). Zudem wurde ein Peptid verwendet, das murine $A\beta_{pE3-18Pbio}$ ($mA\beta_{pE3-18Pbio}$), welches das Homologe des humanen $A\beta_{pE3}$ in dem Modellorganismus Maus darstellt. Die Bindungsmessungen mit dem $A\beta_{1-18}$ und $A\beta_{4-18}$ zeigten mit allen drei Antikörpern keine Interaktion (siehe Tab. 3.2), allerdings konnte mit dem $A\beta_{2-18}$ und dem murinen $A\beta_{pE3-18}$ eine Bindung zum AK c#17 erfasst werden, dessen K_D -Wert (>293 nM bzw. 19 nM) mittels des einbindigen Modells der Biacore 3000 Software ausgewertet werden konnte (siehe Abb. 3.6C und Tab. 3.2). Eine definierte Bindung mit den anderen beiden Antikörpern c#6 und c#24 zum $A\beta_{2-18}$ konnte jedoch nicht detektiert werden.

Tab. 3.2: Untersuchung der AK-Spezifität von c#6, c#24 und c#17 gegenüber dem $A\beta_{pE3}$ -Peptid mittels der Verwendung von sequenzabweichenden $A\beta_{x-18}$ -Peptiden in der OPR-Methode

AK c#	$A\beta$ -Peptide	k_{on} ($mol^{-1} \cdot s^{-1} \cdot l$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (nM)
6	human pE3-18 pEFRHDSGYEVHHQKLV	$6,89 \cdot 10^5$	$4,58 \cdot 10^{-3}$	6,7
24		$1,76 \cdot 10^5$	$0,38 \cdot 10^{-3}$	2,2
17		$19,5 \cdot 10^5$	$3,46 \cdot 10^{-3}$	1,8
6/24/17	human 1-18 DAEFRHDSGYEVHHQKLV	-	-	*
6	human 2-18 AEFRHDSGYEVHHQKLV	-	-	*
24		-	-	*
17		$0,096 \cdot 10^5$	$2,83 \cdot 10^{-3}$	> 293
6/24/17	human 4-18 FRHDSGYEVHHQKLV	-	-	-
6	murines pE3-18 pEFGHDSGFVRRHQKLV	-	-	*
24		-	-	*
17		$14,9 \cdot 10^5$	$28,6 \cdot 10^{-3}$	19
6	human 3-18 EFRHDSGYEVHHQKLV	$0,101 \cdot 10^5$	$5,27 \cdot 10^{-3}$	520
24		$0,0123 \cdot 10^5$	$0,657 \cdot 10^{-3}$	> 532
17		$0,632 \cdot 10^5$	$3,58 \cdot 10^{-3}$	> 57

- kein Signal

* Aufgrund niedriger Bindungssignale konnte kein K_D -Wert ermittelt werden (siehe Abb. 3.6B und C). Maximal 5 μ M Peptid wurden verwendet

Um zu untersuchen, inwieweit das N-terminale Pyroglutamat wichtig für die Bindung der drei Antikörper ist, wurde dieser Rest durch die polare Aminosäure Glutamat ausgetauscht. Dabei zeigte sich mit der OPR-Methode in allen drei an den Chip gebundenen Antikörpern c#6, c#24 und c#17 eine Bindung zum $A\beta_{3-18}$ (siehe Abb. 3.6A und Tab. 3.2). Erhöhung der Detergentkonzentration von 0,005 % (v/v) *surfactant* P20 auf 0.05 % (v/v) Tween20 bzw. Anstieg der Salzkonzentration von 150 auf 500 mM NaCl konnte diese unspezifische Bindung des $A\beta_{3-18}$ -Peptids nicht aufheben (siehe Anhang Tab. 6.2). Als Negativkontrolle wurde das $A\beta_{3-18}$ mit einer maximalen Konzentration von 20 μ M auf den Sensorchip gegeben, welcher nur mit dem primären AK (pAK) gekoppelt vorlag. Dabei wurden unspezifische Bindungen des $A\beta_{3-18}$ -Peptids bis zu einem Wert von 10 RU detektiert. Somit konnte ein unspezifisches Bindungsverhalten des $A\beta_{3-18}$ -Peptids zum primären AK nachgewiesen werden, welche die Bestimmung der K_D -Werte der AK/ $A\beta_{3-18}$ -Komplexe beeinträchtigt. Im Gegensatz dazu wurde mit dem $A\beta_{pE3-18}$ -Peptid, dem $mA\beta_{pE3-18}$ -Peptid als auch mit dem $A\beta_{2-18}$ -Peptid keine Bindung an der primären AK detektiert (siehe Abb. 3.6A, B und C). Ebenfalls konnte an die Transitionen der OPR-Messung des AK c#17 und AK c#24 mit dem $A\beta_{E3-18}$ -Peptid bzw. des AK c#17 mit dem $A\beta_{2-18}$ in der Dissoziationsphase keine exakte Kurve angepasst werden, sodass die ermittelten k_{off} -Werte und die damit verbundenen K_D -Werte vermutlich größer sind als die hier dargestellten.

Um unspezifischen Bindungsartefakte des $A\beta_{3-18}$ -Peptids in der K_D -Ermittlung auszuschließen, sollte die Bindung des $A\beta_{3-18}$ -Peptids an die $A\beta_{pE3}$ -spezifischen AK mittels der Isothermalen Titrationskalorimetrie untersucht werden (siehe Tab. 3.3, Abb. 3.7 D-F).

Mit dieser Methode konnten keine Signale einer Bindung des $A\beta$ -Peptids mit dem AK c#6 und c#24 bei 25 °C detektiert werden. Um den Effekt einer Entropie-Enthalpie-Kompensation auszuschließen, wurde diese Messung mit AK c#6 bei 30° C wiederholt, allerdings konnte auch unter diesen Bedingungen keine Bindungswärmen gemessen werden (siehe Anhang, Abb. 6.7). Im Gegensatz dazu wurde bei der Verwendung des AK c#17 mit Zugabe des $A\beta_{3-18}$ -Peptids freiwerdende Bindungsenergie dokumentiert (siehe Tab. 3.3, Abb. 3.7 F). Die entstandenen Wärme *peaks* wurden integriert und eine den Werten angepasste Kurve mit einer Stöchiometrie von $N = 2$ ermittelt, wobei die Bindungsart über unabhängige Bindestellen verläuft (*one set of sites*). Der daraus errechnete K_D -Wert von 16,3 μ M liegt 300-fach höher als der ermittelte K_D -Wert aus der OPR-Messung (57 nM).

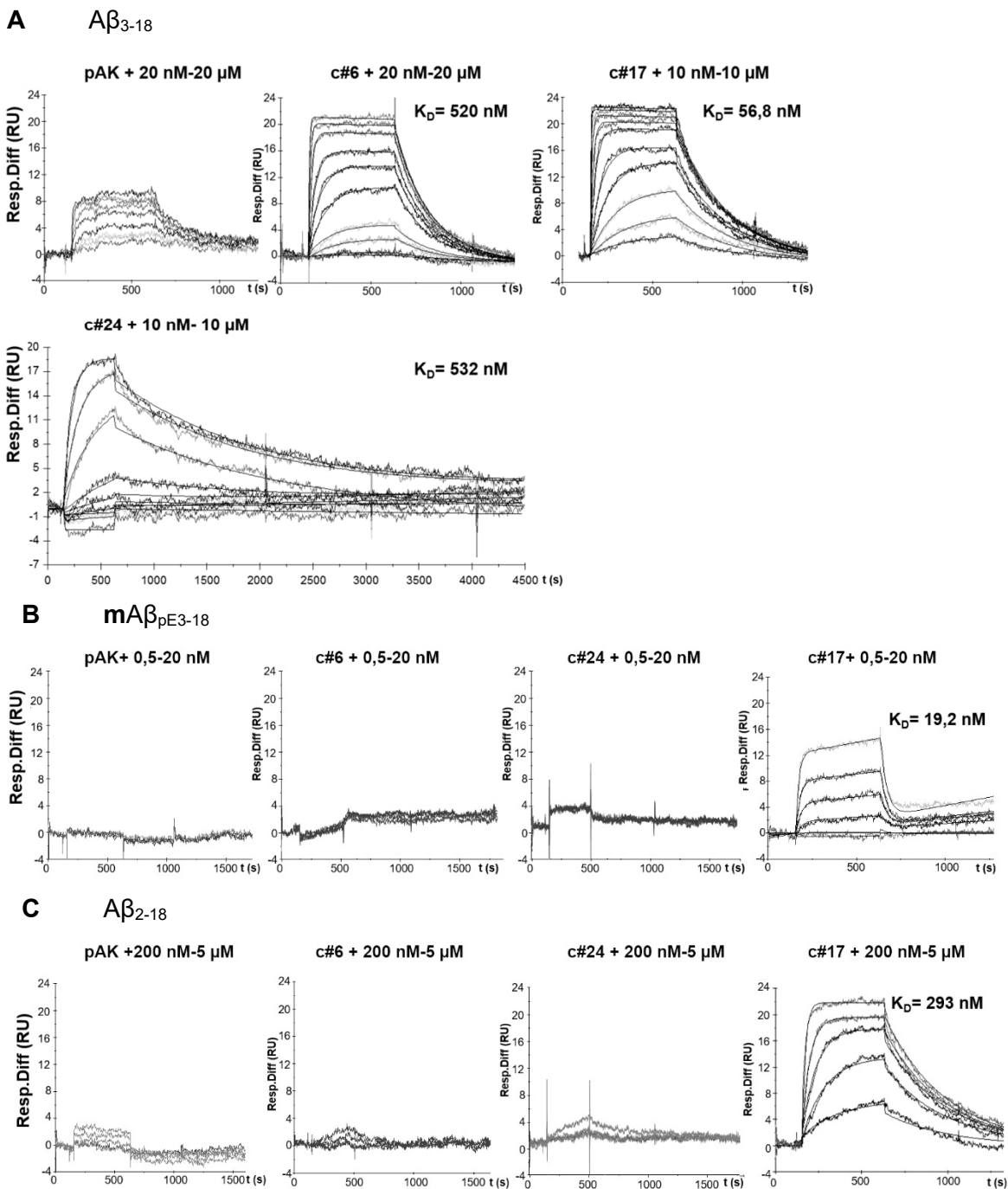


Abb. 3.6: Sensogramme zur Analyse der AK-Spezifität mittels der Verwendung von verschiedenen $A\beta_{x-18}$ -Peptiden

OPR-Messungen der Antikörper c#6, c#24 und c#17 mit $A\beta_{3-18}$ (A), $mA\beta_{3-18}$ (B) und $A\beta_{2-18}$ (C). Als Negativkontrolle wurden die genannten Peptide auch zum Sensorchip, welcher mit dem α -Maus-AK (primärer AK, pAK) gekoppelt vorlag, zugegeben.

3.2.3 Affinitätsbestimmung der Antikörper F_{ab}-Fragmente c#6, c#24 und c#17 zum A β _{pE3-18} mittels ITC

Da es sich bei den OPR-Analysen um ein System handelt, bei dem eine Komponente des Bindungskomplexes an eine Matrix gebunden ist und so das Bindungsereignis nicht dem natürlichen Aufeinandertreffen von Antikörper und Antigen im Organismus entspricht, sollten die Bindungskonstanten ebenfalls mittel ITC, also in einer vollständig löslichen Umgebung, überprüft werden. Die thermodynamischen Parameter wurden zwischen dem F_{ab}-Fragment und dem A β _{pE3-18}-Peptid gemessen, sodass ein äquimolare Bindung von AK und Ligand mit einer Bindungsart über unabhängige Bindungsstellen (*one set of sites*) zugrunde gelegt werden kann.

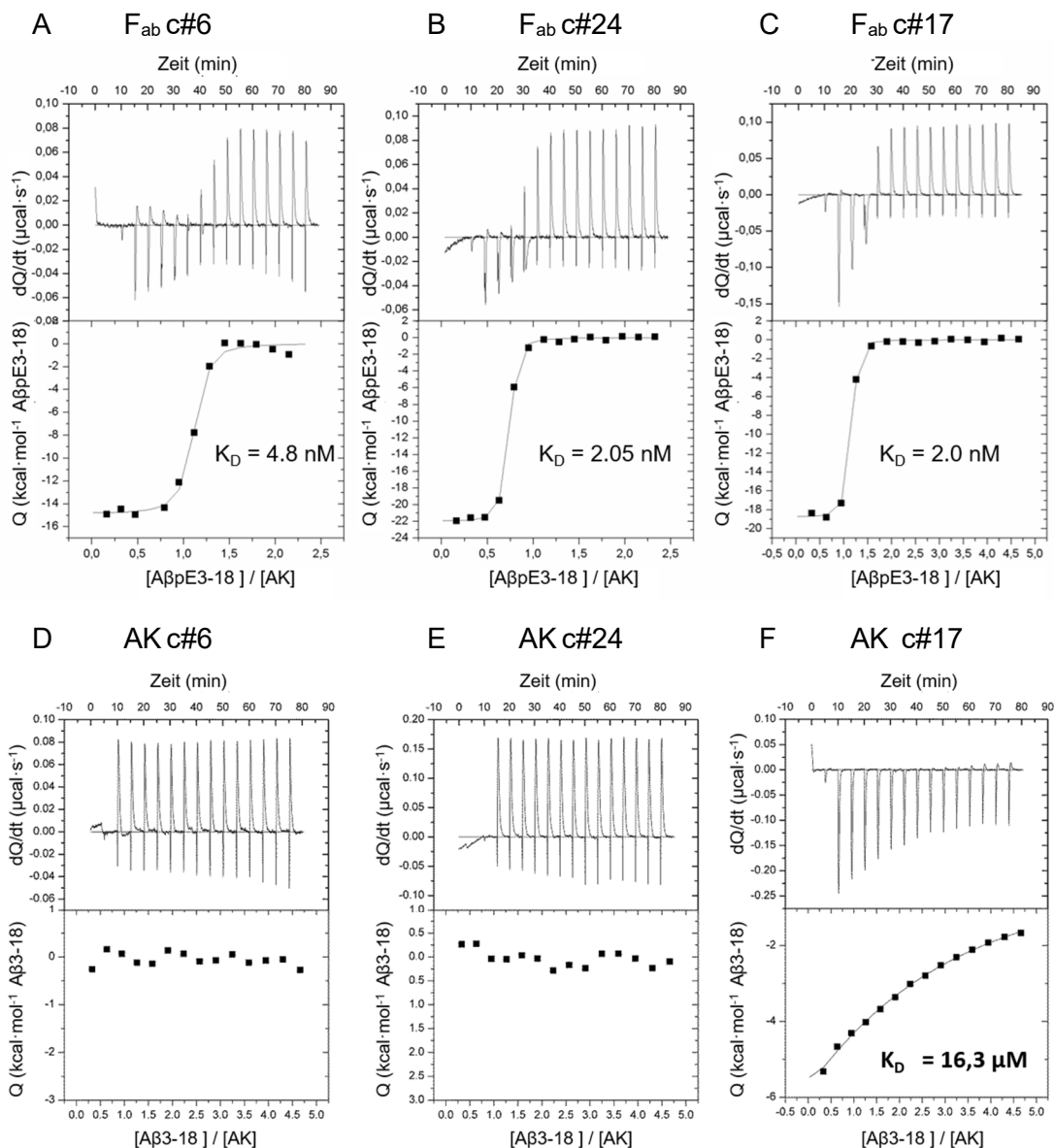


Abb. 3.7: Darstellung der ITC-Daten der F_{ab}-Fragmente bzw. Antikörper c#6, c#24 und c#17 mit dem A β _{pE3-18} (A-C) bzw. mit dem A β _{E3-18} (D-F)

Die Rohdaten der ITC-Messung wurden nach Integration mittels der Origin Software MicroCal analysiert. Nach Erhalt der Bindungsparameter (siehe Tab. 3.3) konnte der K_D -Wert der einzelnen Messungen ermittelt werden.

Beide Interaktionspartner wurden in einen physiologischen ITC-Puffer gebracht (siehe Methoden 2.2.4.3), das F_{ab}-Fragment in der Probenzelle vorgelegt und anschließend das Antigen mittels 15 Injektionszyklen dazugegeben. Nach Abzug der Leermessung konnten die Assoziationskonstante K_A, die Reaktionsstöchiometrie N und die Bindungsenthalpie Δ_BH anhand der Bindungskurve ermittelt werden (Tab. 3.3). So kann die Reaktionsstöchiometrie N auf der Y-Achse anhand des Wendepunktes der Kurve ermittelt werden. Ebenfalls ist es möglich aus dem Anstieg der Reaktionskurve die Assoziationskonstante K_A zu berechnen und aus der Differenz der oberen Sättigungs- und unteren Basislinie die Bindungsenthalpie ΔH zu ermitteln. Die Gibbs-Energie Δ_BG wurde mittels der Gleichung $\Delta_B G = -RT \cdot \ln K_A$ berechnet, da sie sowohl von den natürlichen Parametern - der universellen Gaskonstante R = 8,314 J·mol⁻¹·K⁻¹ (entspricht 1,986 cal·mol⁻¹·K⁻¹) und von der Temperatur – abhängt. Die freie Energie zeigte in allen drei Reaktionen einen ähnlichen negativen Wert, was eine exotherme Reaktion beschreibt. Sie enthält nach dem 2. Hauptsatz der Thermodynamik auch Enthalpie und Entropie ($\Delta_B G = \Delta_B H - T\Delta_B S$), sodass der Wert der Entropie durch Umstellen nach Δ_BS bestimmt werden kann. Das Produkt aus Temperatur und Entropie TΔ_BS beschreibt, inwiefern die entropischen Kräfte in der jeweiligen Reaktion im Vergleich zu Δ_BH eine Rolle spielen. In allen drei Reaktionen ging das System in einen geordneteren Zustand über, erkennbar an der negativen Bilanz von TΔ_BS. Darüber hinaus wurde die Bindung des F_{ab}-Fragments c#24 und Aβ_{pE3-18} durch einen TΔ_BS -Wert beschrieben, der negativer war als die ermittelten ITC-Werte der F_{ab}-Fragmente c#6 und F_{ab} c#17 zum Aβ_{pE3-18}-Peptid.

Tab. 3.3: ITC-Parameter der Bindung zwischen dem F_{ab}-Fragment c#6, c#24 oder c#17 mit dem Aβ_{pE3-18}-Peptid bzw. dem AK c#17 mit dem Aβ_{E3-18}-Peptid bei einer Reaktionstemperatur von 293,15 K

Parameter	F _{ab} c#6 (Aβ _{pE3-18})	F _{ab} c#24(Aβ _{pE3-18})	F _{ab} c#17(Aβ _{pE3-18})	AK c#17 (Aβ ₃₋₁₈)
N	1,04 ± 0,01	0,662 ± 0,003	0,997 ± 0,01	2,00 *
K _A (mol ⁻¹)	2,08·10 ⁸ ± 6,47 ·10 ⁷	4,88·10 ⁸ ± 8,14 ·10 ⁷	4,99·10 ⁸ ± 1,8 ·10 ⁸	6,15·10 ⁴ ± 2,34 ·10 ³
Δ _B H (kcal·mol ⁻¹)	- 14,85 ± 0,28	- 22,00 ± 0,17	- 18,35 ± 0,22	-16,65 ± 0,346
Δ _B S (kcal·mol ⁻¹ ·K ⁻¹)	- 0,0126	- 0,0353	- 0,0228	-0,0339
Δ _B G (kcal·mol ⁻¹)	- 11,15	- 11,64	- 11,66	- 6,42
TΔ _B S (kcal·mol ⁻¹)	- 3,7 ± 0,49	- 10,35 ± 0,26	- 6,7 ± 0,44	-10,12 ± 0,37
K _D (nM)	4,8 ± 1,5	2,05 ± 0,34	2,0 ± 0,72	16,3 · 10 ³ ± 619

* Stöchiometrie wurde auf 2 gesetzt, um die ITC-Bindungskurve zu ermitteln.

Vergleicht man die Enthalpiewerte der verschiedenen Bindungen, so erkennt man ebenfalls einen negativeren Δ_BH-Wert des F_{ab} c#24 gegenüber den anderen beiden F_{ab}-Molekülen.

Aus dem Kehrwert der Assoziationskonstante kann die Dissoziationskonstante K_D bestimmt werden. Wie in Tabelle 3.3 zu sehen, haben alle drei Bindungen einen ähnlichen K_D-Wert und beschreiben deren Bindungen als hoch affin. Ebenfalls unterscheiden sich die K_D-Werte nicht von den ermittelten K_D-Werten aus den OPR-Analysen.

3.3 Analyse der dreidimensionalen Struktur der $F_{ab}/A\beta_{pE3}$ -Komplexe aller drei Antikörper

3.3.1 Kristallisation und Datensammlung

Die Kristallisation mittels der Gasphasendiffusionsmethode (sitzender Tropfen) in einem 96-*well*-Format erlaubte zunächst die Bildung von Kristallen der F_{ab} -Fragmente mit und ohne Liganden. Die in dieser Arbeit durchgeführten Kristallisationen sind in folgender Tabelle übersichtshalber dargeboten (Tab. 3.4).

Tab. 3.4: Überblick der in dieser Arbeit durchgeführten Kristallisationsansätze

Protein	Ligand	AK:A β	<i>sitting drop</i>	<i>hanging drop</i>	Bedingung	Kit
F_{ab} c#6	$A\beta_{pE3-12Pbio}$	1:1	+	+	25,5 % w/v PEG 4000, 15 % Glycerol, 170 mM Ammoniumsulfat	JBSJCSG ++2 D3
F_{ab} c#6	-	-	+	+	20 % w/v PEG 4000, 20 % Glycerol, 80 mM Natriumacetat (pH 4,6) und 160 mM Ammoniumsulfat	Cryo Kit Nr. 20
F_{ab} c#24	$A\beta_{pE3-18}$	1:1,2	+	-	20% w/v PEG 3000, 100 mM Natriumcitrat pH 5,5	JBSJCSG ++1 A2
F_{ab} c#17	$A\beta_{pE3-12Pbio}$	1:1,2	+	+	5 % w/v PEG 3350, 100 mM Bis-Tris pH 5,5, 200 mM $MgCl_2$, Additiv: 0.5 % n-Dodecyl- β -D-maltosid	JBSJCSG ++4 D5
F_{ab} c#17	$mA\beta_{pE3-18-Pbio}$	1:1,2	+	+	0,1 M HEPES Natriumsalz, pH 7,5; 0,2 M Calciumacetat und 18 % w/v PEG 8000	JBS classic5 B1
F_{ab} c#17	-	-	+	-	20 % w/v PEG 3350, 50 mM Imidazol/HCl pH 7,0	Low Ionic 31

Die Kristalle aus dem initialen *screening* des Komplexes aus F_{ab} c#6 und dem $A\beta_{pE3-12Pbio}$ -Peptid, die sich nach 6 Tagen in 25,5 % w/v PEG 4000, 15 % Glycerol, 170 mM Ammoniumsulfat (JBScreen JCSG++2 Nr. D3; Jena Bioscience) bildeten (Tab. 3.4), wurden mittels der *hanging-drop-vapor-diffusion* - Methode (siehe Methoden 2.2.5.3) in einem größeren Tropfen (1 μ l Puffer + 1 μ l Proteinlösung) und einer 500 μ l Reservoirlösung im 15-*well*-Format verbessert (Abb. 3.8 Links) und für die anschließende Datensammlung verwendet. Die gebildeten Kristalle streuten bis zu einer Auflösung von 1,6 Å am hauseigenen Röntgengenerator (Kupferdrehanode) und konnten der Raumgruppe P1 mit zwei F_{ab} -Molekülen pro asymmetrischer Einheit zugeordnet werden.

Der F_{ab} c#24/ $A\beta_{pE3-18}$ -Komplex bildete bereits im 96-*well*-Format nach 14 Tagen einen Kristall (Abb. 3.8 Mitte), welcher sich zur Datensammlung eignete und geeignete Streumuster mit einer

Auflösung von bis zu 1,5 Å mittels Synchrotron Strahlung am BESSY (Helmholtz-Zentrum, Berlin) lieferte. Er gehörte der Raumgruppe C2 mit zwei F_{ab} -Molekülen pro asymmetrischer Einheit an (Tab. 3.5).

Die Initialkristalle des Komplexes aus F_{ab} c#17 und dem $A\beta_{pE3-12Pbio}$ -Peptid, die nach 14 Tagen in 25 % w/v PEG 3350, 100 mM Bis-Tris pH 5,5, 200 mM Magnesiumchlorid (JBScreen JCSG++4 Nr. D5; Jena Bioscience) detektiert wurden, zeigten hingegen Verwachsungen auf. Deshalb wurde die initialen Kristallisationsbedingung mittels eines *additive screen* (Hampton Research) verändert, wobei nach Zugabe von 0.5 % n-Dodecyl- β -D-maltosid Kristalle mit schärferen Kanten entstanden (Abb. 3.8 Rechts), die besser streuten.

In Tabelle 3.5 sind wichtige Parameter der Kristallisation und Verfeinerung dargelegt. Die ausführlichen kristallographischen Statistiken zur Datensammlung und zur Verfeinerung sind im Anhang in Tab. 6.3 nachzulesen.

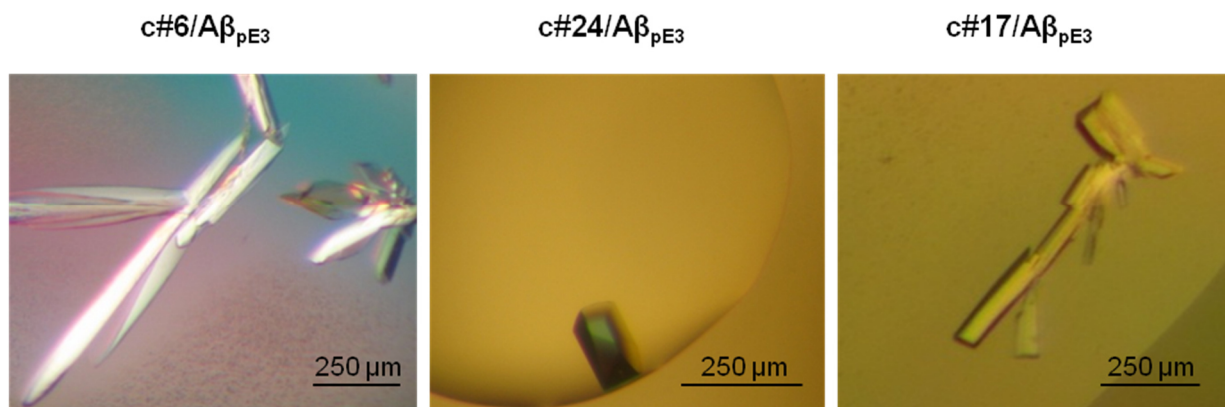


Abb. 3.8: Mikroskopische Aufnahmen der Kristallreifung der $F_{ab}/A\beta_{pE3}$ -Komplexe

Der c#6 $A\beta_{pE3}$ (links) als auch der c#17/ $A\beta_{pE3}$ -Komplex (rechts) wurden mittels der Gasphasendiffusionsmethode (hängender Tropfen) in einem größeren Tropfen angesetzt, um die Qualität der Streumuster zu verbessern. Der Initialkristall des Komplexes c#24/ $A\beta_{pE3}$ (Mitte) hingegen bildete bereits im 96-well-Format (sitzender Tropfen) eine ausreichend gute Qualität für Beugungsexperimente.

Tab. 3.5: Proteinstrukturparameter nach Kristallisation der $F_{ab}/A\beta_{pE3}$ -Komplexe

Protein-komplex	Max. Auflösung (Å)	Raum-gruppe	Zelldimension (Å)			Winkel (°)			R_{work}	R_{free}
			a	b	c	α	β	γ		
F_{ab} c#6/ $A\beta_{pE3}$	1,59	P1	53,79	65,99	67,77	62,9	82,9	84,2	0,180	0,219
F_{ab} c#24/ $A\beta_{pE3}$	1,49	C2	115,63	95,95	90,38	90,0	101,2	90,0	0,199	0,229
F_{ab} c#17/ $A\beta_{pE3}$	2,21	P2 ₁	43,17	87,14	58,03	90,0	96,06	90,0	0,195	0,257

Mit Verwendung einer Sequenzanalyse durch den BLAST-Server (*Basic Logic Alignment Search Tool*) konnte ein geeignete Suchmodell (PDB-Code:1ZEA, Scheerer *et al.*, 2007) für die Phasenberechnung mittels der Methode des Molekularen Ersatzes sowohl für die Strukturlösung

des Komplexes $F_{ab} \text{ c\#6/A}\beta_{pE3-12Pbio}$ als auch des Komplexes $F_{ab} \text{ c\#24/A}\beta_{pE3-18}$ gefunden werden (Tab. 3.6). Weiterhin wurde für die Strukturlösung des Komplexes $F_{ab} \text{ c\#17/A}\beta_{pE3-18Pbio}$ ein anderes Suchmodell (PDB Code: 2DQT, Oda *et al.*, 2007), welches sich über Sequenzalignment als geeigneter einstuft, verwendet. Die prozentualen Sequenzidentitäten zum verwendeten Suchmodell sind in folgender Tabelle (Tab. 3.6) gezeigt. Das dazugehörige Sequenzalignment ist im Anhang aufgeführt.

Tab. 3.6: Sequenzidentität der LC und des Fd-Fragments zwischen den $A\beta_{pE3}$ -spezifischen AK und dem verwendeten Suchmodell

	Suchmodell	Sequenzidentität	
		LC	Fd-Fragment
F_{ab} c#6	1ZEA	88%	73%
F_{ab} c#24	1ZEA	88%	74%
F_{ab} c#17	2DQT	95%	84%

3.3.2 Struktur der Bindetasche des Antikörper c#6 in Komplex mit $A\beta_{pE3-12Pbio}$

Das F_{ab} -Fragment besteht aus zwei Domänen- der variablen und der konstanten Domäne. Der variable Teil enthält die Bindetasche, in der sich das gebundene $A\beta_{pE3}$ -Peptid befindet (Abb. 3.9A). Die Struktur des gebundenen $A\beta_{pE3-12}$ -Peptids im $F_{ab} \text{ c\#6}$ -Komplex war bis zu V12 in der ($2F_oF_c$)-Elektronendichte erkennbar. Die *omit map* konturiert bei $+ 3.0\sigma$ zeigt allerdings die Seitenketten des Liganden (Abb. 3.9C) ohne den Effekt von *model bias*. Bis auf die Orientierung des Aspartats (D7) konnten die Seitenketten pE3-S8 in der *omit map* definiert werden. Aminosäureseitenketten, die über das S8 hinausgehen, besaßen keine Elektronendichte, sodass im Folgenden nur die Reste des $A\beta$ -Peptids von pE3-8 ohne den D7-Rest in den Interaktionsstudien berücksichtigt wurden.

Die leichte Kette (hellorange) und das Fd-Fragment der schweren Kette (hellblau) der F_{ab} -Einheit (Abb. 3.9A links) besitzen jeweils drei CDRs (koloriert in cyan in der HC und dunkelorange in der LC), die in kreisförmiger Anordnung um das $A\beta_{pE3-12}$ -Peptid (Abb. 3.9B oben) orientiert vorliegen. CDR1 ist die erste N-terminale *loop*-Region und liegt strukturell zwischen CDR2 und CDR3, sowohl in der schweren als auch in der leichten Kette.

Der N-Terminus des $A\beta_{pE3-12}$ -Peptids ragt bis zur Kontaktfläche (Abb. 3.9 rechts), dem *interface*, der leichten und schweren Kette, womit die Bindetasche eine V-Form ausbildet. Von oben betrachtet ist diese Bindetasche über eine schmale Öffnung erreichbar (Abb. 3.9B unten).

Abb. 3.9: Darstellung der Struktur des F_{ab}-Fragments c#6 im Komplex mit A β _{pE3-12Pbio}

A) Gesamtstruktur des F_{ab} c#6/A β _{pE3}-Komplexes. Die leichte Kette ist orange und der F_d-Teil der schweren Kette hellblau koloriert. Das N-terminale Pyroglutamat (pE3) des Liganden (illustriert in *stick*-Form, gelb) befindet sich in der Bindetasche umgeben von den CDRs der LC (dunkelorange) und HC (cyan) B) Rotation der Struktur in A um 90 °C in Richtung der dargestellten horizontalen Achse. Oben: Das pEA β -Peptid ragt mit seinem N-Terminus in die Bindetasche hinein und wird von den CDR-*loops* (CDR1-3) eingerahmt. Unten: Darstellung des elektrostatischen Potentials der F_{ab}-Oberfläche (Gefärbte Flächen in weiß, rot und blau kennzeichnen neutrale, negative und positive Potentiale, jeweils konturiert bei 0, -3 und +3kT/e). C) Die *omit map* konturiert bei + 3,0 σ des A β _{pE3-12}. D) Illustration der Interaktion des A β _{pE3-12}-Peptids mit LC (links) und HC (rechts). Wasserstoffbrückenbindungen sind als gestrichelte Linien dargestellt. Die Reste des Liganden sind grün beschriftet. An der A β -Bindung beteiligte Reste des AK sind gekennzeichnet (CDR-Reste sind schwarz beschriftet, sowie Reste des Antikörpergerüsts sind grau beschriftet). E und F) *open book*-Darstellung der variablen Region der LC (E) und HC (F). Reste zur Ausbildung des LC/HC-*interface* (grau koloriert) sind an der Ausprägung der Kavität beteiligt. Hydrophobe Reste in der Nähe des Liganden sind violett beschriftet. G) 2D-Darstellung der ersten drei Reste des A β _{pE3-12}-Peptids gebunden in der Bindetasche des F_{ab} c#6. Legende ist in der Abbildung gezeigt. Hydrophobe Reste, die nicht direkt hydrophobe Interaktionen mit dem A β _{pE3}-Peptid eingehen (nicht mit MOE 2011 ermittelt, Höchstgrenze der direkte hydrophoben Interaktion wurde bis < 4,5 Å fest gelegt), allerdings in unmittelbarer Nachbarschaft zum N-Terminus des Liganden lokalisiert sind, sind mit grauer Linie umrahmt. Die Darstellung wurde mit Hilfe von *Ligplot* erstellt.

Die ersten beiden N-terminalen AS-Reste des A β _{pE3}-Peptids, pE3 und F4, werden im unteren Bereich der Kavität hauptsächlich von hydrophoben Resten des AK umgeben. So bilden Aminosäureseitenketten, wie L41, V94, F101 und F103 der LC als auch V37, W47 und W109 (Abb. 3.9E und F, violett eingefärbte Reste bzw. Abb. 3.9G) eine hydrophobe Tasche aus, in der sich der A β _{pE3}-N-Terminus einlagert. Zudem sind hydrophobe Reste gezeigt (Abb. 3.9G, mit grauer Linie abgegrenzt), die nicht direkt hydrophobe Interaktionen mit dem A β _{pE3}-Peptid eingehen, allerdings in unmittelbarer Nachbarschaft zum N-Terminus des Liganden lokalisiert sind und somit an der Ausbildung einer hydrophoben Umgebung beteiligt sind. Desweiteren werden auch Wasserstoffbrückenbindungen von AS-Seitenketten des AK zum pE3 ausgebildet. Eine zentrale Rolle spielen dabei die Seitenkette des E99 der HC, welche sowohl die Aminogruppe der pE3-Seitenkette als auch das Rückgrat des F4-Restes des A β -Peptids über Wasserstoffbrücken in der Bindetasche fixiert (Abb. 3.9D,G Anhang Tab. 6.4). Das T97 bildet zudem eine H-Brücke zur Carboxygruppe der pE3-Seitenkette aus, sodass die Orientierung des 5-Oxoprolinringes festgelegt ist.

Der mittlere Teil der Kavität kann als polare Region beschrieben werden. So werden beispielhaft Wasserstoffbrücken vom AK zu den Seitenketten R5, H6 und S8 des A β -Peptids ausgebildet (Abb. 3.9D, Anhang Tab. 6.4). Darüber hinaus befinden sich dort ebenfalls Wassermoleküle, die teilweise als Mediator fungieren und Wasserstoffbrückenbindungen von Seitenketten des Antikörpers mit dem Liganden über weitere Distanzen ermöglichen (Anhang Tab. 6.4). Zum Beispiel formt N 35 der HC über ein Wassermolekül eine mögliche Bindung zur Hydroxylgruppe des A β -Serins 8 (Abb. 3.9D) aus. Eine Besonderheit dieser Bindetasche ist die tiefe Kavität, wobei neben den Resten der CDRs auch Seitenketten des Antikörpergerüsts in der Ligandenbindung beteiligt sind (Abb. 3.9D, hellgrau beschriftet). Mit Hilfe einer *open-book*-Darstellung der Bindetasche wurden die AS-Reste gekennzeichnet (graue Oberflächen), die an der Ausbildung der Kontaktfläche zwischen der variablen Domäne der LC und HC beteiligt sind

(Abb. 3.9E und F). Diese Reste tragen ebenfalls zur Ausbildung der Kavität bei und einige davon gehen nichtkovalente Wechselwirkungen mit dem Liganden ein.

Die AK-Reste, die an der Bindung des Liganden über mögliche nichtkovalente Bindungen beteiligt sind, wurden mit Hilfe der Software MOE 2011 analysiert. Dazu wurde zunächst, mit Berücksichtigung des energetisch günstigsten Zustands, die Ausrichtung der Wasserstoffe der Wassermoleküle kalkuliert. Wasserstoffbrückenbindungen mit einer Bindungsenergie von 4-15 kcal/mol wurden von JEFFREY *et al.* als moderate Bindung interpretiert (Jeffrey *et al.*, 1997). Diese nichtkovalenten Bindungen wiesen eine Bindungslänge zwischen Donor und Akzeptor von 2,5 Å bis 3,2 Å auf. Wasserstoffbrückenbindungen, die unter bzw. über dieser moderaten Bindungsenergie lagen, wurden als schwache bzw. starke H-Brücken mit einer Bindungslänge von 3,2 Å – 4,0 Å bzw. 2,2 - 2,5 Å definiert. In den Analysen mittels der Software MOE 2011 wurden alle putativen Wasserstoffbrücken zwischen Antikörperbindetasche und Ligand detektiert, deren Länge zwischen 2,5 Å und 3,2 Å lag und deren Winkel die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung erlauben würden.

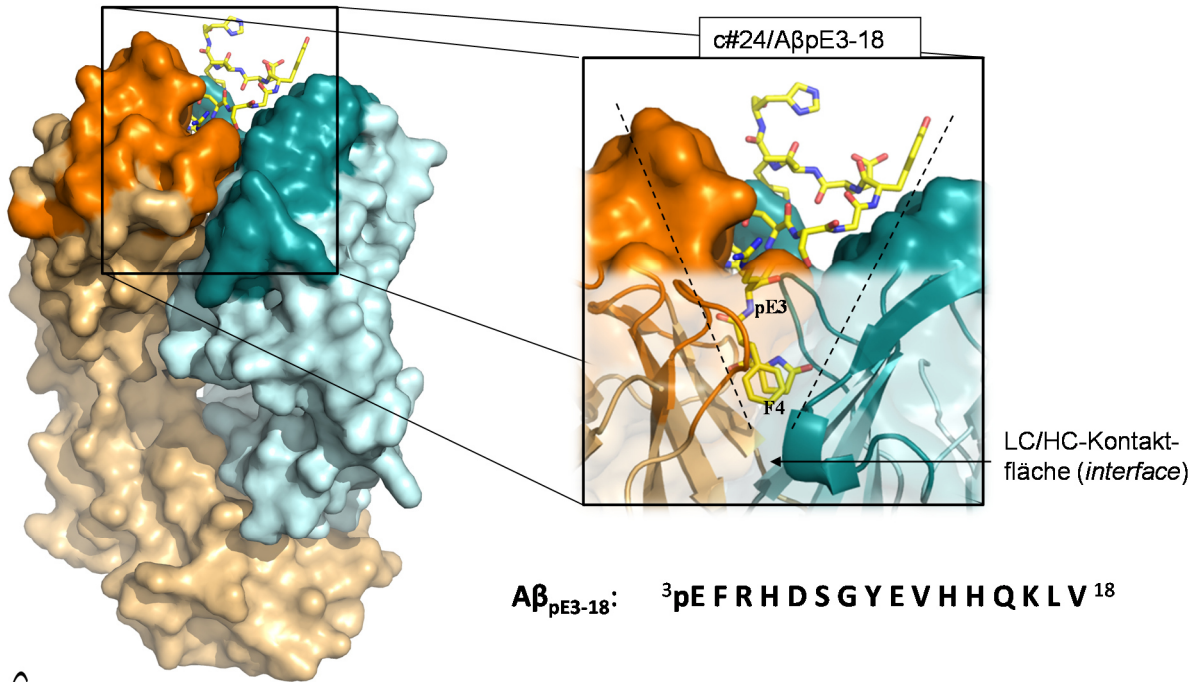
Die Interaktionen zwischen Resten der LC und $A\beta_{pE3-8}$ bzw. Resten der HC und $A\beta_{pE3-8}$ als auch indirekte Interaktionen des Liganden zum Antikörper über Wassermoleküle sind tabellarisch aufgelistet (siehe Anhang Tab. 6.4). Sie zeigen, dass Wasserstoffbrückenbindungen als auch hydrophobe Interaktionen an der Ligandeninteraktion beteiligt sind, jedoch wurden keine ionischen Wechselwirkungen gefunden.

3.3.3 Beobachtung einer strukturellen Verwandtschaft der F_{ab} -Fragmente von Antikörper c#6 und c#24

Für die Lösung der Struktur des F_{ab} c#6 und F_{ab} c#24, die eine fast identische leichte Kette besitzen und beide zu der Antikörperfamilie IgG1 gehören, konnte das gleiche Suchmodell mit der Methode des Molekularen Ersatzes verwendet werden. Überlagert man die $C\alpha$ -Atome der F_{ab} -Fragmente beider Moleküle, so erhält man einen RMSD-Werte (*root mean square deviation*) von 0,8 Å (siehe Tab. 3.8), was für eine hohe strukturelle Übereinstimmung der Hauptkette spricht.

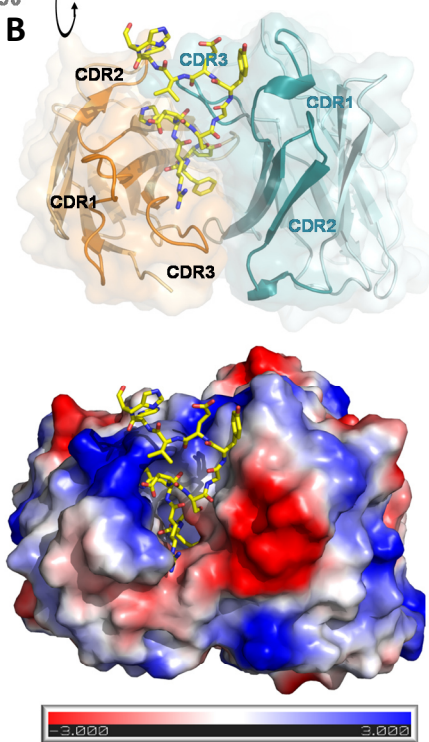
In der *omit map*, konturiert bei $+ 3.0\sigma$, ist der Ligand vom Pyroglutamat bis zum Y10 gut definiert (siehe Abb. 3.10C), allerdings wurden nur Wechselwirkungen bis zum S8 mittels der MOE-Software-Analyse (siehe Anhang Tab. 6.5) untersucht.

A

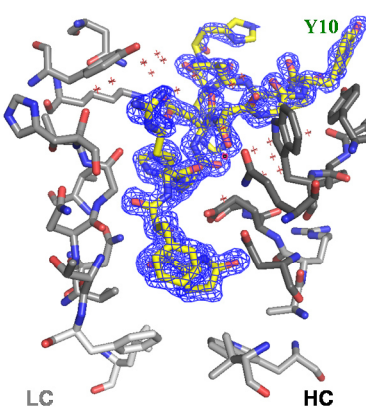


90°

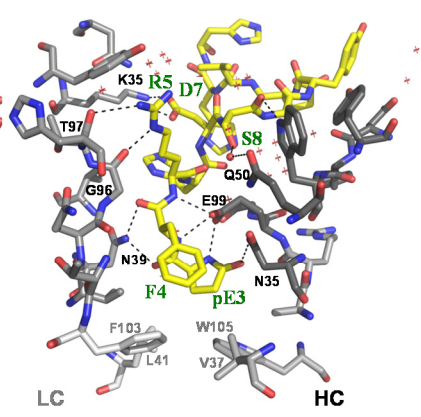
B



C

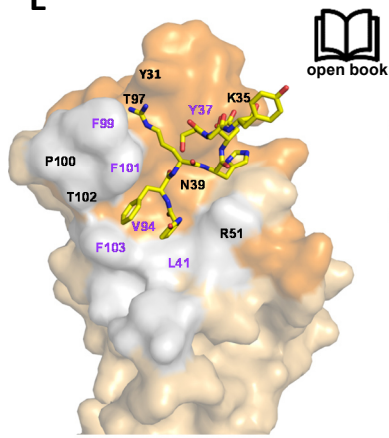


D

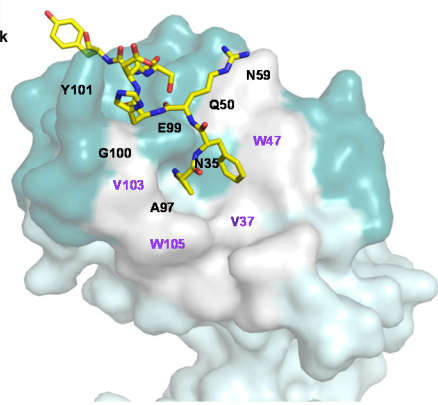


- Bindung des Aβ_{pE3}
- Bindung der LC
- Bindung der HC
- 2,62
- Wasserstoffbrückenbindung und ihre Länge in Å
- hydrophobe Reste des AK in der Bindetasche
- Atome involviert in hydrophoben Interaktionen

E



F



G

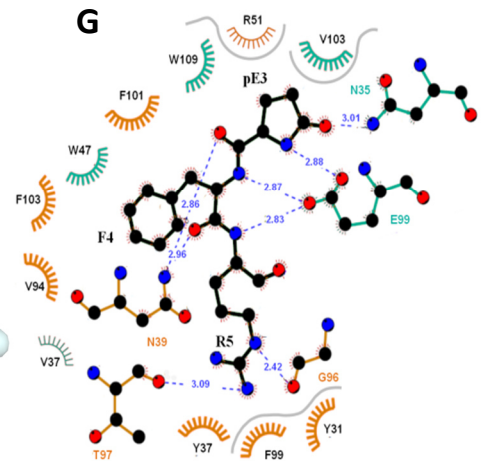


Abb. 3.10: Darstellung der Struktur des F_{ab}-Fragments c#24 im Komplex mit A β _{pE3-18}

A) Gesamtstruktur des Komplexes F_{ab} c#24/A β _{pE3-18}. Kolorierung der Ketten und Darstellung wie in Abb.3.9 B) Rotation der Struktur in A um 90 °C in Richtung der dargestellten horizontalen Achse. Oben: transparente Darstellung der Bindetasche von oben. Unten: Darstellung des elektrostatischen Potentials der F_{ab}-Oberfläche (Gefärbte Flächen in weiß, rot und blau kennzeichnen neutrale, negative und positive Potentiale, jeweils konturiert bei 0, -3 und +3kT/e). C) *Omit map* konturiert bei + 3,0 σ des A β _{pE3-18}. D) Illustration der Interaktion des A β _{pE3-18}-Peptids zur LC (links) und HC (rechts). Reste des Liganden (grün beschriftet) und der CDR-Reste (schwarz beschriftet), sowie der Reste des Antikörpergerüsts (grau beschriftet) bilden Wasserstoffbrücken aus (gestrichelte Linien). E und F) *open-book*-Darstellung der variablen Region der LC (E) und HC (F). Reste zur Ausbildung des LC/HC-*interface* sind grau koloriert. Hydrophobe Reste in der Nähe des Liganden sind violett gekennzeichnet. G) Die 2D-Darstellung (mit Hilfe von *Ligplot* angefertigt) der ersten drei Reste des A β _{pE3-18}-Peptids gebunden in der Bindetasche des F_{ab} c#24. Die Legende ist in der Abbildung gezeigt. Hydrophobe Reste, die nicht direkt hydrophobe Interaktionen mit dem A β _{pE3}-Peptid eingehen (nicht mit MOE 2011 ermittelt), allerdings in unmittelbarer Nachbarschaft zum N-Terminus des Liganden lokalisiert sind, sind mit grauer Linie umrahmt.

Die Bindetasche des F_{ab} c#24 prägt ebenfalls eine V-Form aus (Abb. 3.10A). Darüber hinaus sind wie in der Kavität von c#6 zum Teil gleiche AS-Reste der LC und HC an der Interaktion mit dem A β _{pE3}-Peptids beteiligt. So bilden z.B. ebenfalls G96, T97 und N39 der LC oder E99 der HC Wasserstoffbrückenbindungen zum Liganden aus. Die Interaktion zum Sauerstoff des 5-Oxopropyl-Restes wird hier jedoch nicht von einem Rest aus dem Antikörpergerüst übernommen (in F_{ab} c#6: HC-T97), sondern von N35 der HC, welches in den CDRs lokalisiert ist, wo anstelle des T97 (wie im F_{ab} c#6) ein Alanin positioniert ist. Somit steht an Position HC-97 keine polare Gruppe als Interaktionspartner zum Sauerstoff des 5-Oxopropyl- Restes zur Verfügung.

Eine im Vergleich zum c#6 zusätzliche H-Brücke der Amidgruppe der N39-Seitenkette des c#24 kann ebenfalls detektiert werden. So bildet N39 zum Carbonylsauerstoff des Pyroglutamatrückgrats aufgrund einer leichten Rotation der C β -C γ –Achse eine nichtkovalente Interaktion von 2,9 Å aus, sodass ein optimaler Winkel für eine H-Brücke entsteht.

Darüber hinaus sind hydrophobe Interaktionen von gleichen Resten ausgebildet, wie sie auch in der Bindetasche von F_{ab} c#6 detektiert wurden. Zum Beispiel sind die Reste L41, V94, F101, F103 der LC und V37, W47, W105 der HC beider Antikörper (c#6 und c#24) an der Ausprägung von hydrophoben Interaktionen zum Phenylalanin des A β -N-Terminus beteiligt.

3.3.4 Rolle der putativen ionischen Wechselwirkung des K35 der LC zum D7 des A β _{pE3}-Peptids in der F_{ab} c#24-Bindetasche

Mittels der Analyse mit MOE 2011 wurde auch eine mögliche ionische Wechselwirkung zwischen K35 der LC und D7 vorhergesagt (siehe Abb. 3.10D und Anhang Tab. 6.5), die im Vergleich zum F_{ab} c#6 nicht ermittelt wurde. Obwohl aufgrund der fehlenden Elektronendichte die Ausrichtung der D7-Seitenkette in F_{ab} c#6 nicht erfasst werden konnte, ist die Distanz des D7-Rückgrats zu weit entfernt (~10 Å), als dass es mit K35 interagieren könnte. Um die Relevanz dieser ionischen Interaktion zu untersuchen, wurde das D7 des A β _{pE3-18}-Peptids gegen ein Alanin (A β _{pE3-18}D7A)

substituiert. Mittels OPR-Messung wurde die Interaktionen des AK c#24 zu den mutierten Peptiden untersucht (siehe Abb. 3.11 links). Die Substitution von D7 zu A7 erhöhte den K_D -Wert von 2,2 nM auf 10 nM.

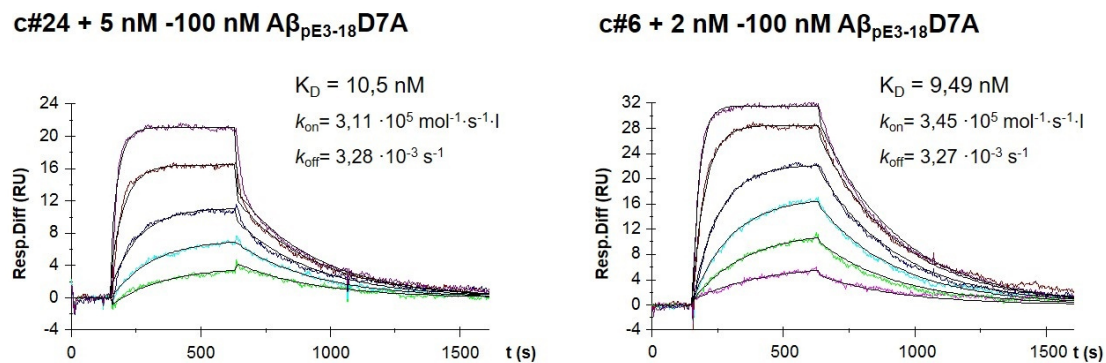


Abb. 3.11: Sensogramme zur Analyse der Aβ_{pE3-18}-Mutante D7A
 OPR-Messungen der Antikörper c#24 (links) und c#6 (rechts) mit Aβ_{pE3-18} D7A.

Zudem wurde die ursprüngliche lange Dissoziationsphase mit einem k_{off} von $0,38 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (Tab. 3.7) aufgehoben und ein 10-fach höherer k_{off} von $3,28 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ mit der Verwendung des Aβ_{pE3-18}D7A- Peptids gemessen. Da sich bei der Interaktion des AK c#6 mit dem Aβ_{pE3-18}D7A- Peptids (Abb. 3.11 rechts) sowohl die Dissoziationskonstante als auch die Geschwindigkeitskonstante k_{off} im Vergleich zum nicht mutierten Peptid nur gering änderte (siehe Tab. 3.7), konnte eine Veränderung der Gesamtstruktur des Peptids ausgeschlossen werden.

Tab. 3.7: Kinetische- und Bindungsparameter der Analyse der Antikörper mit der Aβ_{pE3-18}- Mutante D7A

AK c#	Aβ-Peptid	K_D (nM)	k_{on} ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{l}$)	k_{off} (s^{-1})
6	human pE3-18	6,7	$6,89 \cdot 10^5$	$4,58 \cdot 10^{-3}$
	human pE3-18 D7A	9,49	$3,45 \cdot 10^5$	$3,27 \cdot 10^{-3}$
24	human pE3-18	2,2	$1,76 \cdot 10^5$	$0,38 \cdot 10^{-3}$
	human pE3-18 D7A	10,5	$3,11 \cdot 10^5$	$3,28 \cdot 10^{-3}$

3.3.5 Antikörper c#17 besitzt einen anderen Bindungsmodus als Antikörper c#6 bzw. c#24

Mit Darstellung der Bindetasche des F_{ab} c#17 (Abb. 3.12 A) wird bereits deutlich, dass ein anderer Bindungsmodus vorliegt als bei AK c#6 und c#24 (V-geformte Kavität in Abb. 3.9 und 3.10, $A\beta_{pE3}$ -Bindungsmodus I). Die Bindetasche bildet eine flache Furche aus, mit welcher das Peptid mehr auf der Oberfläche der Bindetasche gebunden wird. Da die Bindetasche des F_{ab} c#17 (Abb. 3.12D) mit gleicher Orientierung (über das $C\alpha$ -Atom der HC) zum F_{ab} c#6 (Abb. 3.9D) und F_{ab} c#24 (Abb. 3.10D) dargestellt ist, wird deutlich, dass das $A\beta_{pE3}$ -Peptid hier nicht so tief in die Bindetasche hineinragt, wie in die Kavität von F_{ab} c#6 und F_{ab} c#24.

Der AK-Bereich, welcher die pE3-F4-Kopfgruppe des $A\beta$ -Peptids umschließt, gestaltet die Umgebung ebenfalls hydrophob (Abb. 3.12G, Anhang Tab. 6.6). Allerdings wird dabei nur eine hydrophobe Interaktion von der LC vermittelt, währenddessen die HC sowohl hydrophobe als auch π - π -Interaktionen ausbildet. Zudem formt das Y99 der HC eine H-Brücke zur Carbonylgruppe der Pyroglutamat-Seitenkette aus (Abb. 3.12D).

Das Peptidsegment „⁵RHDS⁸“ wird dahingegen nicht umschlossen, dennoch durch zahlreiche Wasserstoffbrückenbindung gebunden, die ausschließlich von der HC vermittelt werden (siehe Anhang, Tab. 6.6).

Zudem ist in der *open-book*-Darstellung zu sehen, dass die Aminosäurereste, die die Kontaktfläche zwischen LC und HC vermitteln (Abb. 3.12E und F, graue Oberfläche), das Peptid nicht einrahmen und somit weniger an der Ausbildung der Bindetasche beteiligt sind.

Aufgrund dieser strukturellen Unterschiede zum bereits beschriebenen $A\beta_{pE3}$ -Bindungsmodus I können wir die Bindung des $A\beta_{pE3}$ -Peptids zum AK c#17 als einen anderen Bindungsmodus, den $A\beta_{pE3}$ -Bindungsmodus II, beschreiben.

Ermittelt man die strukturelle Ähnlichkeit des F_{ab} Fragments c#6 mit dem F_{ab} c#17 mittels Überlagerung der $C\alpha$ -Atome (*superposition*), so wird eine große strukturelle der Hauptkette im Vergleich zur Überlagerung des F_{ab} c#6 mit dem F_{ab} c#24 deutlich (Tab. 3.8, Abb. 3.13 A und B). Der RMSD-Wert der F_{ab} -c#6/c#17-Überlagerung von 5,62 Å unterscheidet sich deutlich von dem RMSD-Wert der F_{ab} -c#6/c#24-Überlagerung von 0,81 Å. Ebenfalls erfolgte eine separate Überlagerung der LC, des Fd-Fragments, der variablen Domänen ($V_L + V_H$) und der konstanten Domänen ($V_L + V_H$) der AK c#24 und c#17 zum AK c#6, wobei nur die LC und das Fd-Fragments des AK c#17 strukturelle Abweichung der Hauptkette mit einem RMSD-Wert von 4,74 Å und 5,70 Å zeigen (Tab.3.8).

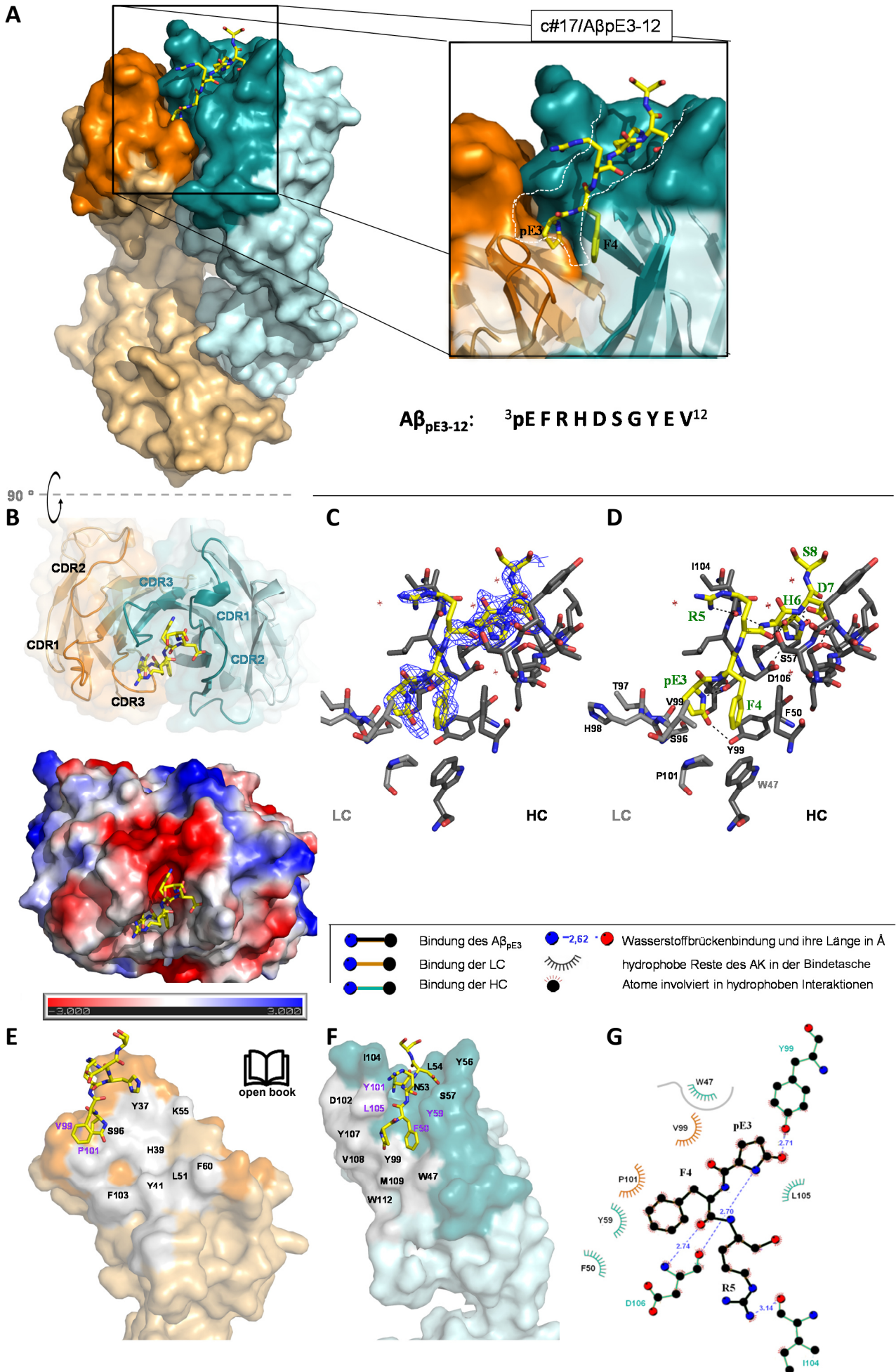


Abb. 3.12: Darstellung der Struktur des F_{ab}-Fragments c#17 im Komplex mit A β _{pE3-12Pbio}

A) Gesamtstruktur des F_{ab} c#17/A β _{pE3}-Komplexes. Kolorierung der Ketten und Darstellung wie in Abb. 3.9 B) Rotation der Struktur in A um 90 °C in Richtung der dargestellten horizontalen Achse. Oben: transparente Darstellung der Bindetasche von oben. Unten: Darstellung des elektrostatischen Potentials der F_{ab}-Oberfläche (Gefärbte Flächen in weiß, rot und blau kennzeichnen neutrale, negative und positive Potentiale, jeweils konturiert bei 0, -3 und +3kT/e). C) *omit map* konturiert bei + 3,0 σ des A β _{pE3-12} D) Illustration der Interaktion des A β _{pE3-12}-Peptids zur LC (hellgrau) und HC (dunkelgrau). Reste des Liganden (grün beschriftet) und der CDR-Reste (schwarz beschriftet), sowie der Reste des Antikörpergerüsts (grau beschriftet) bilden Wasserstoffbrücken aus (gestrichelte Linien). E und F) *open-book*-Darstellung der variablen Region der LC (E) und HC (F). Reste zur Ausbildung des LC/HC-*interface* sind grau koloriert. Hydrophobe Reste in der Nähe des Liganden sind violett gekennzeichnet. G) 2D-Darstellung der ersten drei Reste des A β _{pE3-12}-Peptids gebunden in der Bindetasche des F_{ab} c#17. Die Legende ist in der Abbildung gezeigt. Hydrophobe Reste, die nicht direkt hydrophobe Interaktionen mit dem A β _{pE3}-Peptid eingehen (nicht mit MOE 2011 ermittelt), allerdings in unmittelbarer Nachbarschaft zum N-Terminus des Liganden lokalisiert sind, sind mit grauer Linie umrahmt. Die Darstellung wurde mit Hilfe von *Ligplot* angefertigt.

Betrachtet man die strukturelle Überlagerung hinsichtlich der einzelnen Domänen der F_{ab}-Fragmente, so ist zu erkennen, dass die Hauptketten der V_L-(orange), V_H-(cyan), C_L-(rot) und C_{H1}-Domäne (dunkelblau) der F_{ab}c#24- und F_{ab}c#17-Fragmente (Abb. 3.13C und D) gut mit den F_{ab}c#6-Domänen (grau) übereinstimmen. Dies spiegelt sich auch in den RMSD-Werten (Tab. 3.8) wieder, welche zwischen ~0,3 Å und ~1 Å liegen. So ist anzunehmen, dass die Hauptketten der Gesamtstruktur zueinander sehr ähnlich sind und die Abweichung der RMSD-Werte der gesamten F_{ab}-Fragmente hauptsächlich durch die Drehung der konstanten Bereiche an der horizontalen Achse erfolgt (Abb. 3.13A und B). Kleine strukturelle Abweichung der Hauptketten in den einzelnen Domänen sind lediglich in den CDRs (CDR2- und des CDR3-*loops*) der HC des F_{ab} c#24 und F_{ab} c#17 zum F_{ab} c#6 zu verzeichnen (Abb. 3.13C und D).

Tab. 3.8: RMSD-Werte aus der *superposition* der gesamten F_{ab}-Fragmente bzw. einzelner Domänen des F_{ab} c#24 (Komplex), F_{ab} c#17 (Komplex) und F_{ab} c#6 ohne Peptid zum F_{ab} c#6 (Komplex)

	c#24	c#17	c#6 ohne Peptid
F _{ab} (Å)	0,807 (380 von 440)	5,622 (417 von 440)	0,648 (357 von 440)
LC (V _L + C _L)(Å)	0,788 (202 von 219)	4,738 (215 von 219)	0,604 (201 von 219)
F _d (V _H + C _{H1}) (Å)	0,587 (167 von 221)	5,696 (202 von 221)	0,600 (154 von 221)
Variable Domänen (V _L + V _H) (Å)	0,551 (188 von 235)	0,664 (177 von 235)	0,554 (148 von 235)
Konstante Domänen (C _L + C _H) (Å)	0,595 (152 von 206)	0,628 (157 von 206)	0,625 (141 von 206)
V _L (Å)	0,347 (103 von 113)	0,402 (107 von 113)	0,505 (102 von 113)
C _L (Å)	0,468 (91 von 106)	0,561 (92 von 106)	0,526 (91 von 106)
V _H (Å)	0,298 (87 von 119)	1,075 (94 von 119)	0,687 (77 von 119)
C _{H1} (Å)	0,424 (81 von 102)	0,505 (87 von 102)	0,492 (88 von 102)

(x von y) = z.B. 103 von 113 C α -Atomen wurden übereinander gelagert. Auswahl der Reste (R) des F_{ab} c#6 für RMSD-Analyse: V_L = R1-R113 der LC; C_L = R114-R219 der LC; V_H = R1-R119 der HC ; C_{H1} = R120-R221 der HC; LC = R1-R219 der LC; F_d = R1-R221 der HC; Variable Domänen = R1-R111 der LC und R1-R119 der HC; Konstante Domänen = R113-R218 der LC und R121-R218 der HC.

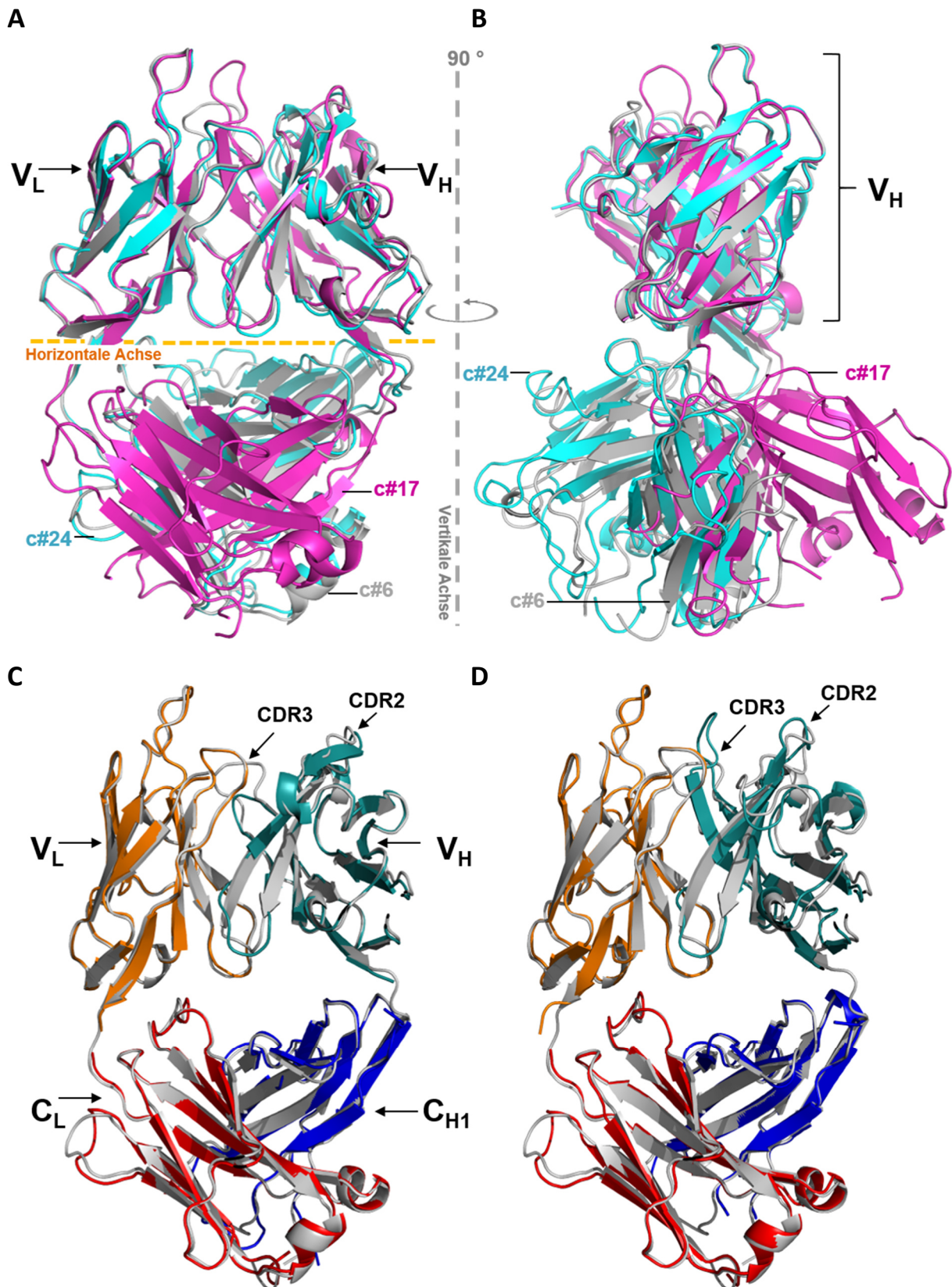


Abb. 3.13: Darstellung der Strukturüberlagerung (*superposition*) der Hauptkette verschiedener Antikörper-F_{ab}-Fragmente

A) Überlagerung der F_{ab}-Fragmente c#24 (hellblau) und c#17 (magenta) zum F_{ab} c#6 (grau) über das C α -Atom der V_L-Domäne. B) Drehung der Darstellung in A um 90 °C um die vertikale Achse. C und D) Überlagerung der C α -Atome der einzelnen Domänen V_L, C_L, V_H C_{H1} des F_{ab} c#6-Fragments (grau) mit dem F_{ab}-Fragment c#24 (C) und dem F_{ab}-Fragment c#17 (D). Variable Domäne der LC = V_L (orange) konstante Domäne der LC = C_L (rot), variable Domäne der HC = V_H (cyan), erste konstante Domäne der HC = C_{H1} (blau).

3.3.6 Vergleichende Analyse der Antikörperbindetaschen mit Berücksichtigung der Peptid/Antikörper-Kontaktfläche

Zusammengefasst sind die Reste aller drei AK, die nichtkovalente Interaktionen zum A β _{PE3}-Peptid eingehen, in folgender Tabelle 3.9 noch einmal dargestellt.

Tab. 3.9: Aminosäurereste der AK-Bindetasche, die in der Ausbildung nichtkovalenter Bindungen beteiligt sind

	AK	CDR1	CDR2	CDR3
LC	c#6	24KSSQSLLYSDGKT ^{YLN}	56YLVSKLDS	94VQ ^{GT} HFPFT ^{IF}
	c#24	KSSQSLLYSNG ^{KTYLN}	YVSKLDS	VQ ^{GT} HFPFT ^{IF}
	c#17	RSSQSLVHSDGNTYLH	YKVSNRFS	SQSTH ^V PPT ^{IF}
HC	c#6	26GYSFTGYTM ^{NW}	47WIG ^L LINPYNGVTRYNQKFKG	97TR ^{EA} KR ---EWD ^{EY} W
	c#24	GYIFNNY ^W I ^N W ^W	WIG ^Q IYPGDGDTNYNGKFKG	AR ^{EG} -----Y ^{IV} Y ^W
	c#17	GFTFS ^{DY} GMA ^W	WVA ^F SNLAYS ^I YYADTVTG	AR ^{YD} Y ^{DN} LD ^Y VMDY ^W

Blau = Wasserstoffbrückenbindungen, rot = ionische WW, grau = hydrophobe WW, grün = π -Bindungen. Die Venierregionen, die die CDR benachbarn, sind mittels Trennstrich abgegrenzt

Neben den Aminosäureseitenketten der CDRs sind Reste aus den benachbarten Positionen, die die CDR umschließen, in der Ligandeninteraktion beteiligt. Diese benachbarten Regionen werden auch Venierregionen bezeichnet und gehören dem Gerüst des Antikörpers an. Bereits im Vorfeld konnte gezeigt werden, dass vor allem hydrophobe Reste des AK c#6 und c#24 aus den Venierpositionen an der Ligandenbindung beteiligt sind.

Neben Wasserstoffbrückenbindungen, ionischen Wechselwirkungen (WW), π -Bindungen und hydrophoben Interaktionen wurde bereits in der Literatur ein Zusammenhang zwischen Kontaktfläche der Bindungspartner und der damit verbundenen Affinität beschrieben (Chen *et al.*, 2013). Um zunächst zu untersuchen, inwieweit die Bindetasche mit der Struktur des Peptids ineinanderpasst, wurde zunächst die Komplementarität der AK/Liganden-Oberflächen (*shape complementarity, sc*) untersucht. Dabei wurde sowohl die Passgenauigkeit der LC (A), Fd-Teil der HC (B) als auch im Komplex (AB) mit dem A β _{PE3-S8}-Peptid (L) unter Verwendung der Strukturkoordinaten untersucht (Tab. 3.10). Für alle drei Antikörper wurden ähnliche *sc*-Werte zwischen 0,7 und 0,8 ermittelt und beschreiben somit alle Antikörper als gleichwertig komplementär zum Liganden. Zudem sollte die Größe der AK/Liganden-Kontaktfläche (A) ermittelt werden (Tab. 3.10), um einen möglichen Zusammenhang zum A β _{PE3}-Dissoziationsverhalten zu erhalten.

Tab. 3.10: Oberflächenkomplementarität sc und der Antikörper/Liganden-Kontaktfläche A_{AL} (in \AA^2) zwischen dem F_{ab} -Fragment (LH) und dem $A\beta_{pE3}$ -Liganden

	sc				A_{AL} (\AA^2)			
	LH+A β_{pE3}	L+ A β_{pE3}	H+ A β_{pE3}	L+H	LH+A β_{pE3}	L+ A β_{pE3}	H+ A β_{pE3}	L+H
c#6	0.765	0.708	0.813	0.750	818.4	362.2	456.2	1787.9
c#24	<u>0.769</u>	<u>0.707</u>	<u>0.809</u>	<u>0.761</u>	<u>932.3</u>	<u>429.0</u>	<u>503.3</u>	<u>1620.1</u>
c#17	0.826	0.886*	0.796	0.728	616.4	133.8	482.6	1656.1

L = LC, H = Fd-Fragment, A β_{pE3} = A β_{pE3} -Peptid; unterstrichene Werte = Mittelwerte der beiden F_{ab} c#24/A β_{pE3} -Komplexe in einer asymmetrischen Einheit; * Da die Kontaktfläche zwischen A und L des AK c#17 so gering ist, konnte der sc -Wert nicht gut kalkuliert werden und kann Fehler enthalten.

Mit Untersuchung der Interaktion zwischen dem F_{ab} -Fragment c#24 und dem A β_{pE3} -Peptid (AB+L) konnte die größte Kontaktfläche von $\sim 930 \text{\AA}^2$ ermittelt werden. Sowohl die leichte Kette als auch das Fd-Fragment haben dabei einen mehr oder weniger gleich großen Anteil von 429 und 503.3 \AA^2 . Im Vergleich dazu wurde nur eine geringe Kontaktfläche der leichten Kette des AK c#17 mit einem Wert von 133.8 \AA^2 zum Liganden gemessen. Diese Beobachtung geht mit der strukturellen Analyse einher, welche ebenfalls eine geringere Beteiligung der LC in der Ligandenbindung zeigte. Eine Korrelation zwischen Größe der Antikörper/Liganden-Kontaktfläche und der Affinität, wie sie nach CHEN *et al.* (Chen *et al.*, 2013) beobachtet werden konnte, wurde jedoch nicht ermittelt.

3.3.7 Untersuchung der Antikörper-Bindetaschenflexibilität in Abhängigkeit des Bindungsmodus

Es konnte mittels OPR gezeigt werden, dass der Antikörper c#17 N-terminale Variationen der A β -Aminosäuresequenz toleriert. C#17 bindet das A β_{2-18} , A β_{3-18} als auch das murine A β_{pE3-18} (siehe Tab. 3.2) im Gegensatz zu AK c#6 und c#24. Die alternative Bindung zum murinen A β_{pE3-18} sollte zudem strukturell untersucht werden (Tab. 3.4). Kristalle des F_{ab} c#17/ mA β_{pE3-18} -Pbio-Komplexes bildeten sich nach 23 Tagen in 0.1 M HEPES Natriumsalz, pH 7,5; 0,2 M Calciumacetat und 18 % w/v PEG 8000 (JBScreen classic 5 Nr. B1; Jena Bioscience) im Initial-screening (Tab. 3.4). Größere Kristalle mit einer Länge von 750 μm wurden unter den gleichen Bedingungen mit Hilfe der *hanging-drop-vapor diffusion*-Methode erzeugt und zur Datensammlung verwendet.

Die positive (F_o-F_c) *omit map* des murinen A β_{pE3-18} -Peptids (Abb. 3.14H) lieferte ohne den Einfluss von *model bias* eine durchgängige Dichte der AS-Reste pE3-S8. Vergleichend betrachtet ist zu erkennen, dass das mA β_{pE3-18} (Tab. 3.2), welches an Position 3 ein Glycin anstatt eines Arginins besitzt (Abb. 3.14G und H), in gleicher Weise gebunden ist, wie das humane A β_{pE3-18} (Abb. 3.14D). Das Arginin wird nur über eine Wasserstoffbrücke aus der Hauptkette des I104 stabilisiert, allerdings durch keine weiteren umliegenden nichtkovalenten Wechselwirkungen.

Zudem wird das A β -Arg5 auch durch nur wenige umliegende Van-der-Waals-Kontakte gebunden, zu erkennen in der Oberflächendarstellung der Bindetasche des AK c#17 (Abb. 3.14E) mit gebunden Peptid (als *sphere*-Darstellung gezeigt). AK c#6 hingegen bettet das R5 des A β -Peptids durch umliegende Reste, wie LC-F99, LC-F101 und HC-W47 über Van-der-Waals-Kontakte ein (Abb. 3.14B und C). Zudem wird das humane A β_{pE3} -R5 durch Wasserstoffbrücken der LC (Abb. 3.14A) im geschlosseneren Bindungsmodus (V-Kavität, A β_{pE3} -Bindungsmodus I) fixiert.

Der Austausch zu Glycin im F_{ab} c#17/mA β_{pE3-12} -Komplex verändert die Bindungskonstante zwar von 2 nM auf 19 nM (Tab. 3.2), jedoch ist die Bindung des murinen A β_{pE3-12} -Peptids noch möglich, sodass man schlussfolgern kann, dass diese Substitution aufgrund der geringen AK-Kontakte toleriert wird. Im Vergleich dazu wird das murine A β_{pE3-18} von AK c#6 und c#24 nicht gebunden (Tab. 3.2), da das Arg 5 vermutlich eine entscheidende Rolle in der Bindung durch umliegende AK-Bindungskontakte (siehe Anhang, Tab. 6.4) ermöglicht, welche durch den Austausch zu Glycin im murinen A β_{pE3-18} -Peptid nicht mehr erfolgen kann.

Da bisher zwei verschiedene A β_{pE3} -Bindungsmodi beschrieben werden konnten, sollte ebenfalls untersucht werden, ob in Abhängigkeit des jeweiligen Bindungsmodus unterschiedliche Flexibilitäten der Bindetaschen auftreten. Dazu wurden zusätzlich die Strukturen der F_{ab}-Fragmente c#6 und c#17 ohne Ligand kristallisiert (Tab. 3.4), um die AK-Bindetaschen ohne und mit Ligand vergleichen zu können. Der Kristall, welcher sich aus der F_{ab} c#17- Proteinlösung ohne gebundene Liganden gebildet hat, wurde durch die Methode des sitzenden Tropfens im anfänglichen *screening* gewonnen. So entstand dieser unter der Bedingung 20 % w/v PEG 3350, 50 mM Imidazol/HCl pH 7,0 (Crystallization Low Ionic Strength Kit Nr. 31, Sigma) und fand direkt für die Datensammlung am hauseigenen Röntgengenerator Verwendung (Tab. 3.5). Kristalle des F_{ab} c#6 ohne Liganden wuchsen im initialen *screening* unter der Bedingung 20 % w/v PEG 4000, 20 % Glycerin, 80 mM Natriumacetat pH 4,6 und 160 mM Ammoniumsulfat (Crystallization Cryo Kit Nr. 20, Sigma) nach 14 Tagen. Der für die Strukturlösung verwendete Kristall wurde mittels der *hanging-drop-vapor-diffusion*-Methode in einem größeren Tropfen gewonnen.

Die Struktur der Bindetasche des F_{ab}c#17 ohne Ligand (Abb. 3.14F, violett) zeigt gleiche Orientierungen der Seitenketten im Vergleich zum F_{ab} c#17/A β_{pE3-12} -Komplex (Abb. 3.14F, grau). Neben der weitreichenden strukturellen Übereinstimmung ist eine unterschiedliche Orientierung der AS-Seitenketten Tyr56 und Tyr69 (Abb.3.14F, 2F_oF_c siehe Anhang Abb. 6.8) zu erkennen.

So könnte angenommen werden, dass diese beiden Tyrosine in Abhängigkeit der Ligandenpräsenz eine Rolle in der Bindung des Liganden spielen. Da sie jedoch an der Oberfläche der Bindetasche lokalisiert sind, ist ebenfalls zu berücksichtigen, dass auch die Kristallpackung die Umorientierung dieser Seitenketten beeinflussen kann. So konnte nach

Im Gegensatz zum F_{ab} c#17 zeigt die Bindetasche des F_{ab} c#6 ohne Liganden Unterschiede in der CDR-Flexibilität. Der Datensatz dieser ungebundenen F_{ab}-Variante gibt nur wenig (2F_oF_c)-Elektronendichte für die CDRs der HC (Abb. 3.15 A und B), sodass CDR1 und CDR3 der schweren Kette nicht gebaut werden konnten.

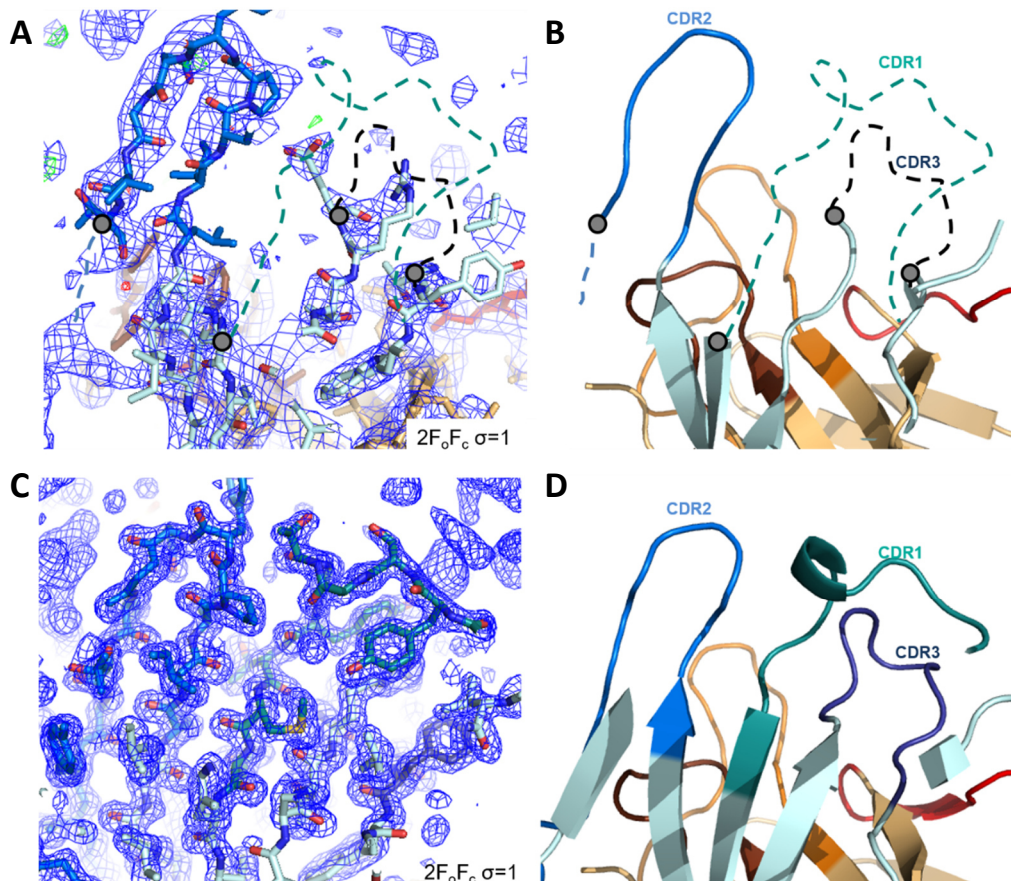


Abb. 3.15: Darstellung der (2F_oF_c)-Elektronendichte des F_{ab} c#6 ohne Ligand (A) vergleichend zum F_{ab} c#6/Aβ_{pE3-12}-Komplex (C)

Das F_{ab} c#6 ohne (A) und mit Aβ_{pE3-12}-Peptid (C) ist in gleicher Orientierung gezeigt. A und C) Darstellung der (2F_oF_c)-Elektronendichte (blau). B) *Cartoon*-Darstellung der CDRs des F_{ab} c#6 ohne Ligand (Modellierte CDR1 und CDR3 der HC aus dem F_{ab} c#6/ Aβ_{pE3-12}-Peptid-Komplex sind gestrichelt eingezeichnet). D) *Cartoon*-Darstellung der CDRs des F_{ab} c#6/ Aβ_{pE3-12}-Peptid-Komplexes. Die CDR-*loops* sind farbig gekennzeichnet (für leichte Kette: CDR1= orange, CDR2 = rot, CDR3 = braun, für schwere Kette: CDR1 = cyan, CDR2 = marinblau, CDR3 = dunkelblau).

Anhand der B-Faktor-Verteilung, welcher auf der Abweichung der Atompositionen von seiner Hauptposition in den verschiedenen Einheitszellen des Kristallgitters beruht, können Rückschlüsse über die Flexibilität des Proteinrückgrates gemacht werden. Flexiblere Bereiche werden folglich über eine ansteigende Breite des Rückgrates demonstriert (Abb. 3.16). Mit der vergleichenden Untersuchung der Bindetasche des F_{ab} c#17 (Abb. 3.16A) und F_{ab} c#6 (Abb. 3.16C) ohne Ligand kann gezeigt werden, dass die CDR-*loops* der LC des F_{ab} c#6 wesentlich flexibler sind. Besonders CDR1 und CDR3 der LC des F_{ab} c#6 zeigen eine starke Abweichung von der Hauptposition. Zudem sind die CDRs der HC-c#6 so flexibel, dass sie gar nicht in der (2F_oF_c)-Elektronendichte erkennbar sind. Vergleicht man die

Atomkoordinatenabweichung des ungebundenen F_{ab} c#6-Fragment (Abb. 3.16C) mit dem F_{ab} c#6/A β _{pE3-12}-Komplex (Abb. 3.16D), kann eine Abnahme der CDR-Flexibilität mit gebundenem Liganden detektiert werden. Die Beweglichkeit der CDRs im F_{ab} c#17/A β _{pE3-12} (Abb. 3.16B) ist währenddessen vergleichbar starr mit dem F_{ab} c#17 ohne Ligand (Abb. 3.16A). Resultierend daraus kann angenommen werden, dass die CDRs des F_{ab} c#6 aufgrund ihrer Flexibilität die tiefe Bindung des N-Terminus des A β _{pE3-12}-Peptid (A β _{pE3}-Bindungsmechanismus I) ermöglichen. Die CDRs des F_{ab} c#17 (A β _{pE3}-Bindungsmechanismus II), die hingegen das A β _{pE3-12}-Peptid mehr auf der Oberfläche der Bindetasche binden, bedürfen womöglich keiner notwendigen strukturellen Änderung bei der Transition vom nichtgebundenen zum gebundenen Zustand.

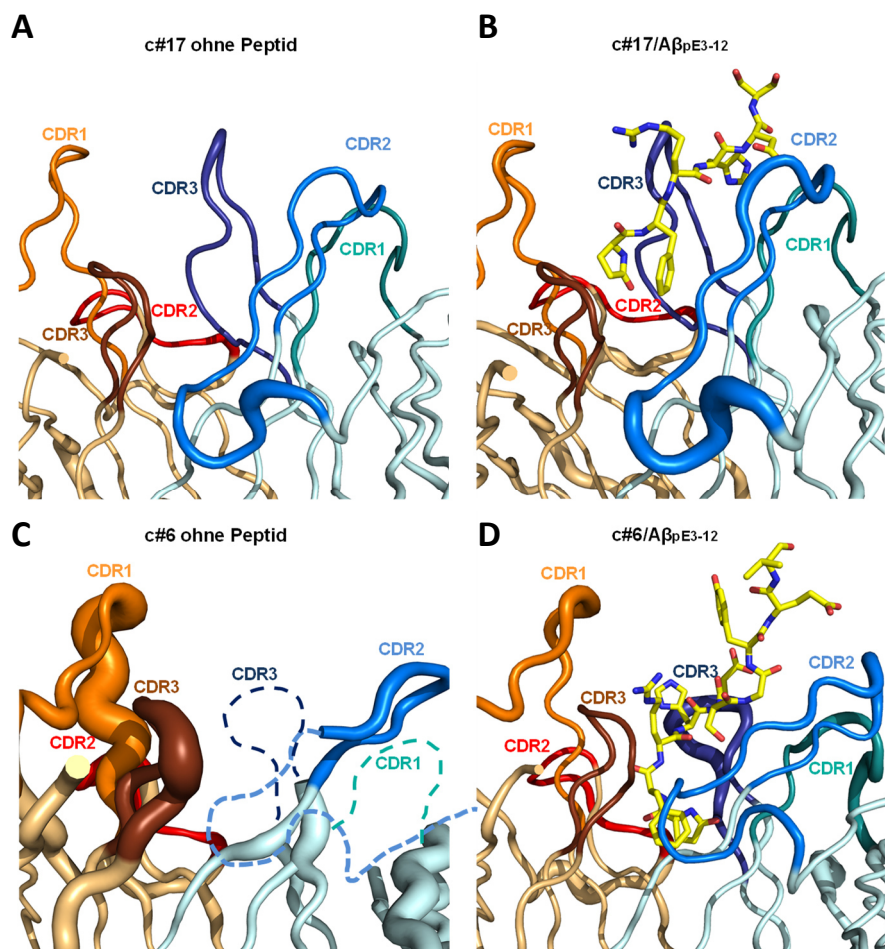


Abb. 3.16: Darstellung des B-Faktors der CDRs des F_{ab} c#17 und F_{ab} c#6 in ungebundener und gebundener Form

Der B-Faktor wurde durch die zunehmende Verdickung des Aminosäurerückgrates (B und E) in Richtung steigender Flexibilität dargestellt. Die Bindetasche des F_{ab} c#17 ohne (A) und mit A β _{pE3-12}-Peptid (B) als auch des F_{ab} c#6 ohne (C) und mit A β _{pE3-12}-Peptid (D) sind in gleicher Orientierung gezeigt. Die CDR-loops sind farbig gekennzeichnet (für leichte Kette: CDR1 = orange, CDR2 = rot, CDR3 = braun, für schwere Kette: CDR1 = cyan, CDR2 = marinblau, CDR3 = dunkelblau. E) Die aufgrund der schlechten Auflösung fehlende CDR1 und CDR3 der HC sind schematisch dargestellt (gestrichelte Linie)

3.3.8 Das A β _{pE3}-Peptid bildet in allen drei Bindetaschen einen strukturell ähnlichen N-Terminus aus: die parallele pE3-F4-Kopfgruppe

Trotz der strukturellen Unterschiede der drei Antikörperbindetaschen konnte eine Übereinstimmung der N-terminalen Struktur des A β _{pE3}-Peptids beobachtet werden. Die zweite N-terminale Aminosäure- das Phenylalanin (F4)- zeigt eine fast parallele Anordnung zum Pyroglutamat (P3) im F_{ab} c#6/A β _{pE3}-Komplex (Abb. 3.17A und B, gelb), welche auch in den A β _{pE3}-Peptiden der anderen F_{ab}-Komplexe [A β _{pE3} des F_{ab} c#24- Komplex (Abb. 3.17A , magenta) und des F_{ab} c#17- Komplexes (Abb. 3.17B, cyan)] zu finden ist. Diese Anordnung des A β _{pE3}-N-Terminus soll im Folgenden als parallele pE3-F4-Kopfgruppe bezeichnet werden. Eine mögliche Starrheit dieses N-terminalen Segments ist durch die B-Faktor-Verteilung unterstützt (Abb. 3.17C). Darüber hinaus ist die Orientierung des Arginins (R3) und Histidins (H4) des A β _{pE3}-Peptids in der Bindetasche von c#6 und c#24 ähnlich. Vor allem das A β -Tyrosin 10 des F_{ab} c#6/A β _{pE3}-Komplexes als auch die beiden A β -Histidine (H13 und H14) des F_{ab} c#24/A β _{pE3}-Komplexes sind in Übereinstimmung mit der wenig definierten Elektronendichte der *omit map* an diesen Positionen (Abb. 3.9C, Abb. 3.10C) weniger fixiert. Im Vergleich dazu ist der gebundene Teil des A β _{pE3}-Peptids in der Bindetasche des F_{ab} c#17 sehr starr (Abb. 3.17D)

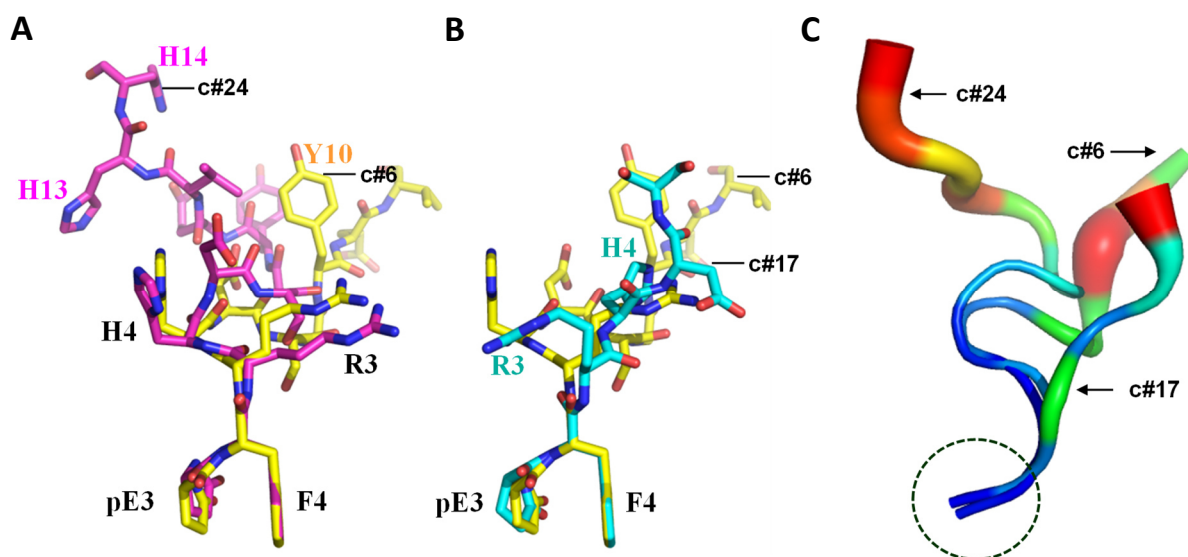


Abb. 3.17: Darstellung der Struktur des A β _{pE3-18}-Peptids in den Bindetaschen der Antikörper F_{ab}-Fragmente
 A) und B) Überlagerung der gebundenen A β -Peptide aus allen drei Strukturen über die pE3-F4-Kopfgruppe. gelb: A β _{pE3}-Peptid des F_{ab} c#6-Komplex, magenta: A β _{pE3}-Peptid des F_{ab} c#24-Komplex, Cyan: A β _{pE3}-Peptid des F_{ab} c#17-Komplex. Der N-Terminus zeigt eine parallele Anordnung des Pyroglutamats (pE3) mit dem benachbarten Phenylalanin (F4) C) Die B-Faktoren (von blau nach rot bedeutet Anstieg der B-Faktoren) des Peptids zeigen, dass der N-Terminus aller drei gebundenen Peptide (Kreis) eine sehr starre Struktur (blau) besitzt, währenddessen der C-Terminus flexible atomare Bereiche (rot) aufweist.

3.4 Funktioneller Antikörper-Test (*in vitro*)

3.4.1 Die Bildung der $A\beta_{pE3-42}$ -Fibrillen wird konzentrationsabhängig durch die Zugabe von $A\beta_{pE3}$ -spezifischen Antikörpern inhibiert

Neben der thermodynamischen und strukturellen Untersuchung der Antikörperbindung sollte ebenfalls die Funktionalität der drei $A\beta_{pE3}$ -spezifischen Antikörper *in vitro* untersucht werden. Mit Hilfe des Thioflavin-T-Tests kann die Ausbildung von $A\beta$ -Fibrillen untersucht werden (siehe Methoden 2.2.6.1). Um die Funktionalität der AK zu analysieren, wurden diese direkt nach dem Lösen des $A\beta$ -Peptids und vor beginnender Aggregation der Probe zugeführt. Als Negativkontrolle wurde ein AK verwendet (MCP1-spezifischer AK), welcher weder im *dot blot* Assay noch in der OPR-Messung das $A\beta_{pE3}$ -Peptid erkennt (Abb. 3.18A und B). Zunächst sollte getestet werden, ob die Zugabe der AK die Fibrillenbildung des $A\beta_{1-42}$ -Peptids unterdrückt. In Abb. 3.18C ist zu sehen, dass die Fibrillierung des $A\beta_{1-42}$ nicht durch die Präsenz der $A\beta_{pE3}$ -spezifischen AK beeinflusst wird.

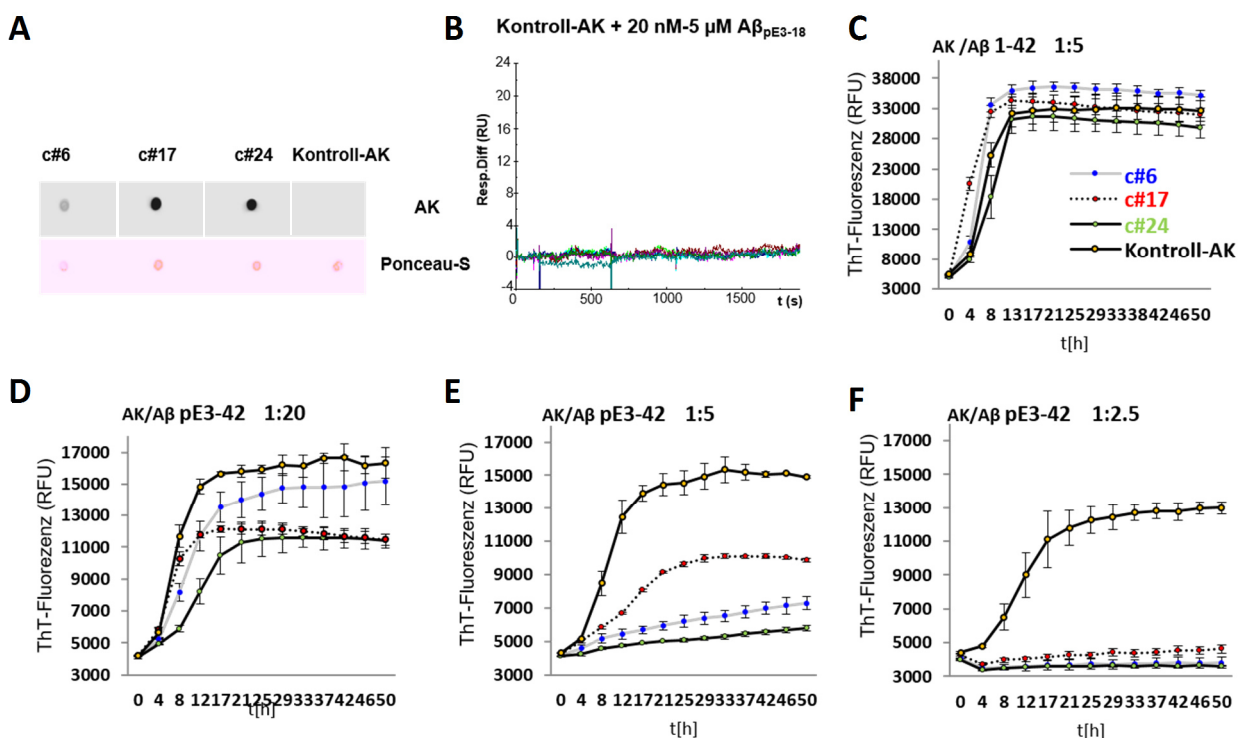


Abb. 3.18: Darstellung der Analyse zur Inhibierung der $A\beta_{pE3-42}$ -Fibrillenbildung durch die Zugabe von verschiedenen Konzentrationen der $A\beta_{pE3}$ -spezifischen Antikörper

A) *dot blot*-Assay: Die Membran wurde mit 20 ng $A\beta_{pE3-40}$ -Peptid (entsprechen 4,85 μ M) gespottet. $A\beta_{pE3}$ -spezifische AK erkennen das $A\beta_{pE3-40}$ -Peptid, währenddessen kein Signal nach Inkubation mit dem Kontrollantikörper (MCP1-spezifischer AK) gemessen wurde. Als Auftragskontrolle wurde eine Ponceaufärbung durchgeführt. B) OPR-Messung: Kontrollantikörper wurde auf den Sensorchip geladen und anschließend ansteigende Konzentrationen von 20 nM – 5 μ M $A\beta_{pE3-18}$ dazu gegeben. Keine Bindungskurve konnte detektiert werden. C-F) Die Fibrillenbildungskurve wurde durch die Beobachtung der ThT-Fluoreszenz (RFU = relative Fluoreszenz-Einheit) als eine Funktion der Zeit ermittelt. Zugabe $A\beta_{pE3}$ -spezifischen AK (c#6, c#24, c#17) in einem molaren Verhältnis von 1:20 (0,5 μ M AK, D), 1:5 (2 μ M AK, E) und 1:2.5 (4 μ M AK, F) zu 10 μ M $A\beta_{pE3-42}$ Peptid. Als Kontroll-AK wurde der MCP1-spezifische AK verwendet. Mittelwerte und Standard-Abweichungen wurden durch drei Messungen kalkuliert. Als weitere Kontrolle wurde 10 μ M $A\beta_{1-42}$ Peptid mit $A\beta_{pE3}$ -spezifischen AK (c#6, c#24, c#17) in einem molaren Verhältnis von 1:5 (2 μ M AK, C) behandelt.

Im Gegensatz dazu konnte durch den Beitrag der AK zum $A\beta_{pE3-42}$ -Peptid die Ausbildung der Fibrillen eingeschränkt und mit ansteigender AK-Konzentration (0,5 μ M, 2 μ M und 4 μ M) sogar vollständig inhibiert werden (Abb. 3.18 D-F). So konnte im Gegensatz zur Kontrollantikörperzugabe (Abb. 3.18F) kein Anstieg des Fluoreszenzsignals in einem AK/ $A\beta_{pE3-42}$ -Verhältnis von 1:2.5 gemessen werden. Alle drei Antikörper c#6, c#17 und c#24 sind also durch ihre Bindung an das $A\beta_{pE3-42}$ -Peptid in der Lage, deren Fibrillierung zu inhibieren und somit *in vitro* funktionell.

3.4.2 Analyse der $A\beta$ -Fibrillenbildung mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) nach Zugabe der $A\beta_{pE3}$ -spezifischen Antikörper

Mittels der Methode der Transmissions-Elektronenmikroskopie wurden die präparierten Proben aus 3.4.1 in einem AK/ $A\beta$ -Peptidverhältnis von 1:5 (Abb. 3.18C und E) analysiert. Nach Zugabe der $A\beta_{pE3}$ -spezifischen Antikörper bzw. dem Kontroll-AK zum $A\beta_{1-42}$ -Peptid (Abb. 3.18C) bildeten sich in allen Proben vergleichbar geformte schmale Fibrillen aus. Im Gegensatz dazu führte die Zugabe der $A\beta_{pE3}$ -spezifischen Antikörper c#6 und c#24 zum $A\beta_{pE3-42}$ -Peptid zur Entstehung von akkumulierten Aggregaten, die durch ihre Dichte in den *negative stain* EM-Aufnahmen schwarz gefärbt werden (Abb. 3.19A). Mit einer 50000x Vergrößerung ist zu erkennen, dass verglichen mit der Kontrolle (Abb. 3.19B links, Zugabe des Kontroll-AK) diese Aggregate aus verkürzten und dickeren $A\beta_{pE3-42}$ -Fibrillen bestehen. Mit der Zugabe des AK c#17 zeigen sich neben der Ausprägung von schmalen $A\beta_{pE3-42}$ -Fibrillen zusätzlich sehr kurze Fragmente, die sich in ihrer Form von den $A\beta$ -Aggregaten unterscheiden und gleichmäßig über die *grid*-Fläche verteilen (Abb. 3.19A und B). Dabei kann es sich zum einen um AK-Aggregate handeln, um AK/ $A\beta_{pE3-42}$ -Komplexe, als auch um kurze $A\beta_{pE3-42}$ -Fibrillenfragmente bzw. oligomere $A\beta_{pE3-42}$ -Strukturen. Für eine genauere Spezifizierung wären weitere Experimente notwendig. Zusammengefasst kann jedoch geschlussfolgert werden, dass die Zugabe der $A\beta_{pE3}$ -spezifischen Antikörper die Ausprägung der ursprünglichen $A\beta_{pE3}$ -Fibrillenstruktur inhibiert. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass mit Zugabe der AK in einem Verhältnis von AK/ $A\beta_{pE3-42}$ -Peptidverhältnis von 1:2.5 keine Fibrillen mittels TEM mehr detektiert wurden (siehe Anhang Abb. 6.9.) Dies zeigt, dass die AK in der Lage sind, das $A\beta_{pE3-42}$ -Peptid zu binden und die Fibrillierung vollständig zu unterdrücken.

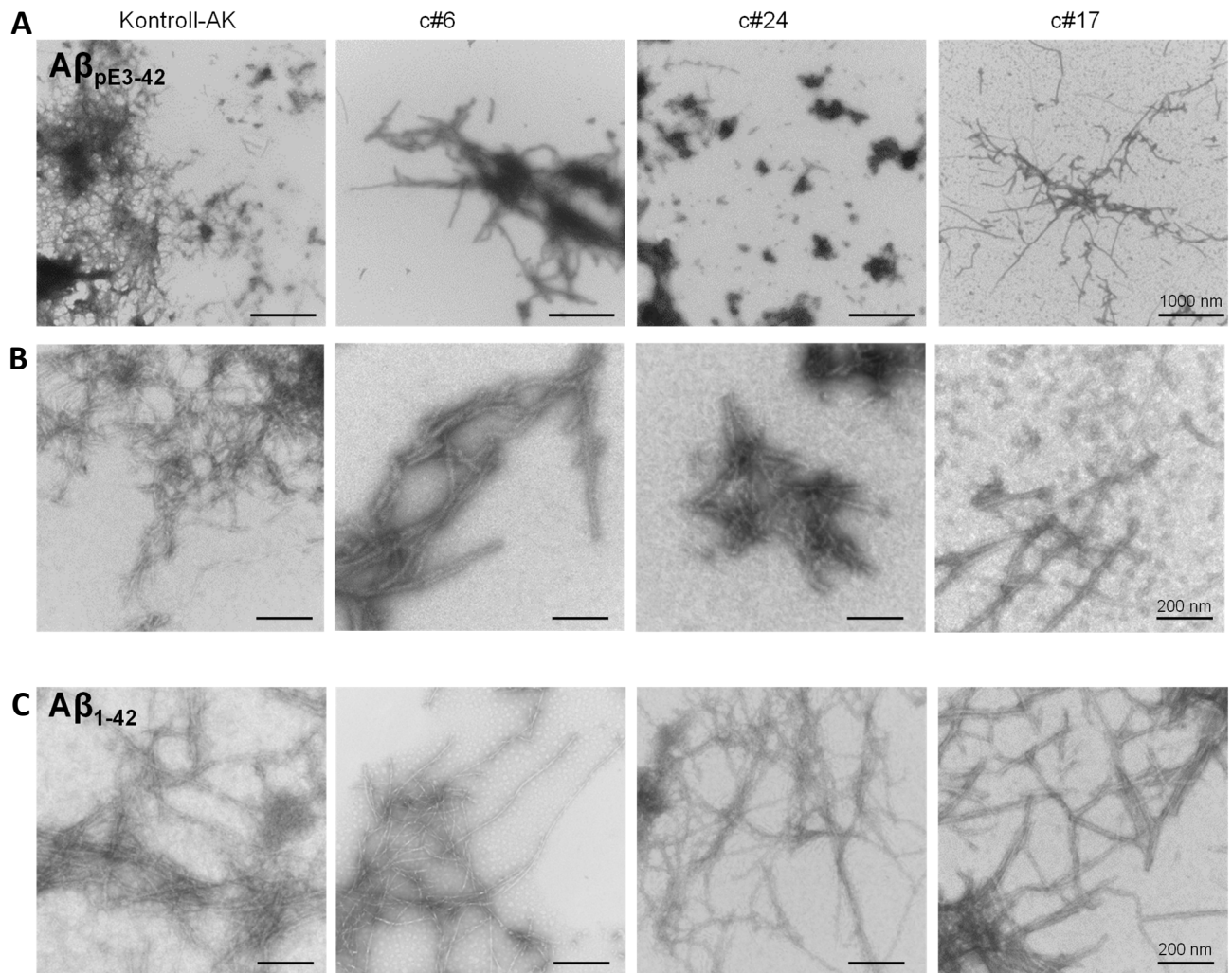


Abb. 3.19: Transmissions-Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Aβ_{pE3-42}-Fibrillen (bzw. Aβ₁₋₄₂-Fibrillen) unter Zugabe von Aβ_{pE3}-spezifischen Antikörpern

Aβ_{pE3-42} wurde mit dem Kontroll-AK bzw. mit den Aβ_{pE3}-spezifischen AK c#6, c#24 und c#17 in einem molaren Verhältnis von 1:5 AK/Aβ-Peptid inkubiert. Die gebildeten Fibrillen wurden mittels TEM analysiert und sind hier in einer 12 000 (A) bzw. 50 000-fachen (B) Vergrößerung repräsentiert. C) Als Kontrolle wurde das Aβ₁₋₄₂ ebenfalls mit den AK behandelt und deren Fibrillen in 50 000 fachen Vergrößerung gezeigt.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollten drei $A\beta_{pE3}$ -spezifische AK charakterisiert werden, die eine Grundlage für die Entwicklung von therapeutischen AK für die Behandlung der Alzheimerschen Erkrankung darstellen könnten. Der Vergleich der Aminosäuresequenzen zeigte neben ihrer Zugehörigkeit zur IgG1 (c#6 und c#24) bzw. IgG2b-Subklasse (c#17) der Maus-Immunglobuline Variationen in der Sequenz ihrer variablen Domänen. Alle drei variablen Bereiche der leichten Ketten (V_L -Domäne) gehören der IGKV1-Genfamilie an und besitzen CDRs gleicher Länge. Der variable Teil der schweren Ketten (V_H -Domäne) unterscheidet sich jedoch sowohl in Aminosäuresequenz, Länge also auch Zugehörigkeit der Genfamilie. So konnte die V_H -Domäne des AK c#6 bzw. c#24 der IGHV1-Genfamilie zugeordnet werden, währenddessen die V_H -Domäne von c#17 zur IGHV5-Genfamilie gehört. Die Länge des CDR3s der schweren Kette variiert zudem in allen drei AK.

Dementsprechend stimmen AK c#6 und c#24 sowohl in ihrer IgG-Subklasse und in ihrer Genfamilie überein und ähneln sich zudem in ihrer Aminosäuresequenz der V_L -Domäne. Sie unterscheiden sich jedoch in der Aminosäuresequenz der V_H -Domäne. Hingegen zeigt der AK c#17 keine Gemeinsamkeiten zum AK c#6 oder c#24 auf. Die im Folgenden durchgeführten Untersuchungen sollen aufklären, ob diese Gemeinsamkeiten/Unterschiede sich ebenfalls im Bindungsverhalten und der Ausprägung der Struktur widerspiegeln.

4.1 Reinigung der sezernierten $A\beta_{pE3}$ -spezifische AK und anschließende enzymatische Spaltung mittels Papain führte zur Generierung von homogenen F_{ab} -Proteinproben

Nach standardisiertem Protokoll wurde die Reinigung der $A\beta_{pE3}$ -spezifische AK aus dem Überständen der Hybridomazellkultivierung durchgeführt. Dabei konnte bei der Reinigung von c#17 bzw. c#24 eine AK-Konzentration von 12 mg/l bzw. 7,5 mg/l gewonnen werden. Das Auftreten verschiedener Laufverhalten der HC des AK c#17 in der SDS-PAGE lässt sich durch verschiedene Glykosylierungsformen des Antikörpers am F_C -Teil der HC erklären. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass die N-Glykosylierungsstellen N297 der HC konserviert ist (Jefferis, 2009), allerdings dessen Position in Abhängigkeit der N-terminal liegenden CDR-Längen variieren kann. Die Oligosaccharide werden über die Amidgruppe des N297, welche in der Erkennungssequenz von Asn-X-Ser/Thr vorliegt, an die HC geknüpft. Die Position X kann durch jede beliebige AS außer Prolin besetzt werden (Moremen *et al.*, 2012). Der AK c#17 besitzt an Position 308 eine Asn-Ser-Thr-Sequenz, welche eine potentielle Erkennungssequenz für Glykosylierungen am F_C -Teil darstellt. Da zudem in der reduzierenden SDS-PAGE (Abb. 3.1D)

gezeigt werden konnte, dass die Doppelbande der HC des AK *c#17* durch die Behandlung mit PNGase-F verringert wird, kann eine inhomogene N-Glykosylierung der Proteinprobe durch das Vorkommen verschiedener Glykosylierungsformen angenommen werden. Ebenfalls wäre auch eine asymmetrische Glykosylierung durch eine einseitige Oligosaccharidverknüpfung an nur eine HC denkbar.

Für die strukturelle Analyse sollten zunächst kleinere Antikörperfragmente hergestellt werden, da gezeigt werden konnte, dass sich diese Fragmente leichter kristallisieren lassen (Poljak, 1973; G Rossi, Choi, & Nisonoff, 1969; Guido Rossi, 1968). In Abhängigkeit der IgG-Unterklasse besitzen Antikörper eine unterschiedliche Anzahl von intermolekularen Disulfidbrücken zwischen den beiden schweren Ketten (Liu & May, 2012). So sind zum Beispiel die HC der murinen IgG1-Form durch drei Disulfidbrücken miteinander verknüpft (Abb.4.1A) (Svasti & Milstein, 1972), währenddessen die HC der murinen IgG2b-Antikörper vier Disulfidbrücken zwischen ihren HCs aufweisen (Abb.4.1B) (<http://www.uniprot.org/uniprot/P01867>). Bei einem kontrollierten Verdau eines IgG1-Antikörpermoleküls durch Papain wird die schwere Kette in der *hinge*-Region gespalten und als Ergebnis entstehen zwei F_{ab} -Fragmente und ein F_c -Fragment (Abb.4.1A). In dieser Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass nach Inkubation eines IgG2b-Antikörper mit Papain neben der Generation des F_{ab} -Fragments auch ein Fragment mit einer Größe von ca. 100 kDa entsteht (Abb.3.2). Es wäre möglich, dass es sich hierbei um das $F_{ab/c}$ -Fragment handelt, welches aufgrund einer asymmetrischen Spaltung (Abb.4.2B) nach Papainbehandlung generiert werden kann (Demignot *et al.*, 1989; Parham *et al.*, 1982; Yamaguchi *et al.*, 1995). Das $F_{ab/c}$ -Fragment besteht aus einem F_{ab} -Arm, welches noch mit dem $2xF_c$ -Fragment über die Gelenkregion verknüpft bleibt und somit einer Größe von ca. 100 kDa entspricht.

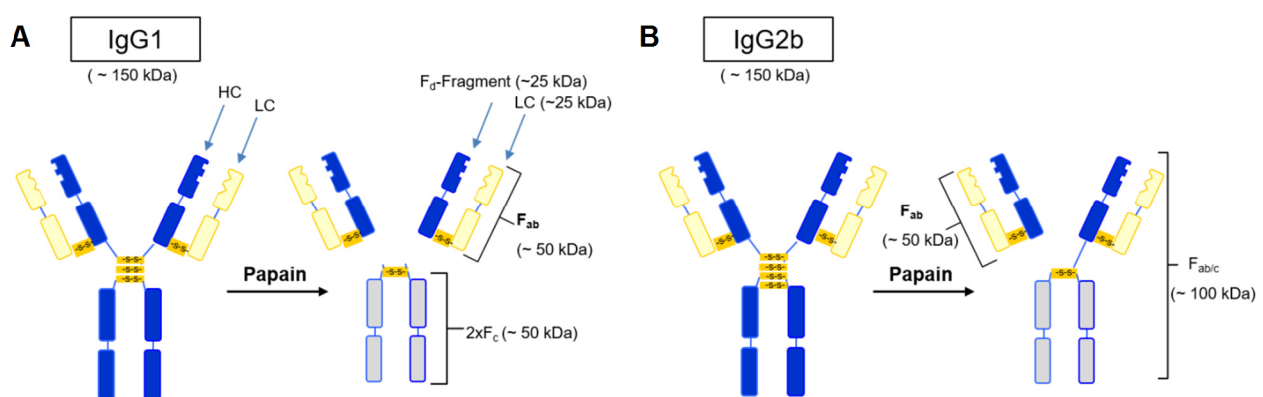


Abb. 4.1: Darstellung der Papain-katalysierten Antikörperspaltung verschiedener IgG-Spezies

A) Nach Papainbehandlung unter Zugabe von Cystein wird der IgG1-AK in zwei F_{ab} -Fragmente und das F_c -Fragment gespalten. Je nach Cystein/Papainverhältnis liegt das F_c -Fragment als $2xF_c$ -Fragment (verbrückt über die intramolekulare Disulfidbrücke oder als Einzelfragment vor (hier nicht gezeigt). B) Inkubiert man einen IgG2b-Antikörper mit Papain, so findet vermutlich eine asymmetrische Spaltung statt (Adamczyk *et al.*, 2000), so dass ein F_{ab} -Fragment und ein $F_{ab/c}$ -Fragment entsteht. Die Anzahl von intermolekularer Reduktion der Disulfidbrücken nach Papainbehandlung zwischen den beiden schweren Ketten ist unbekannt. Deshalb wurde die Gelenkregion nach Antikörperspaltung hier lediglich nur noch mit einer Disulfidbrücke dargestellt.

Dies kann durch die Präsenz einer asymmetrischen Glykosylierung der schweren Kette in der Gelenkregion hervorgerufen werden, welche möglicherweise die Zielspaltstelle vor dem proteolytischen Angriff schützt (Adamczyk, Gebler, & Wu, 2000). Es wäre also denkbar, dass eine Deglykosylierung des AK c#17 eine homogene Spaltung des IgG2b-Antikörpers unterstützt. Da allerdings die Ausbeute an gespaltenem F_{ab}-Fragment für die strukturelle Analyse ausreichend war, wurde von weiteren Deglykosylierungs/Spaltungsanalysen abgesehen.

Nach Analyse der AK-Spaltung war es mit Hilfe der Affinitätschromatographie an Protein G möglich, das F_{ab}-Fragment von dem F_c-Fragment aus dem jeweiligen Reaktionsansatz zu trennen. Dabei wurde das F_{ab}-Fragment der IgG1-Antikörper c#6 und c#24 an das Protein G gebunden, währenddessen das F_c-Fragment die Säule ungebunden passierte (Abb. 3.3). Hingegen zeigte das F_c-Fragment des AK c#17 eine ausgeprägte Affinität zu Protein G, währenddessen das F_{ab}-Fragment weniger stark mit Protein G wechselwirkte (Abb. 6.5, Abb. 6.6). In der Literatur ist bereits ausführlich beschrieben worden, dass Protein G sowohl mit dem F_{ab}-Fragment, als auch mit dem F_c-Fragment über drei verschiedenen Domänen (B1, B2 und Domäne III) interagieren kann (Achari *et al.*, 1992; Erntell, Myhre, Sjöbring, & Björck, 1988; Gronenborn *et al.*, 1991; Stone *et al.*, 1989). Darüber hinaus konnte kristallographisch gezeigt werden, dass Protein G sowohl mit dem F_{ab}-Fragment eines murinen IgG1 AK über die CH1-Domäne der HC (Derrick & Wigley, 1992; Derrick & Wigley, 1994) als auch mit dem Übergangsbereich, welcher die CH2- mit der CH3-Domäne der HC verbindet, interagieren kann (Sauer-Eriksson *et al.*, 1995). Die Analyse einer möglichen Korrelation zwischen Bindungsspezifität an Protein G und IgG-Antikörper Unterklasse bedarf weiterer Untersuchungen.

4.2 Affinität versus Spezifität der A β _{pE3}-spezifischen AK

Mit Hilfe verschiedener Analysemethoden (ITC und OPR) war es möglich, die Bindungsaffinitäten der A β _{pE3}-spezifischen AK zu charakterisieren. Zur Auswertung der Messung wurde in den ITC-Analysen ein einbindiges Modell, bei dem ein Molekül des Liganden (A β _{pE3-18}-Peptid) mit einem F_{ab}-Fragment bindet, zu Grunde gelegt. Der ermittelte K_D-Wert der drei verschiedenen F_{ab}-Fragmente c#6, c#24 und c#17 zum A β _{pE3-18}-Peptid liegt zwischen 2 und 5 nM und beschreibt damit alle drei AK als hoch affin. Allerdings muss hier die Präzision der ermittelten K_D-Werte diskutiert werden. Es ist bereits beschrieben, dass für hochaffine Interaktionen die Werte für $\Delta_B H$ und n mit guter Genauigkeit bestimmt werden können, allerdings K_A nicht durch direkte ITC-Experimente ermittelt werden kann (Biswas & Tsodikov, 2010; Broecker, Vargas, & Keller, 2011). Um diese Limitierung der Messmethode zu umgehen, stellen Konkurrenzexperimente eine geeignete Methode dar. Allerdings benötigt man dafür einen niederaffinen Liganden, welcher mit dem hochaffinen Liganden um die Antikörperbindungsstelle konkurriert. Es stand jedoch kein adäquates alternatives A β -Peptid für alle drei AK zu Verfügung, um solch ein Experiment

durchführen zu können. Eine für die Charakterisierung von Antikörpern üblicherweise genutzte Methode stellt ebenfalls die OPR dar, die es ermöglicht den K_D -Wert aus der Division der ermittelten Geschwindigkeitskonstanten k_{off} und k_{on} zu berechnen, welche die Bindung und Ablösung des Liganden an den Chip-gebundenen AK beschreiben.

Die Auswertung dieser Messungen ergaben eine weitgehende Übereinstimmung der mit dieser Methode berechneten Bindungskonstanten mit dem K_D -Wert aus den ITC-Messungen (Tab. 3.2 und 3.3) Im Unterschied zu den ITC-Experimenten, welche unter Einsatz der F_{ab} -Fragmente der jeweiligen AK durchgeführt wurden, kamen bei der OPR-Messung die vollständigen AK zum Einsatz. Um Aviditätseffekte zu vermeiden, wurden dabei die zu analysierenden AK auf den Sensorchip immobilisiert, da die Bindung des zugeführten Peptids über zwei unabhängige Bindungsstellen verläuft (Lin *et al.*, 2006).

Trotz ähnlicher Bindungseigenschaften der untersuchten AK zum $A\beta_{pE3}$ -Antigen zeigten weitere Untersuchungen Unterschiede hinsichtlich der Selektivität gegenüber verwandten Peptiden. Diese Peptide waren in ihrer Sequenz im Bindungsmotiv verlängert bzw. verkürzt oder zeigten Substitutionen im Vergleich zur Primärsequenz. Im Gegensatz zu AK c#6 und c#24, welche keine Bindung zu alternativen $A\beta$ -Peptiden ausprägen, wurde bei der OPR-Analyse von c#17 Bindungen mit niedriger Affinität an das N-terminal verlängerte $A\beta_{2-18PEGbio}$ und dem murinen $A\beta_{pE3-18PEGbio}$, welches einen bindungsrelevanten AS-Austausch an Position 3 (R5→G5) besitzt, festgestellt.

Die mittels OPR-Methode gemessene schwache Bindung aller drei AK gegenüber dem unmodifizierten $A\beta_{E3-18}$ -Peptid konnte mittels ITC-Messungen nicht bestätigt werden. Lediglich ein abweichender K_D -Wert von 16,3 μ M wurde für AK c#17 bestimmt, was dem 300-fachen gegenüber dem mittels OPR-Messung gemessenen K_D -Wert (57 nM) entspricht. Ebenfalls wurde jedoch in der OPR-Messung eine unspezifische Bindung des $A\beta_{E3-18}$ -Peptids an den primären murinen AK beobachtet, sodass dies eine Ursache für die artifiziell gemessenen K_D -Werte in der OPR-Messung darstellen kann.

Durch die vergleichende Betrachtung der Struktur von F_{ab} im Komplex mit dem humanen $A\beta_{pE3-12Pbio}$ - bzw. mit dem murinen $A\beta_{pE3-18Pbio}$ -Peptid konnte gezeigt werden, dass es sich beim AK c#17 um einen oberflächenexponierten Bindungsmodus ($A\beta_{pE3}$ -Bindungsmodus II, siehe Abschnitt 4.7) handelt, welcher die N-terminale Verlängerung bzw. den Austausch von Aminosäuren am N-Terminus des Peptids tolerieren könnte.

4.3 Mögliche Ursachen des veränderten $A\beta_{pE3}$ -Dissoziationsverhalten von AK c#24

Mittels der OPR-Messung wurde weiterhin belegt, dass die drei analysierten $A\beta_{pE3}$ -spezifischen AK trotz ihrer ähnlichen K_D -Werte unterschiedliche Bindungskinetiken besitzen. Vergleicht man diese Kinetik bei Ausbildung und Dissoziation der drei $A\beta_{pE3}$ -Antikörper-Komplexe, so ist eine besonders auffällig verzögerte Dissoziation, ausgedrückt durch eine um den Faktor 10 verringerte Dissoziationsrate des AK c#24 (Tab. 3.2) (k_{off} von $0,38 \cdot 10^{-3} s^{-1}$) zu verzeichnen. Obwohl in der Literatur Dissoziationsraten von AK zwischen $10^{-7} s^{-1}$ und $10^{-2} s^{-1}$ beschrieben sind (Lin *et al.*, 2006), ist die langsamere Dissoziation des Liganden von c#24 unter diesen $A\beta_{pE3}$ -spezifischen AK eine Besonderheit, da zunächst eine ähnliche Bindungskinetik aufgrund der strukturellen und sequentiellen Ähnlichkeit zu AK c#6 vermutet wurde.

Welche Ursachen könnten dieser veränderten Bindungseigenschaft zu Grunde liegen? Zum einen könnte dies auf eine hohe Anzahl von nichtkovalenten WW hindeuten (1) als auch auf die Existenz von starken nichtkovalenten WW (2), wie z. B. ionischen Interaktionen. Mittels der MOE-Strukturanalyse der Bindungsregion des AK c#24 wurde eine ähnliche Anzahl von WW zum Antigen festgestellt (siehe Anhang Tab. 6.5) wie bei AK c#6 und c#17 (siehe Anhang Tab. 6.4 und 6.6), sodass Annahme 1 ausgeschlossen werden kann.

Obwohl die leichten Ketten der AK c#6 und c#24 bis auf 4 AS in ihrer Aminosäuresequenz völlig identisch sind, unterscheiden sich einige Wechselwirkungen zum Liganden bzw. zu der HC (siehe Abschnitt 3.3.6, Tab. 3.9). So konnte gezeigt werden, dass das K35 der LC (c#24) mit dem D7 des $A\beta_{pE3}$ -Peptids in der Kristallstruktur interagiert (Abb. 4.2C, Tab. 6.5), währenddessen das K35 der LC (c#6) mit dem E103 der HC eine nichtkovalente WW eingehen könnte (Abb. 4.2A).

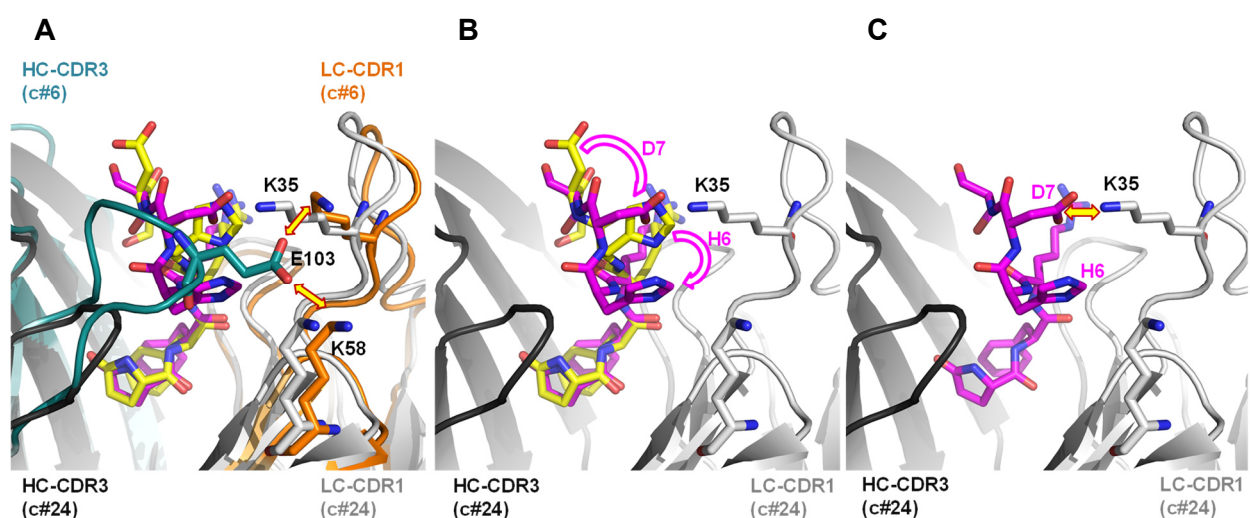


Abb. 4.2: Darstellung der putative ionische WW zwischen $A\beta$ -D7 und K35 der LC des c#24

A) Überlagerung der Bindetasche des F_{ab} c#6 und F_{ab} c#24. CDR3-Region der HC c#6 (cyan) und der HC c#24 (schwarz) zeigen verschiedene *loop*-Ausrichtungen. CDR3 der HC c#6 formt eine ionische WW (gelber Pfeil) durch E103 mit K35 und K58 der LC c#6 (orange) aus, währenddessen CDR3 der HC c#24 keine Interaktion zur LC c#24 (grau) aufweist. Das $A\beta_{pE3}$ -Peptid in der Bindetasche von c#6 (gelb) und c#24 (magenta) sind hier nur bis zum S8 gezeigt. B) Die $A\beta_{pE3}$ -Peptide zeigen eine vergleichende Positionierung des pE-Restes, unterscheiden sich jedoch in der Orientierung des H6 und D7. So liegen diese beiden Reste des $A\beta_{pE3}$ -Peptids in der Bindetasche des c#24 wesentlich näher an der LC, so dass das $A\beta$ -D7 eine mögliche ionische WW (gelber Pfeil) zum K35 der LC des c#24 eingehen kann (C).

Betrachtet man die CDR3-Region der HC des AK c#6, welche aus 10 AS-Reste besteht, so ist zu erkennen, dass der gebildete *loop* eine Brücke zur CDR1-Region der LC ausbildet, so dass eine mögliche ionische WW als nichtkovalente Bindungen zum K35 und K58 die Interaktion zwischen LC und HC vermitteln könnte. Der CDR3-*loop* der HC des AK c#24 besteht aus 6 AS und formt eine kürzere Schleife aus, die keine Interaktion zur CDR1-Region der LC ermöglicht.

Um den Einfluss dieser zusätzlichen WW zum A β _{pE3-18}-Peptid zu untersuchen, wurde das Asp7 des A β _{pE3-18}-Peptids gegen ein Alanin substituiert und die OPR-Messung erneut mit AK c#24 durchgeführt, wobei eine Verschiebung des k_{off} -Wertes von $0,38 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ auf $3,28 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ gezeigt werden konnte (Abb. 3.11). Als Kontrolle erfolgte ebenfalls eine OPR-Messung zwischen dem D7A-modifizierten Peptid und AK c#6 durchgeführt, wobei keine Änderung der k_{on} und k_{off} -Werte gemessen werden konnte. Somit kann angenommen werden, dass eine nichtkovalente WW zum A β -D7 in der Bindetasche des c#24 existiert, die für die langsamere Dissoziation des Antigens vom AK verantwortlich ist.

Neben der möglichen ionischen WW, die als Ursache für das langsamere Dissoziationsverhalten des AK c#24 in Frage kommen könnte, sollte ebenfalls die Involvierung einer großen Antikörper/Liganden-Kontaktfläche von $\sim 930 \text{ \AA}$ (Tab.3.10; Tab.4.1) betrachtet werden. So besitzt der AK c#24 die größte Interaktionsfläche zum A β _{pE3}-Peptid im Vergleich zu den beiden anderen AK c#6 und c#17, wobei in gleichem Maße LC und HC beteiligt sind. YSERN *et al.* konnten bereits zeigen, dass ein Verlust an Kontaktfläche mit der Verringerung der Gibbs-Energie gekoppelt ist und dies bis zu einer 1000-fachen Erhöhung des K_{D} -Wertes führen kann (Ysern *et al.*, 1994). Diese Analyse zeigte die Wichtigkeit der dicht gepackten Van-der-Waals-Kräfte, die Auswirkungen auf die Affinität von Antikörpern haben kann. Aus diesem Grund kann vermutet werden, dass die große Antikörper/Liganden-Kontaktfläche des AK c#24 ein langsames Ablösen des Bindungspartners von der AK-Bindetasche bedingt.

Vergleicht man die Antikörper/Liganden-Kontaktfläche der drei Antikörper zu publizierten F_{ab}/A β -Komplexen (Crespi *et al.*, 2015), so zeigt sich, dass c#24 eine ähnlich große Antikörper/Liganden-Kontaktfläche besitzt wie Solanezumab (Tab.4.1), welcher das A β -Peptid in der mittleren Region bindet. Zudem überragen sie teilweise die bekannten Antikörper/Liganden-Kontaktflächen von anderen F_{ab}/Peptid-Strukturen (Raghunathan *et al.*, 2012).

Tab. 4.1: Bekannte Antikörper/Liganden-Kontaktflächen von F_{ab}/A β -Komplexen

Name des Antikörpers	Antikörper/Liganden-Kontaktfläche (Å ²)
c#6	818
c#24	<u>932</u>
c#17	616
PFA1, PFA2,12A11,10D5,12B4	~727*
Bapineuzumab	537*
Solanezumab	<u>960*</u>
Ponezumab	631*
Aducanumab	530#

* entnommen aus (Crespi *et al.*, 2015); # entnommen aus Bussiere *et al.*, 2014

4.4 Entdeckung eines neuen A β -Bindungsmodus

Die Bindetaschen der AK c#6 und c#24 prägen eine V-förmige Kavität aus, die es ermöglicht, den N-Terminus des A β -Peptids zwischen LC und HC zu positionieren. Dieser A β _{pE3}-Bindungsmodus I unterscheidet sich grundlegend von A β _{pE3}-Bindungsmodus II und den bisher publizierten AK/A β -Bindungsformen, da das Pyroglutamat bis zu den AK-Aminosäureresten des Antikörpergerüsts (*framework*), den sogenannten Venierpositionen, vordringt. Mit der veröffentlichten Struktur von Bapineuzumab (PDB-Code:4HIX; Miles *et al.*, 2013), einem humanisierten A β _{1-x}-spezifischen AK, wurde ebenfalls ein Bindungsmodus beschrieben, welcher den N-Terminus des A β ₁₋₂₈-Peptids zwischen der Kontaktfläche der LC und HC positioniert. In der Überlagerung der Bindetaschen ist zu erkennen, dass das A β -Peptid ebenfalls in einer V-förmigen Kavität gebunden ist, allerdings dessen N-Terminus nicht die AS-Seitenketten in den Venierpositionen erreicht (Abb. 4.3).

Mit der Überlagerung der einzelnen AK-Domänen über das C α -Atom des Rückgrats der Aminosäurekette (*backbone*) und den daraus ermittelten RMSD-Werten (Tab.3.8) konnte gezeigt werden, dass die Abweichung der Hauptkettenstruktur aller Domänen der A β _{pE3}-spezifischen F_{ab}-Fragmente trotz der unterschiedlichen Aminosäuresequenzen sehr gering ist (Abb.3.13C und D). Das *backbone* des gesamten F_{ab}-Fragment des c#17 weicht hauptsächlich durch die Drehung des konstanten Bereichs (CH₁ und C_L-Domäne) um die horizontale Achse von der Struktur des AK c#6 bzw. AK c#24 ab (RMSD ~ 5,6Å, Abb.3.13A und B).

Von EWERT *et al.* (Ewert, Honegger, & Plückthun, 2004) wurden im Allgemeinen in Abhängigkeit des Antigens drei Bindungsmodi unterschieden. Die Autoren beschreiben anhand vergleichender struktureller Analyse (mit 59 Strukturen), dass Haptene (unvollkommene, meist niedermolekulare Antigene) tiefer in der Bindetasche gebunden und somit zwischen der V_H-V_L-Kontaktfläche positioniert werden (Bindungsmodus A) als Peptide/Oligomere (Bindungsmodus B) bzw. große Proteine, die durch die Involvierung der äußeren Schleifen (*outer loops*) überwiegend mit der Oberfläche der Bindetasche (Bindungsmodus C) interagieren.

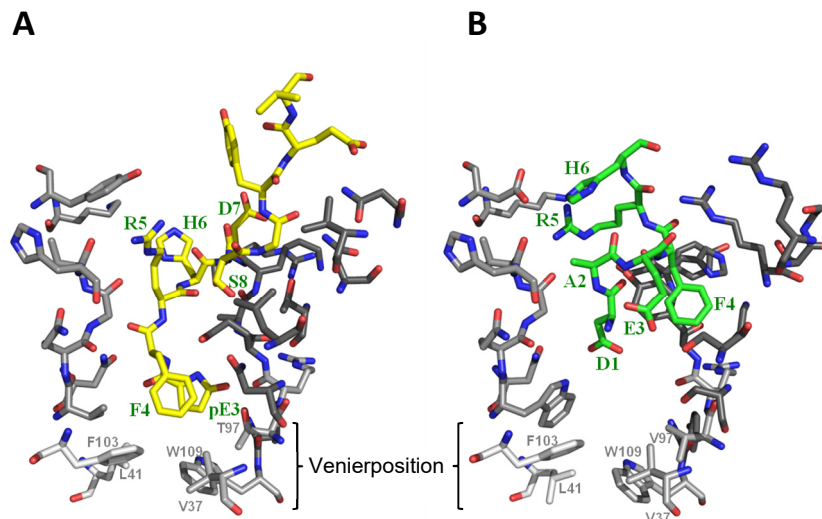


Abb. 4.3: Vergleich der Bindetaschen des AK c#6 und Bapineuzumab

A) Bindetasche des F_{ab} c#6 im Komplex mit Aβ_{pE3-12} (gelb) B) Bindetasche des F_{ab}-Fragments von Bapineuzumab in Komplex mit Aβ₁₋₂₈ (grün, 6 Reste sind nur gezeigt). Venierpositionen des AK-Gerüsts sind grau beschriftet.

Allerdings trifft diese Eingruppierung nur teilweise für alle bisher veröffentlichten F_{ab}/Aβ-Strukturen zu, da von mehreren Autoren bereits gezeigt werden konnte, dass auch verkürzte Peptide in der Bindetasche des AK oberflächenexponiert vorliegen können und nur zum Teil in die V_L-V_H-Kontaktfläche eingebunden werden. Darunter zählen zum einen die Aβ_{1-x}-spezifischen F_{ab}-Fragmente von GARDBERG *et al.*, BASI *et al.* oder MILES *et al.* (siehe Einleitung Abb.1.7, Tab. 1.3), die unabhängig von der Länge des Aβ C-Terminus (z.B. Aβ₁₋₇ oder Aβ₁₋₄₀) immer den gleichen Bindungsmodus mit oberflächenexponierten Liganden zeigen (Gardberg *et al.* 2007, Miles *et al.*, 2008 oder Basi *et al.*, 2010). Resultierend daraus kann nicht pauschal eine Abhängigkeit von Antigengröße und Bindungsmodus angenommen werden, da die Lage der Epitope (N-terminal oder in der Mitte der AS-Sequenz des Proteins lokalisiert) ebenfalls eine Rolle in der Antigenerkennung spielt. Die in dieser Arbeit verwendeten Antigene liegen N-terminal des vollständigen Aβ-Peptids. Im Kontrast zu den typisch für Peptide und Oligomere Von EWERT *et al.* beschriebenen Bindungsmodus B, bindet der Aβ_{pE3}-N-Terminus in den F_{ab}-Fragmenten von AK c#6 und c#24 in einer ähnlichen Art wie Haptene. Die Involvierung von Aminosäureseitenketten aus dem *framework* in der Ligandenbindung konnte bereits in der Literatur gezeigt (Honegger & Plückthun, 2001; Jung *et al.*, 2001) werden, allerdings ist die tiefe Lage der pE3-F4-Kopfgruppe des Aβ_{pE3}-Peptids in der AK-Bindetasche von c#6 und c#24 eine bis dato nicht vergleichbare Positionierung zu anderen Aβ-Liganden, da die hydrophobe Eingruppierung der pE3-F4-Kopfgruppe des Aβ-Peptids durch die umliegenden *framework*-Reste ermöglicht wird.

4.5 AK c#6 zeigt eine Antigen-abhängige Flexibilität der CDR-loops

Um zu untersuchen, ob die Bindetaschen der pE-spezifischen AK in Abhängigkeit des Liganden eine Konformationsänderung vollziehen, wurde beispielhaft das F_{ab} -Fragment c#17 und c#6 sowohl im Komplex mit dem $A\beta_{pE3-12/18}$ -Peptids als auch ohne Ligand kristallographisch analysiert. Zudem wurde zur Analyse des F_{ab} c#17 ein weiterer Komplex mit dem murinen $A\beta_{pE3-18}$ -Peptid herangezogen. Durch den Vergleich der drei Strukturen des F_{ab} -Fragments c#17 konnte gezeigt werden, dass die Orientierung der Seitenketten in der Bindetasche eher starr ist (unabhängig von den Kristallisationsbedingungen und der Kristallpackung) und die Bindetasche für den Liganden bereits im ungebundenen Stadium ohne die Notwendigkeit einer Konformationsänderung zugänglich ist, konsistent mit dem kristallographischen B-Faktor. Man kann somit annehmen, dass AK c#17 bereits eine *preformed binding site* besitzt, wo alle AS-Seitenketten der Bindungsregion bereits in die für die Peptidbindung notwendigen Position ausgerichtet sind. Im Gegensatz dazu wird angenommen, dass anhand von schlecht definierten Bereichen in der Bindetasche der ungebundenen Struktur des F_{ab} c#6 die CDR-loops (vor allem CDR1 und CDR3 der HC) beweglich in den Einheitszellen des Kristalls vorliegen. Vergleichend dazu wurde im Komplex mit dem $A\beta_{pE3-18}$ -Peptid eine verringerte CDR-Flexibilität der LC anhand der B-Faktoranalyse gemessen, sodass geschlussfolgert werden kann, dass für die Bindung des $A\beta_{pE3}$ -Peptids die Beweglichkeit der CDR-Reste eine Voraussetzung ist. Aufgrund der engen Bindetasche war es zudem schwer vorstellbar, wie der globuläre N-Terminus des $A\beta_{pE3}$ -Peptids seinen hydrophoben Zielort, welcher zwischen dem *interface* von LC und HC lokalisiert ist, erreicht. Da eine enge AK-Öffnung das Einlagern der pE3-F4-Kopfgruppe erschwert (Abb. 4.4), kann vermutet werden, dass eine offenere Konformation der freien Bindetasche existiert. Nach Bindung des $A\beta$ -Peptids könnte dann die Fixierung der CDR-loops vonstatten gehen, was in der Literatur auch als *induced fit* beschrieben wird (Koshland, 1958).

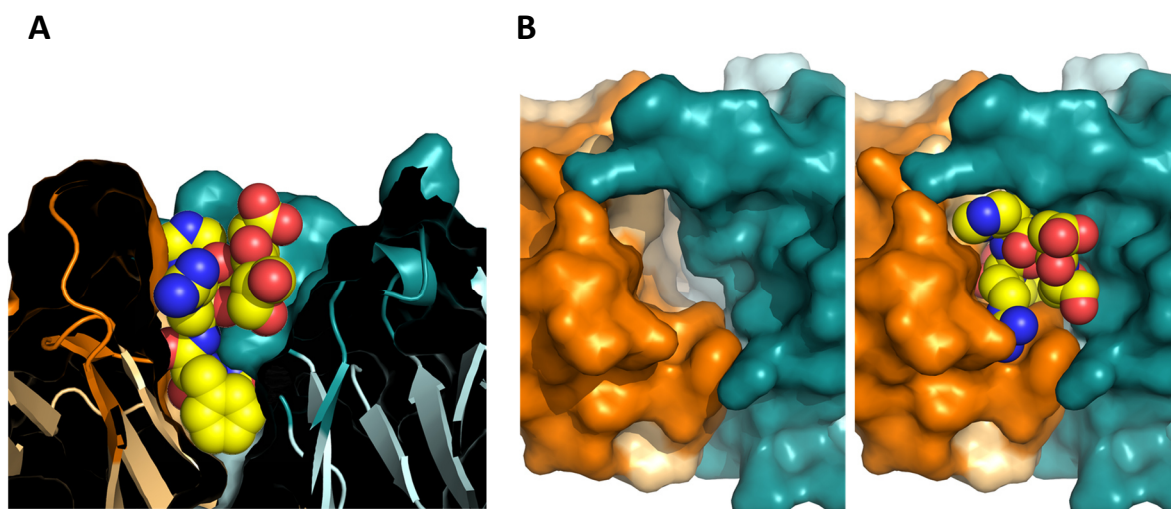


Abb. 4.4: Darstellung der Einlagerung des $A\beta_{pE3}$ -N-Terminus in die V-förmige Kavität des AK c#6

Die Bindetasche ist gezeigt von der Seite (A) und von oben (B). CDRs der LC (orange) und CDRs der HC (cyan) bilden den engen Eingang im gebundenen AK/ $A\beta_{pE3-12}$ -Komplex aus.

Die Änderung des B-Faktors in Abhängigkeit der Ligandenbindung konnte zudem auch mit vergleichender Analyse des ungebundenen und gebundenen HIV-1 neutralisierenden AK spezifisch für ein V3-*loop*-Peptid des HIV-1 gezeigt werden (Rini *et al.*, 1993; Stanfield *et al.*, 1993). Ebenfalls wurde die Antigen-induzierte Konformationsänderung von Antikörpern in der Literatur berichtet. Diese Veränderungen treten zum einen als Umlagerung von Seitenketten (Arevalo *et al.*, 1993), Verlagerungen von CDR-Segmenten, Neuorientierungen gesamter CDR-*loops* (Herron *et al.*, 1991; Rini *et al.*, 1991) oder Veränderung in der relativen Anordnung von V_L - zur V_H -Domäne auf (Bath *et al.*, 1990; Herron *et al.*, 1991). Allerdings wurden in gleicher Weise auch F_{ab} -Strukturen gefunden, deren Konformation sich im gebunden und ungebunden Zustand nicht veränderten (Gigant *et al.*, 1997).

4.6 Strukturen des A β -N-Terminus

Die Struktur des A $\beta_{1-40/42}$ -Peptids wurde bisher vielseitig untersucht. Dabei handelt es sich überwiegend um NMR-Studien, die zeigen konnten, dass es sich um ein pleiomorphisches Peptid handelt, welches in Abhängigkeit von seiner Umgebung verschiedene Konformationen (Clippingdale *et al.*, 2001; Coles *et al.*, 1998) einnehmen kann. Die Tendenz der schnellen A β -Aggregation bewirkt zudem ein erschwertes Handhaben des A β -Peptids in wässriger Lösung und man war gezwungen, Detergenzien und organische Lösungsmittel einzusetzen, um strukturelle Studien von A β -Monomeren durchführen zu können, welche weniger auf physiologischen Bedingungen basieren. So wurden Trifluoressigsäure (TFE) als auch HFIP als organische Lösungsmittel sowie SDS-haltige Puffer verwendet, um das Peptid an der Aggregation zu hindern (siehe Tab. 4.2). TOMASELLI *et al.* gelangen es, die Struktur des A β_{1-42} -Peptid in nahezu löslicher Umgebung zu beschreiben (Tomaselli *et al.* 2006) (Tab. 4.2). Dabei zeigte sich, dass es aus einem flexiblen N- und C-Terminus besteht, welche eine N-terminal liegende Helix (Y10-D23) einrahmen. Zudem war es möglich, in Abhängigkeit des HFIP/Wasser-Verhältnisses zu demonstrieren, dass mit sinkender Konzentration an HFIP diese N-terminale Helix des A β -Peptids bestehen bleibt, allerdings eine in HFIP zusätzlich geformt C-terminale Helix (K28-G38) verschwindet, sobald die Menge an Wasser mehr als 80 % erreicht (Crescenzi *et al.*, 2002; Tomaselli *et al.*, 2006). Darüber hinaus konnte mit CD-spektroskopischen Analysen eine nahezu vollständige β -Faltblattbildung bei einem HFIP/H₂O-Verhältnis von 1:99 dokumentiert werden (Tomaselli *et al.*, 2006).

Tab. 4.2: Ausgewählte NMR-Strukturen des A β _{1-40/42}-Peptids

Peptid	Umgebung	Sekundärstrukturen	PDB code	Referenz
A β ₁₋₄₀	TFE/H ₂ O 40:60, pH 2,8	H1 15-23, H2 31-35	1AML	Sticht <i>et al.</i> , 1995
A β ₁₋₄₀	100 mM SDS, pH 5,1	H1 15-38, Knick 25-27	1BA4	Coles <i>et al.</i> , 1998
A β ₁₋₄₂	HFIP/H ₂ O 80:20	H1 7-40	1IYT	Crescenzi <i>et al.</i> , 2002
A β ₁₋₄₂	HFIP/H ₂ O 30:70	H1 10-23, H2 28-38	1Z0Q	Tomaselli <i>et al.</i> , 2006
A β ₁₋₄₀	50 mM NaCl, pH 7,3, 15 °C	H1 13-23	2LFM	Vivekanandan <i>et al.</i> , 2011

H1 =Helix 1, H2=Helix 2

VIVEKANANDAN *et al.* gelang es in wässriger Umgebung bei einem physiologischem pH von 7,3 die NMR-Daten des A β ₁₋₄₀-Peptids zu erhalten (Vivekanandan *et al.*, 2011). Sie konnten ebenfalls zeigen, dass das Peptid eine zentrale hydrophobe helikale Region (H13-D23) besitzt, die vom flexiblen N- und C-Terminus eingerahmt wird. Obwohl diese A β -Enden keine stabilen Sekundärstrukturen aufweisen, sind sie nicht komplett unstrukturiert. Bereits Lim *et al.*, 2006 schilderte mittels Relaxations-NMR, dass der N-Terminus teilweise strukturiert ist und unter amyloiden Bedingungen (Anstieg der Temperatur, niedriger pH-Wert und die Präsenz von Zn²⁺-Ionen) schrittweise diese Struktur verliert. Zum anderen konnte mittels der Untersuchung der NMR-Daten von VIVEKANANDAN *et al.* hydrophobe Interaktionen des N- bzw. C-terminalen Endes mit hydrophoben Resten der mittleren Region zur Ausbildung von zwei *hairpin*-Strukturen dargestellt werden. Es kann angenommen werden, dass die N-terminalen Enden ebenfalls Einfluss auf die Ausbildung der A β -Gesamtstruktur haben. Strukturelle Studien mittels Cryo EM und NMR-Spektroskopie an A β ₄₂-Fibrillen zeigen zudem, dass der N-terminus (Reste D1 bis V12/H14) des A β -Peptids (aus der Fibrille) flexibel ist und für die Bindung von N-terminalen Antikörpern zugänglich (Petkova *et al.*, 2002; Schmidt *et al.*, 2015; Wälti *et al.*, 2016).

Die Möglichkeit, die N-terminale Struktur von A β -Peptiden in der Bindetasche von AK zu untersuchen, bietet zusätzlich eine geeignete Variante zur Analyse dieser N-Termini. Die bisher veröffentlichten Strukturen der A β -Peptide in der Bindetasche von Antikörpern sind in Abb.4.5A mittels der Position der C α -Atome des F4 und R5-Restes überlagert. Dabei konnte die gleiche Orientierung der Seitenketten von A1 bis S8 gezeigt werden.

Inwieweit sich die Gesamtstruktur des A β _{pE3-40/42}-Peptids von der Struktur des A β _{1-40/42} unterscheidet, ist weitestgehend unbekannt. Die bisher einzige veröffentlichte Struktur des N-Termini des A β _{pE3}-Peptids konnte im Komplex mit dem A β _{1-x}-spezifischen AK PFA1 von Gardberg *et al.*, 2009 (PDB Code:3EYS) gezeigt werden (Abb.4.5A, cyan). PFA1 ist ein Antikörper, welcher gegen das A β _{1-x} gerichtet ist (K_D = 60-120 nM), allerdings Kreuzreaktivität zum A β _{pE3}-Peptid mit einem K_D -Wert von 3 μ M zeigt. Das pE3 liegt im Komplex außerhalb der Bindetasche des AK PFA1 und gehört nicht zum gebundenen Epitop des A β _{pE3-8}-Peptids.

Die Struktur des $A\beta_{pE3}$ -N-Terminus besitzt dabei nur wenig Übereinstimmung mit der demonstrierten pE3-F4-Kopfgruppe des $A\beta_{pE3}$ -Peptid in den Bindetaschen der in dieser Arbeit dargelegten AK (Abb.4.5B). Allerdings ist in der Struktur von Gardberg *et al.*, 2009 der pE3-Rest des $A\beta_{pE3}$ -Peptids in der ($2F_{o}-F_{c}$)-Elektronendichte (konturiert bei 1.0σ) kaum definiert und in der *omi map*, (konturiert bei) $+3.0\sigma$, gar nicht sichtbar, sodass die strukturellen Informationen zur Orientierung des pE3 in Frage steht.

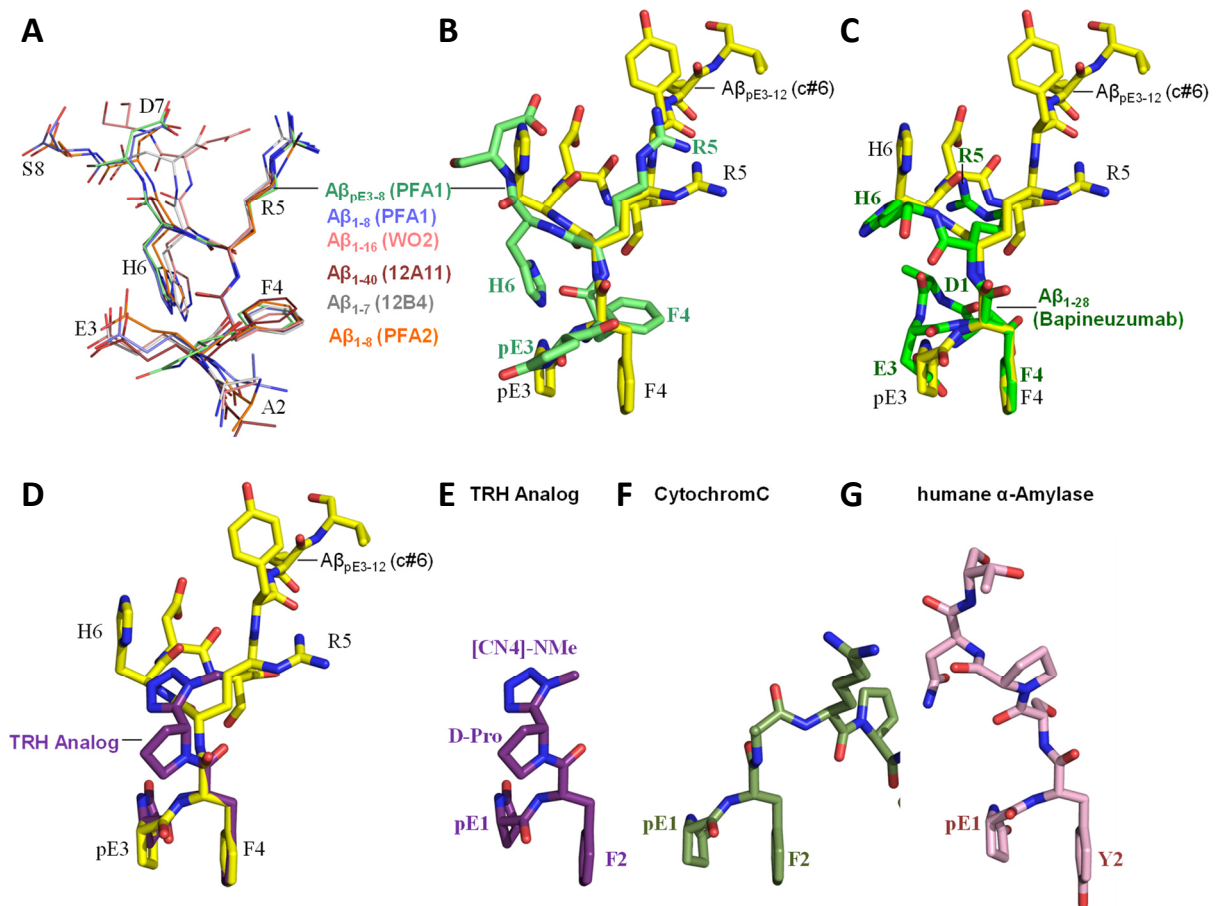


Abb. 4.5: Darstellung der Überlagerung verschiedener N-terminalen Strukturen des $A\beta$ -Peptids (A-C) und Vergleich zu publizierten N-Termini von nichtverwandten Proteinen (D-G)

A) Überlagerung publizierter N-terminaler $A\beta$ -Strukturen entnommen aus dem Komplex mit F_{ab} -Fragmenten bekannter AK (siehe Klammern) über die Atome der F4-R5-Verbindung. Die $A\beta_{1-x}$ -Peptide aus dem Komplex mit PFA1 (blau, 2IPU), WO2 (rosa, PDB:3BKJ), 12A11 (violett, PDB:3IFN), 12B4 (grau, PDB:3IFO) und PFA2 (orange, PDB:2ROW) besitzen vergleichbare Orientierungen der Seitenketten A2-H6. Ebenfalls ist das $A\beta_{pE3}$ -Peptid aus dem Komplex mit PFA1 (mint, 3EYS) gezeigt und in B) auf die $A\beta_{pE3}$ -Struktur aus dem Komplex von c#6 (gelb) gelegt. C) Superposition des $A\beta_{1-28}$ aus dem Komplex mit dem F_{ab} -Fragment des AK Bapineuzumab (grün, 4HIX) und der $A\beta_{pE3}$ -Struktur aus dem Komplex von c#6 (gelb). D-G) Darstellung der pE1-F2-Kopfgruppe in nichtverwandten Proteinen mittels Überlagerung über die Atome der pE-F-Verbindung E) TRH-Analogen (lila, kein PDB-Code vorhanden) F) pE1-P4 des Cytochrom C (dunkelgrün, PDB: 2YLI) G) pE1-T5 der humane α -Amylase (dunkelgrün, PDB: 4X9Y).

Das Vorkommen der parallelen pE3-F4-Kopfgruppe in allen drei Bindetaschen der $A\beta_{pE3}$ -spezifischen AK unterstützt die Hypothese, dass es sich vermutlich um eine stabile N-terminale $A\beta_{pE3}$ -Konformation handelt. Um herauszufinden, ob diese pE3-F4-Kopfgruppe nur

charakteristisch für $A\beta_{pE3}$ -Peptide ist, oder ebenfalls N-Terminal auch in anderen Peptiden bzw. Proteinen vorkommt, wurde nach publizierten Strukturen gesucht, die pE am N-terminus tragen. In Tabelle 4.3 ist beispielhaft aufgelistet, welche strukturell bekannten Proteine pE-modifiziert sind.

Tab. 4.3: Beispielhafte Auswahl von bekannten Strukturen pE-modifizierter Proteine

Protein	Organismus	N-terminale Sequenz	parallele Formation	PDB code	Referenz
Thyrotropin-releasing-Hormon-Analagon		pE F D-Pro	ja	-	(Howell <i>et al.</i> , 1995),
Angiogenin	Homo sapiens	pE DNS	nein	1B1I	(Leonidas <i>et al.</i> , 1999)
Cytotox. RC-RNase 3	Rana catesbeiana	pE DWE	nein	1Z5F	(Lou <i>et al.</i> , 2006)
Orexin-A (NMR)		pE PLP	nein	1WSO	(Takai <i>et al.</i> , 2006)
Humanes insulin-like peptide 5 (NMR)	Homo sapiens	pE DLQ	nein	2KBC	(Haugaard-Jönsson <i>et al.</i> , 2009)
Cytochrom C	Alcanigenes xylooxidans (gram)	pE FAK	ja	2YLI	(Antonyuk <i>et al.</i> , 2011)
humane α-Amylase	Homo sapiens	pE YSP	ja	4GQQ	(Williams <i>et al.</i> , 2012)
Xyloglucan-specific endo-β-1,4-glucanase (XEG)	Daucus carota	pE PSF	nein	4X9Y	nicht publiziert
Papaya plant-defense barwin-like protein	Carica papaya	pE SAS	nein	3VLA	(Yoshizawa <i>et al.</i> , 2012)
Cellulose induziertes Protein C (CIP1)	Hypocrea jecorina (Pilz)	pE ISD	nein	4JP6	(Huet <i>et al.</i> , 2013)
Schlangengift	Micrurus tener	pE IRP	nein	3ZYP	(Jacobson <i>et al.</i> , 2013)
EpCAM (epithelial cell adhesion molecule)	Homo sapiens	pE EEC	nein	4NTW	(Baconguis <i>et al.</i> , 2014)
Neurotensin	Homo sapiens	pE LYE	nein	4MZV	(Pavšič <i>et al.</i> , 2014)
Human Relaxin-2	Homo sapiens	pE LYS	nein	4PO7	(Quistgaard <i>et al.</i> , 2014)
				2MV1	(Haugaard-Kedström <i>et al.</i> , 2015)

Mit der Struktur des Thyrotropin-releasing-Hormon-Analagons (Howell *et al.*, 1995) bzw. der N-Terminalen Struktur des Cytochrom C (Antonyuk *et al.*, 2011), welche neben dem pE am N-Terminus auch ein Phenylalanin an zweiter Position aufweisen, konnte ebenfalls eine parallele Orientierung dieser beiden Aminosäureseitenketten nachgewiesen werden (Abb. 4.5 D-F).

Zudem zeigte die N-terminale Struktur der humanen α -Amylase (Williams *et al.*, 2012), beginnend mit Pyroglutamat-Tyrosin ebenfalls eine vergleichbare Formation (Abb. 4.5G), sodass man schlussfolgern kann, dass das Vorkommen des pE in Kombination mit einer aromatischen AS mit einem Ringsystem (wie Phenylalanin oder Thyrosin) die parallele Orientierung hervorruft und stabilisiert. Hingegen konnte mit der Folge anderer AS-Seitenketten, welche dem pE folgen, keine strukturellen Übereinstimmungen gezeigt werden.

Durch NMR Spektroskopie wurde bereits demonstriert, dass die N-terminale pE-Modifizierung einen signifikanten Effekt auf die Fähigkeit hat, helikale Sekundärstrukturen auszubilden (Sun *et al.*, 2012). So konnte gezeigt werden, dass $A\beta_{pE3-40}$ eine verringerte helikale Strukturausprägung als $A\beta_{1-40}$ aufweist. Neuere strukturelle Erkenntnisse liefert zudem die Veröffentlichung von DAMMERS *et al.* (Dammers *et al.*, 2015). Durch die vergleichende NMR-Analyse von nichtmodifizierten $A\beta_{3-40}$ mit $A\beta_{pE3-40}$ konnten die Autoren eine Verschiebung des Phenylalanins F4 beobachtet, welches durch eine strukturelle Umlagerung des F4 in Kombination mit dem N-terminalen Pyroglutamat erklärt werden könnte.

Inwieweit die Ausbildung dieser strukturierten Enden des $A\beta_{pE3}$ -Peptids jedoch funktionelle Eigenschaften haben, wurde bisher nicht untersucht.

Allerdings wurde schon frühzeitig gezeigt, dass pE-modifizierte Proteine vor Aminopeptidasen geschützt sind (Kuo *et al.* 1998; Saido 1998). Die Aminopeptidase A, welche eine membrangebundene oberflächenexponierte Glutamyl-Aminopeptidase darstellt (Li *et al.*, 1993a), wird als Ca^{2+} -abhängiges Enzym beschrieben, welches bevorzugt Proteine/Peptide mit saurem Aminosäurerest in ihrem polarem aktiven Zentrum spaltet (Yang *et al.*, 2013). Sie ist weitreichend in vielen Geweben exprimiert, inklusive dem Gehirn (Li *et al.*, 1993b; Zini *et al.*, 1997), sodass man sie als potentiellies Angriffenzym für $A\beta_{3-40/42}$ -Peptide beschreiben könnte. Die Modifizierung des N-terminalen Glutamats zu Pyroglutamat von $A\beta$ -Peptiden verhindert die Ausbildung einer N-terminalen Ladung und somit eine Substratbindung. Die Aminopeptidase N, welche wie die Aminopeptidase A in die M1 Familie der Metalloenzyme gehört und ebenfalls auf Zelloberflächen des Nervensystems exprimiert wird, spaltet vorzugsweise neutrale Aminosäuren, meistens Alanin (Chen *et al.*, 2012). Inwieweit, diese Aminopeptidase in der Lage wäre, auch pE-modifizierte Proteine zu spalten und ob es eine differentielle Spaltungseffizienz in Abhängigkeit zur Aminosäuresequenz an zweiter Position des *targets* gäbe, könnte zukünftig untersucht werden. Zudem sind drei verschiedene Typen von Säugetier-Pyroglutamat-Peptidasen in der Literatur beschrieben, die in Hinblick auf ihre Substratspezifität unterschieden werden (Philip M. Cummins & O'Connor, 1998). So wird angenommen, dass die pE-Peptidase 1 (PP 1) cytosolisch lokalisiert ist und eine weites Substratspektrum aufweist, mit Ausnahme von pE-Pro-Bindungen (Cummins & O'Connor, 1996). Allerdings wurde bisher die Spaltung von pE-Phe-Bindungen noch nicht untersucht, so dass nicht klar ist, ob diese Proteine mit einer möglichen N-terminalen pE1-F2-

Formation Kandidaten für diese Peptidase darstellen. Die PP 2 hingegen wird als membranverankerte TRH-spezifische Peptidase beschrieben, welche nach Substitution der zweiten Aminosäure von His zu Phe eines TRH-Analogons keine Katalyse mehr durchführen kann (Elmore *et al.*, 1990; Lanzara *et al.*, 1989), sodass anzunehmen ist, dass die Ausprägung einer parallelen pE1-F2-Formation (siehe Abb. 4.5E) die Umsetzung des TRH-Analogon verhindern könnte. Entsprechend dazu könnte man sich vorzustellen, dass $A\beta_{pE3}$ -Peptide mit paralleler pE3-F4-Formation vergleichend zu anderen pE-modifizierten Proteinen eine widerstandsfähigere Struktur gegenüber einem N-terminalen Abbau darstellen.

Zudem könnte die parallele pE3-F4-Kopfgruppe des $A\beta_{pE3}$ -Peptids auch eine Ursache für das gesteigerte Aggregationsverhalten und der damit verbundenen Toxizität sein. Um dies zu untersuchen wäre es notwendig, Substitutionen des F4 im $A\beta_{pE3}$ -Peptid durchzuführen und mit den erhaltenen $A\beta_{pE3}$ -Mutanten vergleichend zum $A\beta_{pE3}$ -Wildtyp Aggregationsstudien durchzuführen.

4.7 Verwendung der Antikörperbindungs- und Strukturdaten für die Entwicklung von Therapeutika

Für die Entwicklung von therapeutischen AK ist es notwendig, die murinen AK zu humanisieren, um die Immunogenität dieser AK für die Verwendung im Menschen zu minimieren (Riechmann *et al.*, 1988). Zudem sollte die Affinität und Spezifität des AK-Kandidaten mit diesem Prozess nicht verloren gehen. Üblicherweise erfolgt ein Humanisierungsprozess durch die Fusion der CDR-Sequenzen des murinen AK in die AS-Sequenz eines humanen AK-Gerüsts. Die Wahl der humanen Sequenz ist dabei von großer Bedeutung, da man einen sequenzähnlichen AK präferiert, um die strukturelle Umgebung – das sogenannte *framework* - der CDRs weitestgehend beizubehalten. Sind jedoch auch Reste aus dem *framework* des murinen AK an der Bindung des Liganden beteiligt, sollten diese zur Erhaltung der Affinität ebenfalls in das humane AK-Gerüst überführt werden. Die strukturelle Beschreibung und die damit verbundene detaillierte Analyse der an der Bindung beteiligten AS-Seitenketten des murinen AK kann also bei der Generierung eines humanen AK eine enorme Rolle spielen. Mit der Analyse der $F_{ab}/A\beta_{pE3}$ -Komplexe des AK c#6, c#24 und c#17 konnten einige AS-Reste identifiziert werden, die sich außerhalb der CDRs befinden (an den Venierpositionen) und WW mit dem Liganden eingehen (Tab.3.9). Dazu gehört das T97 der HC-c#6, welches eine Wasserstoffbrücke zum pE-Rest des $A\beta$ -Peptids ausbildet. Zum anderen ist auch eine gerichtete π -Bindung des LC-Y54 zum $A\beta$ -H6 im F_{ab} c#24/ $A\beta_{pE3}$ -Komplex zu finden. Darüber hinaus sind hydrophobe WW durch V, W oder F aus dem *framework* der AK c#6 und c#24 aufgrund der tiefen Bindetasche ($A\beta_{pE3}$ -Bindungsmodus I) der $A\beta_{pE3}$ -Bindung beteiligt. Der AK c#17 besitzt hingegen nur eine AS-Seitenkette in der Venierposition, die eine hydrophobe WW zum F4 ausprägt.

Eine erfolgversprechende Strategie ist es zudem, einen murinen AK zunächst in seinen Eigenschaften zu prüfen, um diesen anschließend als Parental-AK für eine Humanisierung zu verwenden. Eigenschaften wie hohe Affinität und Spezifität, die anschließend ebenfalls im humanisierten AK erwünscht sind, dienen als vorteilhafter Startpunkt im murinen AK. Da der AK c#17 im Vergleich zu dem AK c#6 und c#24 eine niedrigere Spezifität gegenüber dem $A\beta_{pE3}$ -Peptid aufwies, wäre dieser AK weniger attraktiv als AK-Kandidat.

Mittels des Thioflavin-T-Tests wurde gezeigt, dass durch die Zugabe der $A\beta_{pE3}$ -spezifischen AK zu $A\beta_{pE3-42}$ eine Inhibierung der $A\beta$ -Aggregation erfolgt, sodass man unter *in vitro*-Bedingungen belegen konnte, dass alle drei AK die Ausbildung höherer $A\beta$ -Aggregate, wie Protofibrillen und Fibrillen (in einem AK/ $A\beta$ -Peptidverhältnis von 1:2,5) vollständig unterdrücken. Somit kann angenommen werden, dass in diesem Mischverhältnis die Mehrheit der $A\beta_{pE3-42}$ -Monomere im Komplex mit dem jeweiligen AK vorliegt und als solcher Komplex im Elektronenmikroskop nicht sichtbar werden. Desweiteren wurde durch die Verwendung des AK c#17 in einem AK/ $A\beta$ -Peptidverhältnis von 1:5 beobachtet, dass sich neben Fibrillen auch kleinere runde, möglicherweise oligomerartige Strukturen ausbilden, die mit Zugabe des AK c#6 und c#24 nicht auftraten. Inwieweit die Ausbildung dieser Strukturen mit dem Bindungsmechanismus korreliert, könnte weiterhin untersucht werden.

Es ist allerdings noch einmal zu betonen, dass die Eigenschaften dieser $A\beta_{pE3}$ -spezifischen AK in einem umfassenden Modell *in vivo* untersucht werden müssten, bevor die Wahl des fähigsten AK für eine anschließende Humanisierung erfolgen kann.

4.8 Struktur versus Funktion: Bapineuzumab, mE8 und Aducanumab als Vorgängerbeispiel

Die bisher veröffentlichten Kristallstrukturen der F_{ab} -Fragmente von $A\beta$ -spezifischen AK wurden bereits in der Einleitung (siehe Tab.1.3) aufgelistet. Sie zeigen vermutlich nur einen kleinen Teil an möglichen $A\beta$ -Bindungsmodi. Trotz der ansteigenden strukturellen Daten von AK-Bindetaschen konnte bisher keine Korrelation zwischen strukturellen Merkmalen und funktionellen Eigenschaften im Modell *in vivo* gefunden werden. So wurde z.B. die Entwicklung des humanen AK Bapineuzumab trotz hoher Affinität von etwa 2 nM (AA 1-5) und einer einzigartigen $A\beta$ -Bindungsstruktur aufgrund von unzureichender Wirksamkeit in Patienten mit mildem bis moderatem Alzheimer und wegen zusätzlicher Nebenwirkungen, wie amyloid-bezogene abzubildende Abnormalitäten, 2012 eingestellt.

Dennoch werden die Untersuchung der Bindungseigenschaften als auch strukturelle Analysen der zunächst parentalen murinen AK zu einem immer wichtigeren Ausgangsverfahren, bevor ein

AK als therapeutischer AK in Betracht gezogen wird. Das große Ziel ist, anhand einer zukünftigen anti-A β -AK-Strukturbibliothek einen Zusammenhang zwischen Affinität bzw. Spezifität und Struktur zu begreifen und daraus Erkenntnisse für ein anschließendes *protein engineering* zur Generierung von therapeutischen AK zu gewinnen.

Ebenfalls ist die Entstehung von Nebenwirkungen, z.B. intrazerebraler Blutungen nach therapeutischer Behandlung mit einigen AK-Kandidaten, noch weitgehend unverstanden. Es wird bisher angenommen, dass die Ursache in der Lokalisation des *targets* liegt. So wird von DEMATTOS *et al.* diskutiert, dass lösliches A β , welches wie eine Art Wolke um das A β -*plaque* lokalisiert ist, durch die Bindung zum AK in der interstitielle Flüssigkeit weggetragen und an anderen Orten um Gefäße wieder freigegeben wird (DeMattos *et al.* 2012). Dort abgelagert steigert es das Risiko einer zerebralen Amyloidangiopathie (CAA) und fördert somit die Entstehung von intrazerebralen Blutungen. Zudem nimmt man an, dass der F_c-Teil des AK einen entscheidenden Einfluss in der Ausbildung von Nebenwirkungen spielt, sodass man sich mit einem abgewandelten Modell von Bapineuzumab (AAB-003) (Moreth *et al.*, 2013), welche Mutationen in der F_c-Domäne besitzt um Effektorfunktionen zu reduzieren, weniger Nebenwirkungen mit höherer Zugabe an AK erhofft. Desweiteren ist eine physiologische Funktion des nicht-modifizierten A β nicht ausgeschlossen (Plant *et al.*, 2003; Soscia *et al.*, 2010), sodass Immuntherapien gegen diese A β -Variante zu einer Beseitigung eines möglicherweise wichtigen Moleküls der angeborenen Immunantwort und der neuronalen Physiologie mit unbekanntem Folgen führen könnte.

Die Reduktion von intrazerebralen Blutungen könnte zudem durch *targeting* einer A β -Variante ermöglicht werden, welches sich nur im Gehirnparenchym abgelagert. Von DEMATTOS *et al.* wurde angenommen, dass das modifizierte A β -Peptid A β _{pE3} weder im Plasma noch in der Zerebrospinalflüssigkeit (*cerebrospinal fluid*, CSF) vorkommt, da es bislang außerhalb des Zentralen Nervensystems bzw. im CSF von keiner Gruppe detektiert wurde (Bibl *et al.*, 2012; Frost *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2013). Daher wurde vermutet, dass A β _{pE3} nur in *plaques* im Gehirnparenchym lokalisiert ist und somit ein ideales *target* für eine Immuntherapie wäre.

Der bisher einzige in therapeutischen Studien verwendete A β _{pE3}-spezifische AK mE8, welcher in seiner humanisierten Form mit dem Namen LY3002813 momentan von *Eli Lilly and Company* in Phase 1 getestet wird (<http://www.alzforum.org/therapeutics/ly3002813>), zeigte zum Beispiel das Entfernen von *plaques* ohne die Entstehung von intrazerebralen Blutungen in PDAPP-transgenen Mäusen (DeMattos *et al.* 2012). Dieser AK könnte daher ein Vorreiter in der Entwicklung von therapeutischen A β _{pE3}-spezifischen AK sein. Da jedoch keine strukturellen Daten veröffentlicht sind, ist eine vergleichende strukturelle Analyse zu den in dieser Arbeit gezeigten A β _{pE3}-spezifischen AK nicht möglich.

Eine andere Vorgehensweise für die Selektion eines therapeutischen AK (Reverse Translationale Medizin) beschreibt die Entwicklung des therapeutischen AK Aducanumab (Bussiere *et al.*, 2014; Sevigny *et al.*, 2016). Dieser AK ist ein monoklonaler rekombinanter vollständig humaner anti-A β AK. Er wurde ursprünglich abgeleitet von einem gealterten kognitiv gesunden Menschen, welcher durch sein Immunsystem resistent gegen die Alzheimer Erkrankung ist. Die Autoren beschreiben diesen AK aufgrund seines humanen Ursprungs als weniger immunogen. Aducanumab ist gegen ein konformationelles Epitop gerichtet, welches die Aminosäuren 3-6 des nicht-modifizierten A β -Peptids umfasst und nur auf aggregiertem A β exponiert wird (Strobel, 2015). Aufgrund dieser Spezifität gegenüber A β -Aggregate (Oligomere, Fibrillen und *plaques*) wird angenommen, dass Aducanumab vor allem in dieser Form vorliegendes A β im Gehirnparenchym bindet und das monomere vaskuläre A β nicht erkennt. Strukturelle Daten wurden bisher nur in eingeschränkter Form veröffentlicht, sodass eine genaue Analyse der strukturellen Bindungsparameter nicht möglich ist. Im Patent von Aducanumab wird allerdings mitgeteilt, dass das gebundene A β_{1-11} -Peptid eine lineare Ausdehnung auf der Oberfläche der AK-Bindetasche einnimmt (Abb. 4.6). Er unterscheidet sich von den bisher veröffentlichten Bindungsmodi und stellt somit einen neuen Typ der Bindung (A β -Bindungsmodus 3, siehe Tab. 1.3) dar. In der strukturellen Darstellung (Abb. 4.6) wird allerdings nur die Bindung des AK zum A β -Monomer gezeigt, sodass die Bindung zu A β -Aggregaten, wie Oligomeren, noch unverstanden bleibt. Mit diesem Antikörper wurden jedoch zum ersten Mal Behandlungserfolge in Patienten mit MCI und milder AD nachgewiesen (Sevigny *et al.*, 2016).

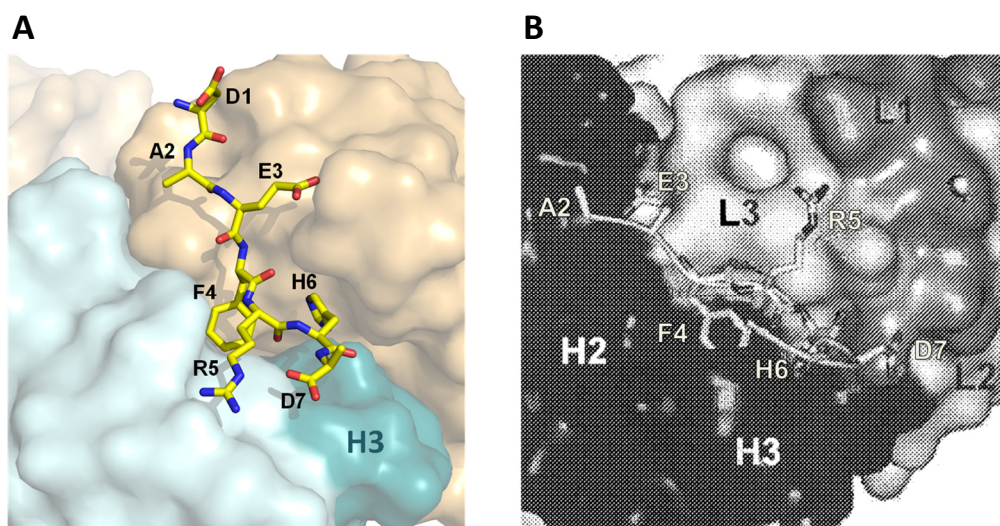


Abb. 4.6: Vergleichende Darstellung der N-terminalen A β -Bindung des A β -Bindungsmodus 1 und 4

A) Darstellung des Bindungsmodus 1 der Bindetasche des AK12A11 (PDB:3IFL; (Basi *et al.*, 2010). Der CDR3-loop der schweren Kette (H3) ist dunkelcyan eingefärbt. B) Darstellung des BM4 des AK Aducanumab, entnommen aus dem Patent WO/2014/089500 (Bussiere *et al.*, 2014).

4.12 Ausblick

Anhand der in den klinischen Studien getesteten therapeutischen A β -AK konnte bisher kein Zusammenhang zwischen AK-Struktur und therapeutischer Wirksamkeit im Organismus ermittelt werden, sodass es weiterhin eine große Herausforderung bleibt, die wichtigen strukturellen A β -Bindungsdeterminaten zu bestimmen (<http://www.alzforum.org/news/research-news/shape-hug-how-embrace-therapeutic-av-antibody-really-matters>). Grund dafür ist, dass man die Komplexität der Alzheimer Erkrankung noch nicht vollständig verstanden hat. Wie bereits ausführlich beschrieben, stellt das modifizierte A β_{pE3} -Peptid eine A β -Variante dar, welche toxischere Eigenschaften im Vergleich zu N-terminal nicht-modifizierten A β -Peptiden besitzt. Zudem konnte es bisher nur in parenchymalem Hirngewebe detektiert werden, welches eine Immuntherapie mit weniger Nebenwirkungen begünstigt.

Die in dieser Arbeit charakterisierten murinen A β_{pE3} -spezifischen AK c#6, c#24 und c#17 stellen daher einen vielversprechenden Ausgangspunkt für die Entwicklung von therapeutischen AK dar. Anhand der strukturellen Charakterisierung konnte gezeigt werden, dass AK c#6 und c#24 einen V-förmigen Bindungsmechanismus haben, welcher die erhöhte Spezifität gegenüber dem A β_{pE3} -Peptid begünstigt. Zudem konnte demonstriert werden, dass diese AK eine hohe Affinität mit einem K_D -Wert von etwa 2 - 6 nM besitzen. Persönliche Mitteilungen von Dr. Martin Kleinschmidt belegen ebenfalls, dass die Affinität gesteigert wird, wenn A β_{pE3} -Oligomere oder A β_{pE3} -Fibrillen als *target* angeboten werden. So könnte zukünftig die Wirksamkeit dieser AK in einer ausgeprägten *in-vivo*-Studie untersucht werden. Die von FROST *et al.* demonstrierten Daten aus einer Pilotstudie belegen bereits, dass der AK c#6 in der Lage ist, sowohl den A β_{pE3} - als auch den generellen A β -Gehalt und die fibrillären amyloiden Ablagerungen im Cortex, Hippocampus und Cerebellum in transgenen AD-Mäusen zu reduzieren und die Wahrnehmung zu verbessern (Frost *et al.*, 2012, Frost *et al.*, 2015). Zudem ist eine vergleichende Wirksamkeitsanalyse aller drei A β_{pE3} -spezifischen AK (c#6, c#24 und c#17) in einem Modell *in vivo* von großem zukünftigem Interesse.

Trotz der bisher noch in der Literatur unzureichenden Struktur-Funktions-Beziehung der A β -spezifischen AK eignen sich die strukturellen Daten ebenfalls für die Generierung von humanisierten therapeutischen AK. So können im Vorfeld die Seitenketten des AK ermittelt werden, die direkt an der A β -Bindung beteiligt sind. Mit der Übernahme dieser Aminosäurereste in ein humanes AK-Gerüst könnte in einem zukünftigen Projekt ein erfolgreicher therapeutischer AK entwickelt werden.

5 Literaturverzeichnis

- Achari, A., Hale, S. P., Howard, A. J., Clore, G. M., Gronenborn, A. M., Hardman, K. D., & Whitlow, M. (1992). 1.67-Å X-ray structure of the B2 immunoglobulin-binding domain of streptococcal protein G and comparison to the NMR structure of the B1 domain. *Biochemistry*, *31*(43), 10449–10457.
- Adamczyk, M., Gebler, J. C., & Wu, J. (2000). Papain digestion of different mouse IgG subclasses as studied by electrospray mass spectrometry. *Journal of Immunological Methods*, *237*(1-2), 95–104.
- Adams, P.D., Afonine, P. V., Bunkóczi, G., Chen, V. B., Echols, N., Headd, J. J., Hung L.W., Jain S., Kapral G.J., Grosse Kunstleve R.W., McCoy A.J., Moriarty N.W., Oeffner R.D., Read R.J., Richardson D.C., Richardson J.S., Terwilliger T.C., Zwart, P. H. (2011). The Phenix software for automated determination of macromolecular structures. *Methods (San Diego, Calif.)*, *55*(1), 94–106.
- Adams, P. D., Grosse-Kunstleve, R. W., Hung, L. W., Loerger, T. R., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Read, R. J., Sacchettini, J. C., Sauter, N. K. & Terwilliger, T. C. (2002). PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, *58*(Pt 11), 1948–1954.
- Aizenstein, H. J., Nebes, R. D., Saxton, J. A., Price, J. C., Mathis, C. A., Tsopelas, N. D., Ziolkowski S.K., James J.A., Snitz B.E., Houck P.R., Bi W., Cohen A.D., Lopresti B.J., DeKosky S.T., Halligan E.M., Klunk, W. E. (2008). Frequent amyloid deposition without significant cognitive impairment among the elderly. *Archives of Neurology*, *65*(11), 1509–1517.
- Albert, M. S., DeKosky, S. T., Dickson, D., Dubois, B., Feldman, H. H., Fox, N. C., Gamst A., Holtzman D.M., Jagust W.J., Petersen R.C., Snyder P.J., Carrillo M.C., Thies B., Phelps, C. H. (2011). The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, *7*(3), 270–279.
- Antonyuk, S. V., Rustage, N., Petersen, C. A., Arnst, J. L., Heyes, D. J., Sharma, R., Berry N.G., Scrutton N.S., Eady R.R., Andrew C.R., Hasnain, S. S. (2011). Carbon monoxide poisoning is prevented by the energy costs of conformational changes in gas-binding haemproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(38), 15780–15785.
- Arevalo, J. H., Stura, E. A., Taussig, M. J., & Wilson, I. A. (1993). Three-dimensional structure of an anti-steroid Fab' and progesterone-Fab' complex. *Journal of Molecular Biology*, *231*(1), 103–118.
- Alzheimer's Association (2014). Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, *10* (2) 47-92
- Baconguis, I., Bohlen, C. J., Goehring, A., Julius, D., & Gouaux, E. (2014). X-ray structure of acid-sensing ion channel 1-snake toxin complex reveals open state of a Na(+)-selective channel. *Cell*, *156*(4), 717–729.
- Bao, F., Wicklund, L., Lacor, P. N., Klein, W. L., Nordberg, A., & Marutle, A. (2012). Different β -amyloid oligomer assemblies in Alzheimer brains correlate with age of disease onset and impaired cholinergic activity. *Neurobiology of Aging*, *33*(4), 825–837.
- Bard, F., Barbour, R., Cannon, C., Carretto, R., Fox, M., Games, D., Guido T., Hoenow K., Hu K., Johnson-Wood K., Khan K., Kholodenko D., Lee C., Lee M., Motter R., Nguyen M., Reed A., Schenk D., Tang P., Vasquez N., Seubert P., Yednock, T. (2003). Epitope and isotype specificities of antibodies to beta -amyloid peptide for protection against Alzheimer's disease-like neuropathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(4), 2023–2028.
- Bard, F., Cannon, C., Barbour, R., Burke, R. L., Games, D., Grajeda, H., Guido T., Hu K., Huang J., Johnson-Wood K., Khan K., Kholodenko D., Lee M., Lieberburg I., Motter R., Nguyen M., Soriano F., Vasquez N., Weiss K., Welch B., Seubert P., Schenk D., Yednock, T. (2000). Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nature Medicine*, *6*(8), 916–99.
- Basi, G. S., Feinberg, H., Oshidari, F., Anderson, J., Barbour, R., Baker, J., Comery T.A., Diep L., Gill D., Johnson-Wood K., Goel A., Grantcharova K., Lee M., Li J., Partridge A., Griswold-Prenner I., Piot N., Walker D., Widom A., Pangalos M.N., Seubert P., Jacobsen J.S., Schenk D., Weis, W. I. (2010). Structural correlates of antibodies associated with acute reversal of amyloid beta-related behavioral deficits in a mouse model of Alzheimer disease. *The Journal of Biological Chemistry*, *285*(5), 3417–3427.

- Bath, T. N. (1990). Small rearrangements in structures of Fv and Fab fragments of antibody D1.3 on antigen binding. *Nature*, *347*, 483–485.
- Benilova, I., Karran, E., & De Strooper, B. (2012). The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nature Neuroscience*, *15*(3), 349–357.
- Bennett, M. J., Karki, S., Moore, G. L., Leung, I. W. L., Chen, H., Pong, E., Nguyen D.H., Jacinto J., Zalevsky J., Muchhal U.S., Desjarlais J.R., Lazar, G. a. (2010). Engineering fully human monoclonal antibodies from murine variable regions. *Journal of Molecular Biology*, *396*(5), 1474–1490.
- Biancalana, M., & Koide, S. (2010). Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1804*(7), 1405–1412.
- Bibl, M., Gallus, M., Welge, V., Esselmann, H., Wolf, S., R  ther, E., & Wiltfang, J. (2012). Cerebrospinal fluid amyloid- β 2-42 is decreased in Alzheimer's, but not in frontotemporal dementia. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria : 1996)*, *119*(7), 805–813.
- Bibl, M., Gallus, M., Welge, V., Lehmann, S., Sparbier, K., Esselmann, H., & Wiltfang, J. (2012). Characterization of cerebrospinal fluid aminoterminally truncated and oxidized amyloid- β peptides. *Proteomics - Clinical Applications*, *6*, 163–169.
- Bien, J., Jefferson, T., Causevi  , M., Jumpertz, T., Munter, L., Multhaup, G., Weggen S., Becker-Pauly C., Pietrzik, C. U. (2012). The metalloprotease meprin β generates amino terminal-truncated amyloid β peptide species. *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(40), 33304–33313.
- Biswas, T., & Tsodikov, O. V. (2010). An easy-to-use tool for planning and modeling a calorimetric titration. *Analytical Biochemistry*, *406*(1), 91–93.
- Bjorck, L., & Kronvall, G. (1984). Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding Reagent. *The Journal of Immunology*, *133* (2), 969-974
- Bohrmann, B., Baumann, K., Benz, J., Gerber, F., Huber, W., Knoflach, F., Messer J., Oroszlan K., Rauchenberger R., Richter W.F., Rothe C., Urban M., Bardroff M., Winter M., Nordstedt C., Loetscher, H. (2012). Gantenerumab: a novel human anti-A β antibody demonstrates sustained cerebral amyloid- β binding and elicits cell-mediated removal of human amyloid- β . *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, *28*(1), 49–69.
- Braak, H., & Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica*, *82*(4), 239–259.
- Broecker, J., Vargas, C., & Keller, S. (2011). Revisiting the optimal c value for isothermal titration calorimetry. *Analytical Biochemistry*, *418*(2), 307–309.
- Brown, B. A., Comeau, R. D., Jones, P. L., Liberatore, F. A., Neacy, W. P., Sands, H., & Gallagher, B. M. (1987). Pharmacokinetics of the monoclonal antibody B72.3 and its fragments labeled with either 125I or 111In. *Cancer Research*, *47*(4), 1149–1154.
- Bussiere T., Weinreb P.H., Engber, T., Rhodes, K., Arndt, J. , Qian, F., Dunstan, R.W., Patel S. (2014) (Biogen International Neuroscience) A method of reducing brain amyloid plaques using anti-A β antibodies. WO 2014089500.
- Chan, W., & White, P. (2000). Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach. *Oxford University Press Inc., New York*
- Chen, J., Sawyer, N., & Regan, L. (2013). Protein-protein interactions: general trends in the relationship between binding affinity and interfacial buried surface area. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, *22*(4), 510–515.
- Chen, L., Lin, Y.-L., Peng, G., & Li, F. (2012). Structural basis for multifunctional roles of mammalian aminopeptidase N. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(44), 17966–17971.
- Clippingdale, A. B., Wade, J. D., & Barrow, C. J. (2001). The amyloid-beta peptide and its role in Alzheimer's disease. *Journal of Peptide Science : An Official Publication of the European Peptide Society*, *7*(5), 227–249.
- Coles, M., Bicknell, W., Watson, A. A., Fairlie, D. P., & Craik, D. J. (1998). Solution Structure of Amyloid -Peptide (1 - 40) in a Water - Micelle Environment . Is the Membrane-Spanning Domain Where We Think It Is ? †,‡, *2960*(97), 11064–11077.

- Crescenzi, O., Tomaselli, S., Guerrini, R., Salvadori, S., D'Ursi, A. M., Temussi, P. A., & Picone, D. (2002). Solution structure of the Alzheimer amyloid β -peptide (1-42) in an apolar microenvironment. *European Journal of Biochemistry*, 269(22), 5642–5648.
- Crespi, G. a N., Hermans, S. J., Parker, M. W., & Miles, L. a. (2015). Molecular basis for mid-region amyloid- β capture by leading Alzheimer's disease immunotherapies. *Scientific Reports*, 5, 9649.
- Crowther, R. a., & Blow, D. M. (1967). A method of positioning a known molecule in an unknown crystal structure. *Acta Crystallographica*, 23(4), 544–548.
- Cummings, J. L. (2004). Alzheimer's Disease. *The New England Journal of Medicine*, 351, 56–67.
- Cummins, P. M., & O'Connor, B. (1996). Bovine brain pyroglutamyl aminopeptidase (type-1): purification and characterisation of a neuropeptide-inactivating peptidase. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 28(8), 883–893.
- Cummins, P. M., & O'Connor, B. (1998). Pyroglutamyl peptidase: an overview of the three known enzymatic forms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1429(1), 1–17.
- Cynis, H., Schilling, S., Bodnár, M., Hoffmann, T., Heiser, U., Saido, T. C., & Demuth, H.-U. (2006). Inhibition of glutaminy cyclase alters pyroglutamate formation in mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1764(10), 1618–1625.
- Cynis, H., Frost, J. L., Crehan, H., & Lemere, C. A. (2016). Immunotherapy targeting pyroglutamate-3 A β : prospects and challenges. *Molecular Neurodegeneration*, 11(1), 48.
- Dammers, C., Gremer, L., Neudecker, P., Demuth, H.-U., Schwarten, M., & Willbold, D. (2015). Purification and Characterization of Recombinant N-Terminally Pyroglutamate-Modified Amyloid- β Variants and Structural Analysis by Solution NMR Spectroscopy. *Plos One*, 10(10), e0139710.
- Davies, D. R., Padlan, E. A., & Segal, D. M. (1975). Three-dimensional structure of immunoglobulins. *Annual Review of Biochemistry*, 44, 639–667.
- De Felice, F. G., Velasco, P. T., Lambert, M. P., Viola, K., Fernandez, S. J., Ferreira, S. T., & Klein, W. L. (2007). Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(15), 11590–11601.
- De Felice, F. G., Wu, D., Lambert, M. P., Fernandez, S. J., Velasco, P. T., Lacor, P. N., Bigio E.H., Jerecic J., Acton P.J., Shughrue P.J., Chen-Dodson E., Kinney G.G., Klein, W. L. (2008). Alzheimer's disease-type neuronal tau hyperphosphorylation induced by A beta oligomers. *Neurobiology of Aging*, 29(9), 1334–1347.
- De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J. S., Schroeter E.H., Schrijvers V., Wolfe M.S., Ray W.J., Goate A., Kopan, R. (1999). A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature*, 398(6727), 518–522.
- DeLucas, L. J., Bray, T. L., Nagy, L., McCombs, D., Chernov, N., Hamrick, D., Cosenza L., Belgovskiy A., Stoops B., Chait, A. (2003). Efficient protein crystallization. *Journal of Structural Biology*, 142(1), 188–206.
- DeMattos, R. B., Bales, K. R., Cummins, D. J., Dodart, J. C., Paul, S. M., & Holtzman, D. M. (2001). Peripheral anti-A beta antibody alters CNS and plasma A beta clearance and decreases brain A beta burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(15), 8850–8855.
- DeMattos, R. B., Bales, K. R., Cummins, D. J., Paul, S. M., & Holtzman, D. M. (2002). Brain to plasma amyloid-beta efflux: a measure of brain amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5563), 2264–2267.
- Demattos, R. B., Lu, J., Tang, Y., Racke, M. M., Delong, C. A, Tzaferis, J. A, Hole J.T., Forster B.M., McDonnell P.C., Liu F., Kinley R.D., Jordan W.H., Hutton, M. L. (2012). A plaque-specific antibody clears existing β -amyloid plaques in Alzheimer's disease mice. *Neuron*, 76(5), 908–920.
- Demignot, S., Garnett, M. C., & Baldwin, R. W. (1989). Mouse IgG2b monoclonal antibody fragmentation Preparation and purification of Fab , Fc and Fab / c fragments, 121, 209–217.
- Derrick, J. P., & Wigley, D. B. (1992). Crystal structure of a streptococcal protein G domain bound to an Fab fragment. *Nature*, 359(6397), 752–754.

- Derrick, J. P.; Wigley, D. B. (1994): The third IgG-binding domain from streptococcal protein G. An analysis by X-ray crystallography of the structure alone and in a complex with Fab. In: *Journal of molecular biology* 243 (5), 906–918.
- Deshpande, A., Mina, E., Glabe, C., & Busciglio, J. (2006). Different conformations of amyloid beta induce neurotoxicity by distinct mechanisms in human cortical neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(22), 6011–6018.
- Duff, K., Eckman, C., Zehr, C., Yu, X., Prada, C. M., Perez-tur, J., Hutton M., Buee L., Harigaya Y., Yager D., Morgan D., Gordon M.N., Holcomb L., Refolo L., Zenk B., Hardy J., Younkin, S. (1996). Increased amyloid-beta42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature*, 383(6602), 710–713.
- Edelman, G. M., Cunningham, B. A., Gall, W. E., Gottlieb, P. D., Rutishauser, U., & Waxdal, M. J. (1969). The covalent structure of an entire gammaG immunoglobulin molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 63(1), 78–85.
- Edman, P., & Begg, G. (1967). A protein sequenator. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 1(1), 80–91.
- Elmore, M. A., Griffiths, E. C., O'Connor, B., & O'Cuinn, G. (1990). Further characterization of the substrate specificity of a TRH hydrolysing pyroglutamate aminopeptidase from guinea-pig brain. *Neuropeptides*, 15(1), 31–36.
- Emsley, P., & Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 60(Pt 12 Pt 1), 2126–2132.
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., & Cowtan, K. (2010). Features and development of Coot. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 66(Pt 4), 486–501.
- Erntell, M., Myhre, E. B., Sjöbring, U., & Björck, L. (1988). Streptococcal protein G has affinity for both Fab- and Fc-fragments of human IgG. *Molecular Immunology*, 25(2), 121–126.
- Esch, F. S., Keim, P. S., Beattie, E. C., Blacher, R. W., Culwell, A. R., Oltersdorf, T., McClure, D., Ward, P. J. (1990). Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science (New York, N.Y.)*, 248(4959), 1122–1124.
- Ewert, S., Honegger, A., & Plückthun, A. (2004). Stability improvement of antibodies for extracellular and intracellular applications: CDR grafting to stable frameworks and structure-based framework engineering. *Methods (San Diego, Calif.)*, 34(2), 184–199.
- Feinberg, H., Saldanha, J. W., Diep, L., Goel, A., Widom, A., Veldman, G. M., Weis W.I., Schenk D., Basi, G. S. (2014). Crystal structure reveals conservation of Abeta conformation recognized by 3D6 following humanization to bapineuzumab. *Alzheimer's Research & Therapy*, 6(3), 31.
- Findeis, M. a. (2007). The role of amyloid beta peptide 42 in Alzheimer's disease. *Pharmacology & Therapeutics*, 116(2), 266–286.
- Frost, J. L., Liu, B., Kleinschmidt, M., Schilling, S., Demuth, H.-U., & Lemere, C. a. (2012). Passive immunization against pyroglutamate-3 amyloid-β reduces plaque burden in Alzheimer-like transgenic mice: a pilot study. *Neuro-Degenerative Diseases*, 10(1-4), 265–270.
- Frost, J. L., Liu, B., Rahfeld, J.-U., Kleinschmidt, M., O'Nuallain, B., Le, K. X., Lues I., Caldarone B.J., Schilling S., Demuth H.-U., Lemere, C. A. (2015). An anti-pyroglutamate-3 Aβ vaccine reduces plaques and improves cognition in APPswe/PS1ΔE9 mice. *Neurobiology of Aging*, 36(12), 3187–3199.
- Funato, H., Yoshimura, M., Yamazaki, T., Saido, T. C., Ito, Y., Yokofujita, J., Okeda, R., Ihara, Y. (1998). Astrocytes containing amyloid beta-protein (Abeta)-positive granules are associated with Abeta40-positive diffuse plaques in the aged human brain. *The American Journal of Pathology*, 152(4), 983–992.
- Gandy, S., Ph, D., Simon, A. J., Steele, J. W., Alex, L., Lah, J. J., Walker L.C., Levey A.I., Krafft G.A., Levy E., Checler F., Glabe C., Bilker W.B., Abel T., Schmeidler J., Ehrlich M.E. (2011). Days-to-criterion as an indicator of toxicity associated with human Alzheimer amyloid-β oligomers. *Annals of Neurology*, 68(2), 220–230.
- Gao, C. M., Yam, A. Y., Wang, X., Magdangal, E., Salisbury, C., Peretz, D., Zuckermann R.N., Connolly M.D., Hansson O., Minthon L., Zetterberg H., Blennow K., Fedynshyn J.P., Allauzen, S. (2010). Aβ40 oligomers identified as a potential biomarker for the diagnosis of Alzheimer's disease. *PLoS One*, 5(12), 15725.
- Gardberg, A., Dice, L., Pridgen, K., Ko, J., Patterson, P., Ou, S. Wetzels, R., Dealwis, C. (2009): Structures of Abeta-related peptide--monoclonal antibody complexes. In: *Biochemistry* 48 (23), S. 5210–5217

- Gardberg, A. S., Dice, L. T., Ou, S., Rich, R. L., Helmbrecht, E., Ko, J., Wetzel R., Myszka D.G., Patterson P.H., Dealwis, C. (2007). Molecular basis for passive immunotherapy of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(40), 15659–15664.
- Garman, E. (1999). Cool data: quantity AND quality. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 55(Pt 10), 1641–1653.
- Garman, E. F., & Schneider, T. R. (1997). Macromolecular Cryocrystallography. *Journal of Applied Crystallography*, 30(3), 211–237.
- Geddes, J. W., Tekirian, T. L., & Mattson, M. P. (1999). N-terminus truncated beta-amyloid peptides and C-terminus truncated secreted forms of amyloid precursor protein: distinct roles in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 20(1), 75–79;
- Gigant, B. (1997). X-ray structures of a hydrolytic antibody and of complexes elucidate catalytic pathway from substrate binding and transition state stabilization through water attack and product release, 94, 7857–7861.
- Glennner, G. G., & Wong, C. W. (1984). Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 122(3), 1131–1135.
- Goedert, M., Wischik, C. M., Crowther, R. A., Walker, J. E., & Klug, A. (1988). Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(11), 4051–4055.
- Golde, T. E., Estus, S., Younkin, L. H., Selkoe, D. J., & Younkin, S. G. (1992). Processing of the amyloid protein precursor to potentially amyloidogenic derivatives. *Science (New York, N.Y.)*, 255(5045), 728–730.
- Gorevic, P. D., Goñi, F., Pons-Estel, B., Alvarez, F., Peress, N. S., & Frangione, B. (1986). Isolation and partial characterization of neurofibrillary tangles and amyloid plaque core in Alzheimer's disease: immunohistological studies. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 45(6), 647–664.
- Green, L. L., Hardy, M. C., Maynard-Currie, C. E., Tsuda, H., Louie, D. M., Mendez, M. J., Abderrahim H., Noguchi M., Smith D.H., Zeng Y., David N.E., Sasai H., Garza D., Brenner D.G., Hales J.F., McGuinness R.P., Capon D.J., Klapholz S., Jakobovits, A. (1994). Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs. *Nature Genetics*, 7(1), 13–21.
- Griffiths, A. D., Williams, S. C., Hartley, O., Tomlinson, I. M., Waterhouse, P., Crosby, W. L., Kontermann R.E., Jones P.T., Low N.M., Allison, T. J. (1994). Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *The EMBO Journal*, 13(14), 3245–3260.
- Gronenborn, A. M., Filpula, D. R., Essig, N. Z., Achari, A., Whitlow, M., Wingfield, P. T., & Clore, G. M. (1991). A novel, highly stable fold of the immunoglobulin binding domain of streptococcal protein G. *Science (New York, N.Y.)*, 253(5020), 657–661.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y. C., Quinlan, M., Wisniewski, H. M., & Binder, L. I. (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(13), 4913–4917.
- Güntert, a, Döbeli, H., & Bohrmann, B. (2006). High sensitivity analysis of amyloid-beta peptide composition in amyloid deposits from human and PS2APP mouse brain. *Neuroscience*, 143(2), 461–475.
- Haass, C., Lemere, C. A., Capell, A., Citron, M., Seubert, P., Schenk, D., Lannfelt, L., Selkoe, D. J. (1995). The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway. *Nature Medicine*, 1(12), 1291–1296.
- Haass, C., Schlossmacher, M. G., Hung, A. Y., Vigo-Pelfrey, C., Mellon, A., Ostaszewski, B. L., Lieberburg, I., Koo, E.H., Schenk, D., Teplow, D. B. (1992). Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature*, 359(6393), 322–325.
- Haass, C., & Selkoe, D. J. (1993). Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide. *Cell*, 75(6), 1039–1042.
- Hardy, J., & Higgins, G. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, 256(5054), 184–185.
- Harigaya, Y., Saido, T. C., Eckman, C. B., Prada, C. M., Shoji, M., & Younkin, S. G. (2000). Amyloid beta protein starting pyroglutamate at position 3 is a major component of the amyloid deposits in the Alzheimer's disease brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 276(2), 422–427.

- Harper, J. D., Wong, S. S., Lieber, C. M., & Lansbury, P. T. (1997). Observation of metastable Aβ amyloid protofibrils by atomic force microscopy. *Chemistry & Biology*, 4(2), 119–125.
- Haugaard-Jönsson, L. M., Hossain, M. A., Daly, N. L., Craik, D. J., Wade, J. D., & Rosengren, K. J. (2009). Structure of human insulin-like peptide 5 and characterization of conserved hydrogen bonds and electrostatic interactions within the relaxin framework. *The Biochemical Journal*, 419(3), 619–627.
- Haugaard-Kedström, L. M., Hossain, M. A., Daly, N. L., Bathgate, R. A. D., Rinderknecht, E., Wade, J. D., Craik, D. J., Rosengren, K. J. (2015). Solution Structure, Aggregation Behavior, and Flexibility of Human Relaxin-2. *ACS Chemical Biology*, 10(3), 891–900
- He, W., & Barrow, C. J. (1999). The Aβ 3-pyroglutamyl and 11-pyroglutamyl peptides found in senile plaque have greater beta-sheet forming and aggregation propensities in vitro than full-length Aβ. *Biochemistry*, 38(33), 10871–10877.
- Hebert, L. E., Weuve, J., & Evans, D. A. (2013). Alzheimer disease in the United States (2010 – 2050) estimated using the 2010 census. *American Academy of Neurology*, 158.
- Herron, J. N. (1991). An Autoantibody to Single-Stranded DNA: Comparison of the Three-Dimensional Structures of the Unliganded Fab and a Deoxynucleotide-Fab Complex Determination of Nucleic Acid Sequences, 175, 159–175.
- Honegger, a., & Plückthun, a. (2001). Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool. *Journal of Molecular Biology*, 309(3), 657–670.
- Hook, G., Yu, J., Toneff, T., Kindy, M., & Hook, V. (2014). Brain pyroglutamate amyloid-β is produced by cathepsin B and is reduced by the cysteine protease inhibitor E64d, representing a potential Alzheimer's disease therapeutic. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 41(1), 129–149.
- Howell, P. L., Pangborn, W. a., Marshall, G. R., Zabrocki, J., & Smith, G. D. (1995). A Thyrotropin-Releasing Hormone Analogue: pGlu-Phe-D-Pro-Ψ[CN4]-NMe at 293 and 107K. *Acta Crystallographica Section C Crystal Structure Communications*, 51(12), 2575–2579.
- Huet, J., Teinkela Mbosso, E. J., Soror, S., Meyer, F., Looze, Y., Wintjens, R., & Wohlkönig, A. (2013). High-resolution structure of a papaya plant-defense barwin-like protein solved by in-house sulfur-SAD phasing. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 69(Pt 10), 2017–2026.
- Hutton, M., Lendon, C. L., Rizzu, P., Baker, M., Froelich, S., Houlden, H., Pickering-Brown S., Chakraverty S., Isaacs A., Grover A., Hackett J., Adamson J., Lincoln S., Dickson D., Davies P., Petersen R.C., Stevens M., de Graaff E., Wauters E., van Baren J., Hillebrand M., Joosse M., Kwon J.M., Nowotny P., Che L.K., Norton J., Morris J.C., Reed L.A., Trojanowski J., Basun H., Lannfelt L., Neystat M., Fahn S., Dark F., Tannenberg T., Dodd P.R., Hayward N., Kwok J.B., Schofield P.R., Andreadis A., Snowden J., Craufurd D., Neary D., Owen F., Oostra B.A., Hardy J., Goate A., van Swieten J., Mann D., Lynch T., Heutink, P. (1998). Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature*, 393(6686), 702–705.
- Ida, N., Hartmann, T., Pantel, J., Schröder, J., Zerfass, R., Förstl, H., Sandbrink, R., Masters, C.L., Beyreuther, K. (1996). Analysis of heterogeneous A4 peptides in human cerebrospinal fluid and blood by a newly developed sensitive Western blot assay. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(37), 22908–14.
- Indyk, L., & Fisher, H. F. (1998). Theoretical aspects of isothermal titration calorimetry. *Methods in Enzymology*, 295, 350–364.
- Itagaki, S., McGeer, P. L., Akiyama, H., Zhu, S., & Selkoe, D. (1989). Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer disease. *Journal of Neuroimmunology*, 24(3), 173–182.
- Ittner, L. M., & Götz, J. (2011). Amyloid-β and tau—a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nature Reviews. Neuroscience*, 12(2), 65–72.
- Ittner, L. M., Ke, Y. D., Delerue, F., Bi, M., Gladbach, A., van Eersel, J., Wölfing H., Chieng B.C., Christie M.J., Napier I.A., Eckert A., Staufenbiel M., Hardeman E., Götz, J. (2010). Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell*, 142(3), 387–397.
- Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, H., Nukina, N., & Ihara, Y. (1994). Visualization of Aβ 42(43) and Aβ 40 in senile plaques with end-specific Aβ monoclonals: evidence that an initially deposited species is Aβ 42(43). *Neuron*, 13(1), 45–53.
- Jack, C. R., Albert, M. S., Knopman, D. S., McKhann, G. M., Sperling, R. A., Carrillo, M. C., Thies, B., Phelps, C. H. (2011). Introduction to the recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 7(3), 257–262.

- Jacobson, F., Karkehabadi, S., Hansson, H., Goedegebuur, F., Wallace, L., Mitchinson, C., Piens, K., Stals, I., Sandgren, M. (2013). The crystal structure of the core domain of a cellulose induced protein (Cip1) from *Hypocrea jecorina*, at 1.5 Å resolution. *PLoS One*, 8(9), 70562.
- Jarrett, J. T., Berger, E. P., & Lansbury, P. T. (1993). The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry*, 32(18), 4693–4697.
- Jawhar, S., Trawicka, A., Jenneckens, C., Bayer, T. A., & Wirths, O. (2012). Motor deficits, neuron loss, and reduced anxiety coinciding with axonal degeneration and intraneuronal A β aggregation in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 33(1), 196.29–40.
- Jawhar, S., Wirths, O., & Bayer, T. a. (2011). Pyroglutamate amyloid- β (A β): a hatchet man in Alzheimer disease. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(45), 38825–38832.
- Jawhar, S., Wirths, O., Schilling, S., Graubner, S., Demuth, H.-U., & Bayer, T. a. (2011). Overexpression of glutaminyl cyclase, the enzyme responsible for pyroglutamate A β formation, induces behavioral deficits, and glutaminyl cyclase knock-out rescues the behavioral phenotype in 5XFAD mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(6), 4454–4460.
- Jeffrey, G.A., (1997) An Introduction to Hydrogen Bonding (Topics in Physical Chemistry). *Oxford University Press, USA* (March 13, 1997).
- Jefferis, R. (2009): Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics. *Nature reviews. Drug discovery*, 8 (3), 226–234.
- Jung, S., Spinelli, S., Schimmele, B., Honegger, a, Pugliese, L., Cambillau, C., & Plückthun, a. (2001). The importance of framework residues H6, H7 and H10 in antibody heavy chains: experimental evidence for a new structural subclassification of antibody V(H) domains. *Journal of Molecular Biology*, 309(3), 701–716.
- Kabat, E. A., & Wu, T. T. (1971). Attempts to locate complementarity-determining residues in the variable positions of light and heavy chains. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 190, 382–393.
- Kabsch, W. (1993). Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *Journal of Applied Crystallography*, 26(6), 795–800.
- Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., Multhaup, G., Beyreuther, K., Müller-Hill, B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*, 325(6106), 733–736.
- Karran, E., Mercken, M., & De Strooper, B. (2011). The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 10(9), 698–712.
- Kayed, R., Head, E., Thompson, J. L., McIntire, T. M., Milton, S. C., Cotman, C. W., & Glabe, C. G. (2003). Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science (New York, N.Y.)*, 300(5618), 486–489.
- Knappik, A., Ge, L., Honegger, A., Pack, P., Fischer, M., Wellenhofer, G., Hoess, A., Wölle, J., Plückthun, A., Virrekäs, B. (2000). Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *Journal of Molecular Biology*, 296(1), 57–86.
- Knopman, D. S., Parisi, J. E., Salviati, A., Floriach-Robert, M., Boeve, B. F., Ivnik, R. J., Smith, G.E., Dickson, D.W., Johnson, K.A., Petersen, L.E., McDonald, W.C., Braak, H., Petersen, R. C. (2003). Neuropathology of cognitively normal elderly. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 62(11), 1087–1095.
- Knowles, R.B., Wyart, C., Buldyrev, S.V., Cruz, L., Urbanc, B., Hasselmo, M.E., Stanley, H.E., Hyman, B.T. (1999). Plaque-induced neurite abnormalities : Implications for disruption of neural networks in Alzheimer ' s disease, *PNAS* 96 (9), 5274–5279.
- Grebenau R.C., Goldenberg D.M., Chang C.H., Koch G.A., Gold D.V., Kunz A., Hansen H.J.(1992). Microheterogeneity of a purified IgG1 due to asymmetric Fab glycosylation. *Mol Immunol*, 29 (6) 751-8 (Koch 1992)
- Koffie, R. M., Meyer-Luehmann, M., Hashimoto, T., Adams, K. W., Mielke, M. L., Garcia-Alloza, M., Micheva K.D., Smith S.J., Kim M.L., Lee V.M., Hyman B.T., Spires-Jones, T. L. (2009). Oligomeric amyloid beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(10), 4012–4017.

- Kolenko, P., Dohnálek, J., Dusková, J., Skálová, T., Collard, R., & Hasek, J. (2009). New insights into intra- and intermolecular interactions of immunoglobulins: crystal structure of mouse IgG2b-Fc at 2.1-Å resolution. *Immunology*, 126(3), 378–85.
- Koshland, D. E. (1958). Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 44(2), 98–104.
- Kosik, K. S., Orecchio, L. D., Binder, L., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M., & Lee, G. (1988). Epitopes that span the tau molecule are shared with paired helical filaments. *Neuron*, 1(9), 817–825.
- Kosik, K. S., & Shimura, H. (2005). Phosphorylated tau and the neurodegenerative foldopathies. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1739(2-3), 298–310.
- Kunkel, J. P., Jan, D. C. H., Jamieson, J. C., & Butler, M. (1998). Dissolved oxygen concentration in serum-free continuous culture affects N-linked glycosylation of a monoclonal antibody, 62, 55–71.
- Kuo, Y., Emmerling, M. R., Woods, A. S., Cotter, R. J., & Roher, A. E. (1997). Isolation, Chemical Characterization, and Quantitation of Aβ 3-Pyroglutamyl Peptide from Neuritic Plaques and Vascular Amyloid Deposits, 191(237), 188–191.
- Kuo, Y. M., Emmerling, M. R., Vigo-Pelfrey, C., Kasunic, T. C., Kirkpatrick, J. B., Murdoch, G. H., Ball, M. J., Roher, A. E. (1996). Water-soluble Aβ (N-40, N-42) oligomers in normal and Alzheimer disease brains. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(8), 4077–4081.
- Kuo, Y. M., Webster, S., Emmerling, M. R., De Lima N., & Roher, A. E. (1998). Irreversible dimerization/tetramerization and post-translational modifications inhibit proteolytic degradation of Aβ peptides of Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1406(3), 291–298.
- Kuperstein, I., Broersen, K., Benilova, I., Rozenski, J., Jonckheere, W., Debulpaep, M., Vandersteen A., Segers-Nolten I., Van Der Werf K., Subramaniam V., Braeken D., Callewaert G., Bartic C., D'Hooge R., Martins I.C., Rousseau F., Schymkowitz J., De Strooper, B. (2010). Neurotoxicity of Alzheimer's disease Aβ peptides is induced by small changes in the Aβ42 to Aβ40 ratio. *The EMBO Journal*, 29(19), 3408–3420.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Lambert, M. P. (1998). Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Aβ 1 – 42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(May), 6448–6453.
- Lannfelt, L., Möller, C., Basun, H., Osswald, G., Sehlin, D., Satlin, A., Logovinsky, V., Gellerfors, P. (2014). Perspectives on future Alzheimer therapies: amyloid-β protofibrils - a new target for immunotherapy with BAN2401 in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research & Therapy*, 6(2), 16.
- Lannfelt, L., Relkin, N. R., & Siemers, E. R. (2014). Amyloid-β-directed immunotherapy for Alzheimer's disease. *Journal of Internal Medicine*, 275(3), 284–295.
- Lanzara, R., Liebman, M., & Wolk, S. (1989). The Use of Analogues of TRH to Probe the Specificity of Pyroglutamyl Peptidase II. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 553(1 Thyrotropin-R), 559–562.
- Lashuel, H. A., Hartley, D., Petre, B. M., Walz, T., Lansbury, P. T. (2002): Neurodegenerative disease: Amyloid pores from pathogenic mutations. *Nature*, 418 (6895), 291.
- Lau, T.-L., Ambroggio, E. E., Tew, D. J., Cappai, R., Masters, C. L., Fidelio, G. D., Barnham, K.J., Separovic, F. (2006). Amyloid-beta peptide disruption of lipid membranes and the effect of metal ions. *Journal of Molecular Biology*, 356(3), 759–770.
- Lawrence, M. C., & Colman, P. M. (1993). Shape complementarity at protein/protein interfaces. *Journal of Molecular Biology*, 234(4), 946–950.
- Lemere, C. a, & Masliah, E. (2010). Can Alzheimer disease be prevented by amyloid-beta immunotherapy? *Nature Reviews. Neurology*, 6(2), 108–119.
- Leonidas, D. D., Shapiro, R., Allen, S. C., Subbarao, G. V, Veluraja, K., & Acharya, K. R. (1999). Refined crystal structures of native human angiogenin and two active site variants: implications for the unique functional properties of an enzyme involved in neovascularisation during tumour growth. *Journal of Molecular Biology*, 285(3), 1209–1233.

- Lesné, S., Koh, M. T., Kotilinek, L., Kaye, R., Glabe, C. G., Yang, A., Gallagher, M., Ashe, K. H. (2006). A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature*, 440(7082), 352–7.
- Li, L., Wang, J., & Cooper, M. D. (1993). cDNA cloning and expression of human glutamyl aminopeptidase (aminopeptidase A). *Genomics*, 17(3), 657–664.
- Li, L., Wu, Q., Wang, J., Bucy, R. P., & Cooper, M. D. (1993). Widespread tissue distribution of aminopeptidase A, an evolutionarily conserved ectoenzyme recognized by the BP-1 antibody. *Tissue Antigens*, 42(5), 488–96.
- Liddell, J. E. and Cryer, A. (1991). *A Practical Guide to Monoclonal Antibodies*.
- Lim, K. H. (2006). A weakly clustered N terminus inhibits Abeta(1-40) amyloidogenesis. *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology*, 7(11), 1662–1666.
- Lin, S., Lee, A. S., Lin, C., & Lee, C. (2006). Determination of Binding Constant and Stoichiometry for Antibody-Antigen Interaction with Surface Plasmon Resonance, 271–282.
- Liu, H., & May, K. (2012). Structural variations, chemical modifications and possible impacts to stability and biological function Disulfide bond structures of IgG molecules © 2012 Landes Bioscience. Do not distribute. Do not distribute., (February), 17–23.
- Liu, K., Solano, I., Mann, D., Lemere, C., Mercken, M., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M.-Y. (2006). Characterization of Abeta11-40/42 peptide deposition in Alzheimer's disease and young Down's syndrome brains: implication of N-terminally truncated Abeta species in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 112(2), 163–174.
- Lonberg, N. (2005). Human antibodies from transgenic animals. *Nature Biotechnology*, 23(9), 1117–1125.
- Lonberg, N., Taylor, L. D., Harding, F. A., Tronstine, M., Higgins, K. M., Schramm, S. R., Kuo, C.C., Mashayekh, R., Wymore, K., McCabe, J. G. (1994). Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. *Nature*, 368(6474), 856–859.
- Long, F., Vagin, A. a, Young, P., & Murshudov, G. N. (2008). BALBES: a molecular-replacement pipeline. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 64(Pt 1), 125–132.
- Lou, Y.-C., Huang, Y.-C., Pan, Y.-R., Chen, C., & Liao, Y.-D. (2006). Roles of N-terminal pyroglutamate in maintaining structural integrity and pKa values of catalytic histidine residues in bullfrog ribonuclease 3. *Journal of Molecular Biology*, 355(3), 409–421.
- Lue, L. F., Kuo, Y. M., Roher, A. E., Brachova, L., Shen, Y., Sue, L., Beach, T., Kurth, J.H., Rydel, R.E., Rogers, J. (1999). Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *The American Journal of Pathology*, 155(3), 853–862.
- Mackenzie, I. R., McLachlan, R. S., Kubu, C. S., & Miller, L. A. (1996). Prospective neuropsychological assessment of nondemented patients with biopsy proven senile plaques. *Neurology*, 46(2), 425–429.
- Manczak, M., Calkins, M. J., & Reddy, P. H. (2011). Impaired mitochondrial dynamics and abnormal interaction of amyloid beta with mitochondrial protein Drp1 in neurons from patients with Alzheimer's disease: implications for neuronal damage. *Human Molecular Genetics*, 20(13), 2495–2509.
- Mandler, M., Rockenstein, E., Ubhi, K., Hansen, L., Adame, A., Michael, S., Galasko, D., Santic, R., Mattner, F., Masliah, E. (2012). Detection of peri-synaptic amyloid-β pyroglutamate aggregates in early stages of Alzheimer's disease and in AβPP transgenic mice using a novel monoclonal antibody. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 28(4), 783–794.
- Mandler, M., Walker, L., Santic, R., Hanson, P., Upadhaya, A. R., Colloby, S. J., Morris, C.M., Thal, D.R., Thomas, A.J., Schneeberger, A., Attems, J. (2014). Pyroglutamylated amyloid-β is associated with hyperphosphorylated tau and severity of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 128(1), 67–79.
- Mangialasche, F., Solomon, A., Winblad, B., Mecocci, P., & Kivipelto, M. (2010). Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. *Lancet Neurology*, 9(7), 702–716.
- Marler, E., Nelson, C. A., & Tanford, C. (1964). The polypeptide chains of rabbit gamma-globulin and its papain-cleaved fragments. *Biochemistry*, 3, 279–284.
- Martinez, C., & Lefranc, M. P. (1998). The mouse (*Mus musculus*) immunoglobulin kappa variable (IGKV) genes and joining (IGKJ) segments. *Experimental and Clinical Immunogenetics*, 15(3), 184–193.
- Masters, C. L., Simms, G., Weinman, N. A., Multhaup, G., McDonald, B. L., & Beyreuther, K. (1985). Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(12), 4245–4249.

- Matos, J. O., Goldblatt, G., Jeon, J., Chen, B., & Tatulian, S. A. (2014). Pyroglutamylated Amyloid- β Peptide Reverses Cross β -Sheets by a Prion-Like Mechanism. *The Journal of Physical Chemistry. B*, 118(21), 5637–5643.
- McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., & Read, R. J. (2007). Phaser crystallographic software. *Journal of Applied Crystallography*, 40(Pt 4), 658–674.
- McKhann, G. M., Knopman, D. S., Chertkow, H., Hyman, B. T., Jack, C. R., Kawas, C. H., Klunk W.E., Koroshetz W.J., Manly J.J., Mayeux R., Mohs R.C., Morris J.C., Rossor M.N., Scheltens P., Carrillo M.C., Thies B., Weintraub S., Phelps, C. H. (2011). The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia : The Journal of the Alzheimer's Association*, 7(3), 263–269.
- McLean, C. A., Cherny, R. A., Fraser, F. W., Fuller, S. J., Smith, M. J., Beyreuther, K., Bush, A.I., Masters, C. L. (1999). Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, 46(6), 860–866.
- Miles, L. a, Wun, K. S., Crespi, G. a N., Fodero-Tavoletti, M. T., Galatis, D., Bagley, C. J., Beyreuther, K., Masters, C.L., Cappai, R., McKinsty, W.J., Barnham, K.J., Parker, M. W. (2008). Amyloid-beta-anti-amyloid-beta complex structure reveals an extended conformation in the immunodominant B-cell epitope. *Journal of Molecular Biology*, 377(1), 181–192.
- Miles, L. A., Crespi, G. A. N., Doughty, L., & Parker, M. W. (2013). Bapineuzumab captures the N-terminus of the Alzheimer's disease amyloid-beta peptide in a helical conformation. *Scientific Reports*, 3, 1302.
- Miller, D. L., Papayannopoulos, I. A., Styles, J., Bobin, S. A., Lin, Y. Y., Biemann, K., & Iqbal, K. (1993). Peptide compositions of the cerebrovascular and senile plaque core amyloid deposits of Alzheimer's disease. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 301(1), 41–52.
- Miravalle, L., Calero, M., Takao, M., Roher, A. E., Ghetti, B., & Vidal, R. (2005). Amino-terminally truncated Abeta peptide species are the main component of cotton wool plaques. *Biochemistry*, 44(32), 10810–10821.
- Moremen, K. W., Tiemeyer, M., & Nairn, A. V. (2012). Vertebrate protein glycosylation : diversity , synthesis and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(7), 448–462.
- Moreth, J., Mavoungou, C., & Schindowski, K. (2013). Passive anti-amyloid immunotherapy in Alzheimer's disease: What are the most promising targets? *Immunity & Ageing : I & A*, 10(1), 18.
- Mori, H., Takio, K., Ogawara, M., & Selkoe, D. J. (1992). Mass spectrometry of purified amyloid beta protein in Alzheimer's disease. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(24), 17082–17086.
- Murshudov, G. N., Vagin, A. A., & Dodson, E. J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 53(Pt 3), 240–255.
- Nagy, Z., Esiri, M. M., Jobst, K. A., Morris, J. H., King, E. M., McDonald, B., Litchfield, S., Smith, A., Barnetson, L., Smith, A. D. (1995). Relative roles of plaques and tangles in the dementia of Alzheimer's disease: correlations using three sets of neuropathological criteria. *Dementia (Basel, Switzerland)*, 6(1), 21–31.
- Näslund, J., Schierhorn, a, Hellman, U., Lannfelt, L., Roses, a D., Tjernberg, L. O., Silberring, J., Gandy, S.E., Winblad, B., Greengard, P. (1994). Relative abundance of Alzheimer A beta amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(18), 8378–8382.
- Noble, W., Hanger, D. P., Miller, C. C. J., & Lovestone, S. (2013). The importance of tau phosphorylation for neurodegenerative diseases. *Frontiers in Neurology*, 4, 83.
- Nussbaum, J. M., Schilling, S., Cynis, H., Silva, A., Swanson, E., Wangsanut, T., Tayler, K., Wiltgen, B., Hatami, A., Rönicke, R., Reymann, K., Hutter-Paier, B., Alexandru, A., Jagla, W., Graubner, S., Glabe, C.G., Demuth, H.-U., Bloom, G. S. (2012). Prion-like behaviour and tau-dependent cytotoxicity of pyroglutamylated amyloid- β . *Nature*, 485(7400), 651–655.
- Oakley, H., Cole, S. L., Logan, S., Maus, E., Shao, P., Craft, J., Guillozet-Bongaarts, A., Ohno, M., Disterhoft, J., Van Eldik, L., Berry, R., Vassar, R. (2006). Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(40), 10129–10140.
- Oda, M., Ito, N., Tsumuraya, T., Suzuki, K., Sakakura, M., & Fujii, I. (2007). Thermodynamic and structural basis for transition-state stabilization in antibody-catalyzed hydrolysis. *Journal of Molecular Biology*, 369(1), 198–209.

- Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., & Gray, T. (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 4(11), 2411–23.
- Parham, P., Androlewicz, M. J., Brodsky, F. M., Holmes, N. J., & Ways, J. P. (1982). Monoclonal antibodies: purification, fragmentation and application to structural and functional studies of class I MHC antigens. *Journal of Immunological Methods*, 53(2), 133–173.
- Pavšič, M., Gunčar, G., Djinović-Carugo, K., & Lenarčič, B. (2014). Crystal structure and its bearing towards an understanding of key biological functions of EpCAM. *Nature Communications*, 5, 4764.
- Petkova, A. T., Ishii, Y., Balbach, J. J., Antzutkin, O. N., Leapman, R. D., Delaglio, F., & Tycko, R. (2002). A structural model for Alzheimer's β -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(26), 16742–16747.
- Piccini, A., Russo, C., Gliozzi, A., Relini, A., Vitali, A., Borghi, R., Giliberto, L., Armirotti, A., D'Arrigo, C., Bachi, A., Cattaneo, A., Canale, C., Torrassa, S., Saido, T.C., Markesbery, W., Gambetti, P., Tabaton, M. (2005). β -amyloid is different in normal aging and in Alzheimer disease. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(40), 34186–34192.
- Plant, L. D., Boyle, J. P., Smith, I. F., Peers, C., & Pearson, H. A. (2003). The Production of Amyloid β Peptide Is a Critical Requirement for the Viability of Central Neurons. *Journal of Neuroscience*, 23(13).
- Poljak, R. J. (1973). X-ray crystallographic studies of immunoglobulins. *Contemporary Topics in Molecular Immunology*, 2, 1–26.
- Poljak, R. J., Amzel, L. M., Avey, H. P., Chen, B. L., Phizackerley, R. P., & Saul, F. (1973). Three-dimensional structure of the Fab' fragment of a human immunoglobulin at 2,8-Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(12), 3305–10.
- Porter, R. R. (1959). The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain. *The Biochemical Journal*, 73, 119–126.
- Price, J. L., McKeel, D. W., Buckles, V. D., Roe, C. M., Xiong, C., Grundman, M., Hansen, L.A., Petersen, R.C., Parisi, J.E., Dickson, D.W., Smith, C.D., Davis, D.G., Schmitt, F.A., Markesbery, W.R., Kaye, J., Kurlan, R., Hulette, C., Kurland, B.F., Higdon, R., Kukull, W., Morris, J. C. (2009). Neuropathology of nondemented aging: presumptive evidence for preclinical Alzheimer disease. *Neurobiology of Aging*, 30(7), 1026–36.
- Price, J. L., & Morris, J. C. (1999). Tangles and plaques in nondemented aging and "preclinical" Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, 45(3), 358–368.
- Project, C. C. (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 50(Pt 5), 760–763
- Puzzo, D., Privitera, L., Leznik, E., Fà, M., Staniszewski, A., Palmeri, A., & Arancio, O. (2008). Picomolar amyloid- β positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(53), 14537–14545.
- Quistgaard, E. M., Grøtthauge, M. K., Madsen, P., Pallesen, L. T., Christensen, B., Sørensen, E. S., Nissen, P., Petersen, C.M., Thirup, S. S. (2014). Revisiting the structure of the Vps10 domain of human sortilin and its interaction with neurotensin. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 23(9), 1291–1300.
- Raghunathan, G., Smart, J., Williams, J., & Almagro, J. C. (2012). Antigen-binding site anatomy and somatic mutations in antibodies that recognize different types of antigens. *Journal of Molecular Recognition*, 25(3), 103–113.
- Read, R. J. (1986). Improved Fourier Coefficients for Maps Using Phases from Partial Structures with Errors. *Acta Crystallographica Section A*, 42, 140–149.
- Reis, K. J., Ayoub, M., & Boyle, M. D. P. (1984). Streptococcal Fc Receptors II. Comparison of the Reactivity of a Receptor from a Group C Streptococcus with Staphylococcal Protein A. *J. Immunol*, 132(6), 3098–3102.
- Rhodes, G. (2010). *Crystallography Made Crystal Clear: A Guide for Users of Macromolecular Models*. Riblet, R. (2003). *Molecular Biology of B Cells*. Elsevier.
- Riechmann, L.; Clark, M.; Waldmann, H.; Winter, G. (1988): Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* 332 (6162), 323–327.

- Rijal Upadhaya, A., Capetillo-Zarate, E., Kosterin, I., Abramowski, D., Kumar, S., Yamaguchi, H., Walter, J., Fändrich, M., Staufienbiel, M., Thal, D. R. (2012). Dispersible amyloid β -protein oligomers, protofibrils, and fibrils represent diffusible but not soluble aggregates: their role in neurodegeneration in amyloid precursor protein (APP) transgenic mice. *Neurobiology of Aging*, 33(11), 2641–2660.
- Rijal Upadhaya, A., Kosterin, I., Kumar, S., von Arnim, C. a F., Yamaguchi, H., Fändrich, M., Staufienbiel, M., Thal, D. R. (2014). Biochemical stages of amyloid- β peptide aggregation and accumulation in the human brain and their association with symptomatic and pathologically preclinical Alzheimer's disease. *Brain : A Journal of Neurology*, 137(Pt 3), 887–903.
- Rini, J. M., Schulze-Gahmen, U., Wilson, I. A. (1992). Structural evidence for induced fit as a mechanism for antibody-antigen recognition. *Science* 255 (5047), 959–965.
- Rini, J. M., Stanfield, R. L., Stura, E. A., Salinas, P. A., Profy, A. T., & Wilson, I. A. (1993). Crystal structure of a human immunodeficiency virus type 1 neutralizing antibody, 50.1, in complex with its V3 loop peptide antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(13), 6325–6329.
- Rinne, J. O., Brooks, D. J., Rossor, M. N., Fox, N. C., Bullock, R., Klunk, W. E., Mathis, C.A., Blennow, K., Barakos, J., Okello, A.A., Rodriguez, Martinez de Liano, S., Liu, E., Koller, M., Gregg, K.M., Schenk, D., Black, R., Grundman, M. (2010). 11C-PiB PET assessment of change in fibrillar amyloid-beta load in patients with Alzheimer's disease treated with bapineuzumab: a phase 2, double-blind, placebo-controlled, ascending-dose study. *Lancet Neurology*, 9(4), 363–372.
- Rossi, G., Nisonoff, A. (1968): Crystallization of Fragment Fab of human IgG myeloma proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 31 (6), 914–918.
- Rossi, G., Choi, T. K., & Nisonoff, A. (1969). Crystals of fragment Fab': preparation from pepsin digests of human IgG myeloma proteins. *Nature*, 223(5208), 837–838.
- Rossmann, M. G. (2001). Molecular replacement--historical background. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 57(Pt 10), 1360–1366.
- Rossmann, M. G., & Blow, D. M. (1962). The detection of sub-units within the crystallographic asymmetric unit. *Acta Crystallographica*, 15(1), 24–31.
- Russo, C., Saido, T. C., DeBusk, L. M., Tabaton, M., Gambetti, P., & Teller, J. K. (1997). Heterogeneity of water-soluble amyloid β -peptide in Alzheimer's disease and Down's syndrome brains. *FEBS Letters*, 409(3), 411–416.
- Russo, C., Violani, E., Salis, S., Venezia, V., Dolcini, V., Damonte, G., Benatti, U., D'Arrigo, C., Patrone, E., Carlo, P., Schettini, G. (2002). Pyroglutamate-modified amyloid beta-peptides--AbetaN3(pE)--strongly affect cultured neuron and astrocyte survival. *Journal of Neurochemistry*, 82(6), 1480–1489.
- Saido, T. C. (n.d.). Alzheimer's disease as proteolytic disorders: anabolism and catabolism of beta-amyloid. *Neurobiology of Aging*, 19(1) 69–75.
- Saido, T. C., Iwatsubo, T., Mann, D. M., Shimada, H., Ihara, Y., & Kawashima, S. (1995). Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species, A beta N3(pE), in senile plaques. *Neuron*, 14(2), 457–466.
- Saido, T. C., Yamao-Harigaya, W., Iwatsubo, T., & Kawashima, S. (1996). Amino- and carboxyl-terminal heterogeneity of beta-amyloid peptides deposited in human brain. *Neuroscience Letters*, 215(3), 173–176.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463–7.
- Santarsiero, B. D., Yegian, D. T., Lee, C. C., Spraggon, G., Gu, J., Scheibe, D., Uber, D.C., Cornell, E.W., Nordmeyer, R.A., Kolbe, W.F., Jin, J., Jones, A.L., Jaklevic, J.M., Schultz, P.G., Stevens, R. C. (2002). An approach to rapid protein crystallization using nanodroplets. *Journal of Applied Crystallography*, 35(2), 278–281.
- Sauer-eriksson, A. E., Kleywegt, G. J., Uhlen, M., & Jones, T. A. (1995). Crystal structure of the C2 fragment of streptococcal protein G in complex with the Fc domain of human IgG, 3, 265–278.
- Savage, M. J., Kalinina, J., Wolfe, A., Tugusheva, K., Korn, R., Cash-Mason, T., Maxwell, J.W., Hatcher, N.G., Haugabook, S.J., Wu, G., Howell, B.J., Renger, J.J., Shughrue, P.J., McCampbell, A. (2014). A sensitive $\alpha\beta$ oligomer assay discriminates Alzheimer's and aged control cerebrospinal fluid. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(8), 2884–2897.
- Savva, G. M., Wharton, S. B., Ince, P. G., Forster, G., Matthews, F. E., & Brayne, C. (2009). Age, neuropathology, and dementia. *The New England Journal of Medicine*, 360(22), 2302–2309.

- Scheerer, P., Kramer, A., Otte, L., Seifert, M., Wessner, H., Scholz, C., Krauss, N., Schneider-Mergener, J., Höhne, W. (2007). Structure of an anti-cholera toxin antibody Fab in complex with an epitope-derived D-peptide: a case of polyspecific recognition. *Journal of Molecular Recognition : JMR*, 20(4), 263–274.
- Scheltens, P., Blennow, K., Breteler, M. M. B., Strooper, B. De, Frisoni, G. B., Salloway, S., & Flier, W. M. Van Der. (2016). Alzheimer ' s disease. *The Lancet*, 6736(15), 1–13.
- Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Liao, Z., Lieberburg, I., Motter, R., Mutter, L., Soriano, F., Shopp, G., Vasquez, N., Vandevent, C., Walker, S., Wogulis, M., Yednock, T., Games, D., Seubert, P. (1999). Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*, 400(6740), 173–177.
- Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T.D., Hardy, J., Hutton, M., Kukull, W., Larson, E., Levy-Lahad, E., Viitanen, M., Peskind, E., Poorkaj, P., Schellenberg, G., Tanzi, R., Wasco, W., Lannfelt, L., Selkoe, D., Younkin, S. (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. *Nature Medicine*, 2(8), 864–870.
- Schilling, S., Hoffmann, T., Manhart, S., Hoffmann, M., & Demuth, H.-U. (2004). Glutaminy cyclases unfold glutamyl cyclase activity under mild acid conditions. *FEBS Letters*, 563(1-3), 191–196.
- Schilling, S., Lauber, T., Schaupp, M., Manhart, S., Scheel, E., Bo, G., Böhm, G., Demuth H.-U. (2006). Accelerated Publications On the Seeding and Oligomerization of pGlu-Amyloid Peptides. *Biochemistry*, 45(41).12393-12399
- Schilling, S., Niestroj, A. J., Rahfeld, J.-U., Hoffmann, T., Wermann, M., Zunkel, K., Wasternack, C., Demuth, H.-U. (2003). Identification of human glutaminy cyclase as a metalloenzyme. Potent inhibition by imidazole derivatives and heterocyclic chelators. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(50), 49773–49779.
- Schilling, S., Zeitschel, U., Hoffmann, T., Heiser, U., Francke, M., Kehlen, A., Holzer, M., Hutter-Paier, B., Prokesch, M., Windisch, M., Jagla, W., Schlenzig, D., Lindner, C., Rudolph, T., Reuter, G., Cynis, H., Montag, D., Demuth, H.-U., Rossner, S. (2008). Glutaminy cyclase inhibition attenuates pyroglutamate Aβeta and Alzheimer's disease-like pathology. *Nature Medicine*, 14(10), 1106–1111.
- Schlenzig, D., Manhart, S., Cinar, Y., Kleinschmidt, M., Hause, G., Willbold, D., Funke, S.A., Schilling, S., Demuth, H.-U. (2009). Pyroglutamate formation influences solubility and amyloidogenicity of amyloid peptides. *Biochemistry*, 48(29), 7072–7078.
- Schlenzig, D., Röncke, R., Cynis, H., Ludwig, H.-H., Scheel, E., Reymann, K., Saido, T., Hause, G., Schilling, S., Demuth, H.-U. (2012). N-Terminal pyroglutamate formation of Aβ38 and Aβ40 enforces oligomer formation and potency to disrupt hippocampal long-term potentiation. *Journal of Neurochemistry*, 121(5), 774–84.
- Schmidt, M., Rohou, A., Lasker, K., Yadav, J. K., Schiene-Fischer, C., Fändrich, M., Grigorieff, N. (2015) Peptide dimer structure in an Aβ(1-42) fibril visualized with cryo-EM. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112(38), 11858–11863
- Seifert, F., Schulz, K., Koch, B., Manhart, S., Demuth, H. U., & Schilling, S. (2009). Glutaminy cyclases display significant catalytic proficiency for glutamyl substrates. *Biochemistry*, 48(50), 11831–11833.
- Selkoe, D. J. (1986). Altered structural proteins in plaques and tangles: what do they tell us about the biology of Alzheimer's disease? *Neurobiology of Aging*, 7(6), 425–432.
- Selkoe, D. J. (2011). Resolving controversies on the path to Alzheimer's therapeutics. *Nature Medicine*, 17(9), 1060–1065.
- Sergeant, N., Bombois, S., Ghestem, A., Drobecq, H., Kostanjevecki, V., Missiaen, C., Watzel, A., David, J.P., Vanmechelen, E., Sergheraert, C., Delacourte, A. (2003). Truncated beta-amyloid peptide species in pre-clinical Alzheimer's disease as new targets for the vaccination approach. *Journal of Neurochemistry*, 85(6), 1581–1591.
- Sevalle, J., Amoyel, A., Robert, P., Fournié-Zaluski, M.-C., Roques, B., & Checler, F. (2009). Aminopeptidase A contributes to the N-terminal truncation of amyloid beta-peptide. *Journal of Neurochemistry*, 109(1), 248–256.
- Sevigny, J., Chiao, P., Bussière, T., Weinreb, P. H., Williams, L., Maier, M., Dunstan, R., Salloway, S., Chen, T., Ling, Y., O'Gorman, J., Qian, F., Arastu, M., Li, M., Chollate, S., Brennan, M. S., Quintero-Monzon, O., Scannevin, R. H., Arnold, H. M., Engber, T., Rhodes, K., Ferrero, J., Hang, Y., Mikulskis, A., Grimm, J., Hock, C., Nitsch, R. M., and Sandrock, A. (2016) The antibody aducanumab reduces Aβ plaques in Alzheimer's disease. *Nature*. 537, 50–56

- Shankar, G. M., Li, S., Mehta, T. H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N. E., Smith, I., Brett, F.M., Farrell, M.A., Rowan, M.J., Lemere, C.A., Regan, C.M., Walsh, D.M., Sabatini, B.L., Selkoe, D. J. (2008). Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nature Medicine*, 14(8), 837–842.
- Soscia, S. J., Kirby, J. E., Washicosky, K. J., Tucker, S. M., Ingelsson, M., Hyman, B., Burton, M. A., Goldstein, L. E., Duong, S., Tanzi, R. E., and Moir, R. D. (2010). The Alzheimer's Disease-Associated Amyloid β -Protein Is an Antimicrobial Peptide. *PLoS ONE*, 5(3), e9505.
- Sperling, R. A., Aisen, P. S., Beckett, L. A., Bennett, D. A., Craft, S., Fagan, A. M., Iwatsubo, T., Jack, C.R. Jr, Kaye, J., Montine, T.J., Park, D.C., Reiman, E.M., Rowe, C.C., Siemers, E., Stern, Y., Yaffe, K., Carrillo, M.C., Thies, B., Morrison-Bogorad, M., Wagster, M.V., Phelps, C. H. (2011). Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 7(3), 280–292.
- Sperling, R. A., Jack, C. R., & Aisen, P. S. (2011). Testing the right target and right drug at the right stage. *Science Translational Medicine*, 3(111), 111-133.
- Sperling, R., Salloway, S., Brooks, D.J., Tampieri, D., Barakos, J., Fox, N.C., Raskind, M., Sabbagh, M., Honig, L.S., Porsteinsson, A.P., Lieberburg, I., Arrighi, H.M., Morris, K.A., Lu, Y., Liu, E., Gregg, K.M., Brashear, H.R., Kinney, G.G., Black, R., Grundman, M. Amyloid-related imaging abnormalities in patients with Alzheimer's disease treated with bapineuzumab: a retrospective analysis. *Lancet Neurol.* 2012; 11, 241–249.
- Stanfield, R.L.; Takimoto-Kamimura, M.; Rini, J.M.; Profy, A.T.; Wilson, I.A. (1993): Major antigen-induced domain rearrangements in an antibody. *Structure* 1 (2), 83–93.
- Stone, G. C., Sjobring, U. L. F., Eljorck, L., Sjoquist, J., Barber, C. V., & Nardella, F. A. (1989). The Fc binding site for streptococcal protein G is in the C gamma 2-C gamma 3 interface region of IgG and is related to the sites that bind staphylococcal protein A and human rheumatoid factors. *Journal of Immunology*, (21), 565–570.
- Strobel, G. (2015). Shape of a Hug: How the Embrace of a Therapeutic A β Antibody Really Matters. <http://www.alzforum.org/news/research-news/shape-hug-how-embrace-therapeutic-av-antibody-really-matters>
- Sullivan, C. P., Berg, E. a, Elliott-Bryant, R., Fishman, J. B., McKee, A. C., Morin, P. J., Shia, M.A.Fine, R. E. (2011). Pyroglutamate-A β 3 and 11 colocalize in amyloid plaques in Alzheimer's disease cerebral cortex with pyroglutamate-A β 11 forming the central core. *Neuroscience Letters*, 505(2), 109–112.
- Sun, N., Hartmann, R., Lecher, J., Stoldt, M., Funke, S. A., Gremer, L., Gremer L, Ludwig, H.H., Demuth, H.-U., Kleinschmidt, M., Willbold, D. (2012). Structural analysis of the pyroglutamate-modified isoform of the Alzheimer's disease-related amyloid- β using NMR spectroscopy. *Journal of Peptide Science: An Official Publication of the European Peptide Society*, 18(11), 691–695.
- Suzuki, N., Cheung, T. T., Cai, X. D., Odaka, A., Otvos, L., Eckman, C., Golde, T.E. Younkin, S. G. (1994). An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science (New York, N.Y.)*, 264(5163), 1336–1340.
- Svasti, J., & Milstein, C. (1972). The disulphide bridges of a mouse immunoglobulin G1 protein. *The Biochemical Journal*, 126(4), 837–850.
- Tabaton, M., Nunzi, M. G., Xue, R., Usiak, M., Autilio-Gambetti, L., & Gambetti, P. (1994). Soluble amyloid beta-protein is a marker of Alzheimer amyloid in brain but not in cerebrospinal fluid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 200(3), 1598–1603.
- Takai, T., Takaya, T., Nakano, M., Akutsu, H., Nakagawa, A., Aimoto, S., Nagai, K. Ikegami, T. (2006). Orexin-A is composed of a highly conserved C-terminal and a specific, hydrophilic N-terminal region, revealing the structural basis of specific recognition by the orexin-1 receptor. *Journal of Peptide Science: An Official Publication of the European Peptide Society*, 12(7), 443–454.
- Tekirian, T. L., Yang, A. Y., Glabe, C., & Geddes, J. W. (1999). Toxicity of Pyroglutaminated Amyloid β -Peptides 3 (pE) -40 and -42 Is Similar to That of A β 1-40 and -42, 3, 1–6.
- Terry, R. D., & Katzman, R. (1983). Senile dementia of the Alzheimer type. *Annals of Neurology*, 14(5), 497–506.
- Tomaselli, S., Esposito, V., Vangone, P., van Nuland, N. a J., Bonvin, A. M. J. J., Guerrini, R., Tancredi, T., Temussi, P.A., Picone, D. (2006). The alpha-to-beta conformational transition of Alzheimer's Abeta-(1-42) peptide in aqueous media is reversible: a step by step conformational analysis suggests the location of beta conformation seeding. *ChemBiochem: A European Journal of Chemical Biology*, 7(2), 257–267.

- Turner, P. R., O'Connor, K., Tate, W. P., & Abraham, W. C. (2003). Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Progress in Neurobiology*, 70 (1), 1-32.
- Vassar, P. S., & Culling, C. F. (1959). Fluorescent stains, with special reference to amyloid and connective tissues. *Archives of Pathology*, 68, 487–498.
- Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., Teplow, D.B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M.A., Biere, A.L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J.C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G., Citron, M. (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science (New York, N. Y.)*, 286(5440), 735–741.
- Vivekanandan, S., Brender, J. R., Lee, S. Y., & Ramamoorthy, A. (2011). A partially folded structure of amyloid-beta(1-40) in an aqueous environment. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 411(2), 312–316.
- Walsh, D. M., Lomakin, A., Benedek, G. B., Condron, M. M., & Teplow, D. B. (1997). Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(35), 22364–22372.
- Walsh, D. M., & Selkoe, D. J. (2007). A beta oligomers - a decade of discovery. *Journal of Neurochemistry*, 101(5), 1172–1184.
- Wälti, M. A., Ravotti, F., Arai, H., Glabe, C. G., Wall, J. S., Böckmann, A., Güntert, P., Meier, B. H., and Riek, R. (2016). Atomic-resolution structure of a disease-relevant A β (1-42) amyloid fibril. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(34), E4976-84.
- Weidemann, A., König, G., Bunke, D., Fischer, P., Salbaum, J. M., Masters, C. L., & Beyreuther, K. (1989). Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell*, 57(1), 115–126.
- Weiner, H. L., & Frenkel, D. (2006). Immunology and immunotherapy of Alzheimer's disease. *Nature Reviews. Immunology*, 6(5), 404–416.
- Wilcock, D. M., Munireddy, S. K., Rosenthal, A., Ugen, K. E., Gordon, M. N., & Morgan, D. (2004). Microglial activation facilitates Abeta plaque removal following intracranial anti-Abeta antibody administration. *Neurobiology of Disease*, 15(1), 11–20.
- Williams, L. K., Li, C., Withers, S. G., & Brayer, G. D. (2012). Order and disorder: differential structural impacts of myricetin and ethyl caffeate on human amylase, an antidiabetic target. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(22), 10177–10186.
- Wirhth, O., Breyhan, H., Cynis, H., Schilling, S., Demuth, H.-U., & Bayer, T. A. (2009). Intraneuronal pyroglutamate-Abeta 3-42 triggers neurodegeneration and lethal neurological deficits in a transgenic mouse model. *Acta Neuropathologica*, 118(4), 487–496.
- Wirhth, O., Erck, C., Martens, H., Harmeier, A., Geumann, C., Jawhar, S., Kumar, S., Multhaup, G., Walter J., Ingelsson, M., Degerman-Gunnarsson, M., Kalimo, H., Huitinga, I., Lannfelt, L., Bayer, T. A. (2010). Identification of low molecular weight pyroglutamate A β oligomers in Alzheimer disease: a novel tool for therapy and diagnosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(53), 41517–41524.
- Wischik, C. M., Novak, M., Thøgersen, H. C., Edwards, P. C., Runswick, M. J., Jakes, R., Walker, J.E., Milstein, C., Roth, M., Klug, A. (1988). Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(12), 4506–4510.
- Witnam, J. L., Portelius, E., Zetterberg, H., Gustavsson, M. K., Schilling, S., Koch, B., Demuth, H.U., Blennow, K., Wirhth, O., Bayer, T. A. (2012). Pyroglutamate amyloid β (A β) aggregates behavioral deficits in transgenic amyloid mouse model for Alzheimer disease. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(11), 8154–8162.
- Wolfe, M. S., Xia, W., Ostaszewski, B. L., Diehl, T. S., Kimberly, W. T., & Selkoe, D. J. (1999). Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature*, 398(6727), 513–517.
- Wu, G., Miller, R. A, Connolly, B., Marcus, J., Renger, J., & Savage, M. J. (2013). Pyroglutamate-Modified Amyloid- β Protein Demonstrates Similar Properties in an Alzheimer's Disease Familial Mutant Knock-In Mouse and Alzheimer's Disease Brain. *Neuro-Degenerative Diseases*. 14 (2), 53-66.
- Wu, T. T., Kabat, E. A., & Bilofsky, H. (1975). Similarities among hypervariable segments of immunoglobulin chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(12), 5107–10.

- Yamaguchi, Y., Kim, H., Kato, K., Masuda, K., Shimada, I., & Arata, Y. (1995). Proteolytic fragmentation with high specificity of mouse immunoglobulin G. Mapping of proteolytic cleavage sites in the hinge region. *Journal of Immunological Methods*, 181(2), 259–267.
- Yang, Y., Liu, C., Lin, Y.-L., & Li, F. (2013). Structural insights into central hypertension regulation by human aminopeptidase A. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(35), 25638–25645.
- Yiannopoulou, K. G., & Papageorgiou, S. G. (2013). Current and future treatments for Alzheimer's disease. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 6(1), 19–33.
- Yoshizawa, T., Shimizu, T., Hirano, H., Sato, M., & Hashimoto, H. (2012). Structural basis for inhibition of xyloglucan-specific endo- β -1,4-glucanase (XEG) by XEG-protein inhibitor. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(22), 18710–18716.
- Ysern, X., Fields, B. A., Bhat, T. N., Goldbaum, F. A., Dall'Acqua, W., Schwarz, F. P., Poljiak, R.J., Mariuzza, R. A. (1994). Solvent rearrangement in an antigen-antibody interface introduced by site-directed mutagenesis of the antibody combining site. *Journal of Molecular Biology*, 238(4), 496–500.
- Zini, S., Masdehors, P., Lenkei, Z., Fournie-Zaluski, M. C., Roques, B. P., Corvol, P., & Llorens-Cortes, C. (1997). Aminopeptidase A: distribution in rat brain nuclei and increased activity in spontaneously hypertensive rats. *Neuroscience*, 78(4), 1187–1193.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström, 10^{-10} m
A	Adenin
aa	Aminosäure (<i>amino acid</i>)
Abb.	Abbildung
AD	Alzheimer Demenz
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARIA	amyloid-bezogene optische Abnormalitäten (<i>amyloid-related imaging abnormalities</i>)
BACE	<i>Beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme</i>
BAEE	N- α -benzoyl-L-arginine ethyl ester
BM	Bindungsmodus
bp	Basenpaare
buried ASA	verborgene zugängliche Oberfläche (<i>buried accessible surface area</i>)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CDR	Komplementaritäts-bestimmenden-Regionen (<i>Complementary determining regions</i>)
CSF	Zerebrospinalflüssigkeit (<i>cerebrospinal fluid</i>)
C-Terminus	Carboxyterminus
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DEA	Diethylamin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Echerichia coli</i>
et al.	et alii
ϵ	Extinktionskoeffizient
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide
EDT	1,2-Ethandithiol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F _{ab}	<i>fragment antigen binding</i>
FACE	<i>fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis</i>
FBS	fötales bovines Serum
F _c	<i>fragment crystallizable</i>
G	Guanin

GnHCl	Guanidinhydrochlorid
h	Stunde
HC	Schwere Kette (<i>heavy chain</i>)
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)- ethansulfonsäure
HFIP	Hexafluoroisopropanol
ITC	Isothermale Titrationskalorimetrie
K _A	Assoziationskonstante
kb	Kilobasen
K _D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
KLH	<i>keyhole limpet hemocyanin</i>
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
LC	leichte Kette (<i>light chain</i>)
M	molar (mol·l ⁻¹)
mA	Milliampere
MCI	milde kognitive Beeinträchtigung (<i>mild cognitive impairment</i>)
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
MEM NEAA	<i>Minimal essential Medium Non-Essential Amino Acids</i>
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	millimolar
µM	mikromolar
MW	molare Masse
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i>
NaOH	Natriumhydroxid
NCS	nicht kristallographische Verwandtschaft (<i>non-crystallographic symmetry</i>)
ng	Nanogramm
NHS	N-Hydroxysuccinimide
nM	nanomolar
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
NMM	N-Methylmorpholin
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
N-Terminus	Aminoterminus
OPR	Oberflächenplasmonresonanz
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Pbio	PEG-Biotin
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)

PDB	Proteinstruktur-Datenbank (<i>protein data bank</i>)
PEG	Polyethylenglykol
PES	Polyethersulfon
PET	<u>P</u> ositron <u>e</u> mission <u>s</u> tomographie
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
R _{max}	maximal Bindungskapazität des Analyten
RMSD	Wurzel der mittleren quadratische Abweichung (<i>root mean square deviation</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minutes</i>)
RT	Raumtemperatur
RU	<i>response units</i>
sc	Formkomplementarität (<i>shape complementarity</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SFM	Serum-freies Medium
SV	Säulenvolumen
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumtetrafluoroborat
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TIS	Triisopropylsilan
TLS	<u>t</u> ranslation, <u>l</u> iberation und <u>s</u> crew (Verfeinerungsprotokoll)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	ultravioletter Spektralbereich
Vis	Spektralbereich des sichtbaren Lichts
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
WW	Wechselwirkung

Die dieser Arbeit verwendeten Anglistimen sind, sofern sie ein fester Bestandteil der biochemischen Terminologie sind, nicht übersetzt. Sie sind zur Verdeutlichung kursiv dargestellt. Der Einbuchstabencode wird für die Abkürzung der Aminosäuren verwendet.

6.2 Anhang zum Methodenteil

Zu Methodenteil 2.2.2.7:

Hier dargestellt sind die Sequenzierungsergebnisse des variablen Teils der schweren und leichten Kette des AK c#24 und c#17 mittels des Sequenzierprimerpaares pJet 5`seq und pJet 3`seq nach Ligation in den pJET 2.1 Vektor und die daraus ermittelte Aminosäuresequenz. Die Sequenzen der verwendeten Primer für die vorrangegangene DNA-Amplifikation nach cDNA-Generierung (Tab. 2.1) sind wie folgt farbig eingerahmt. *forward* Primer in cyan, antiparalleler *reverse* Primer in gelb, modifizierte Basen in grau, abweichende Sequenz vom verwendeten Primer in magenta.

variabler Teil der leichten Kette c#24:

```
actcactatagggagagcggccgccagatcttccggatggctcgagtttttcagcaagat
atgaagttgcctggttaggctggtggtgctc tggattcaggaaccaagggtgatggttg
M K L P V R L L V L W I Q E T K G D V V
ctgaccagactccactcactttgtcggttaccattggacaaccagcctctatctcttgc
L T Q T P L T L S V T I G Q P A S I S C
aagtcaagtcagagcctcttatatagtaatggaaaaacctatgtgaattggttattacag
K S S Q S L L Y S N G K T Y L N W L L Q
aggccaggccagtcctccaaagcgcctaatactatgtggtgtctaaactggactctggagtc
R P G Q S P K R L I Y V V S K L D S G V
cctgacagggttactggcagtggtatcaggaacagatcttactgaaaatcagcagagtg
P D R F T G S G S G T D F T L K I S R V
gaggctgaggatttgggagtttattattgctgcaagggtacacattttccattcacgttc
E A E D L G V Y Y C V Q G T H F P F T F
ggctcggggacaaagttggaaataaaaacgggctgatgctgcaccaactgtatccatcttc
G S G T K L E I K R A D A A P T V S I F
ccaccatccagt atctttctagaagatctcctacaatattctcagctgccatggaaaatc
P P S S
gatgttcttcttttattctctcaagatcttccaggctgtatattaaaacttatattaagaa
```

MKV1: ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTG
MKC: antiparallel: CCATCTTCCCACCATCCAGT

variabler Teil der schweren Kette c#24:

```
actcactatagggagagcggccgccagatcttccggatggctcgagtttttcagcaagat
atgggatggagcgggtcttttctctt cctcctgtcagtaactgaagggtgtccactcccag
M G W S G V F L F L L S V T E G V H S Q
gttcagctgcagcagctctggggctgagctgggtgaggcctgggtcctcagtgaaagatttcc
V Q L Q Q S G A E L V R P G S S V K I S
tgcaaggcttctggctatatattcaataactactggataaactgggtgaagcagaggcct
C K A S G Y I F N N Y W I N W V K Q R P
ggtcagggtcttgagtggttggacagatcttctcctggagatgggtgataactaactacaat
G Q G L E W I G Q I Y P G D G D T N Y N
```

gggaagttcaagggtaaagccacactgactgcagacaaatcctccagcacagcctacatg
 G K F K G K A T L T A D K S S S T A Y M
 cagctcagcagcctaacatctgaggactctgcggtctatctgtgcaagagagggat
 Q L S S L T S E D S A V Y F C A R E G Y
 attgtttattggggccaagggactctggtcactgtctctgcagccaaaacgaca ccccca
 I V Y W G Q G T L V T V S A A K T T P P
 tctgtctatccactg atcttttctagaagatctcctacaatattctcagctgccatggaaa
 S V Y P L
 actgatgttcttcttttattctctcaagatcttcaggctgtatattaaaacttatattaa

MHV7 : ATGGRATGGAGCKGGRTCTTTMTCTT
MHCG1: antiparallel: CCCCATCTGTCTATCCACT

variabler Teil der leichten Kette c#17:

actcactatagggagagcggcgccagatcttccggatggctcgagtttttcagcaagat
 atgaagttgcctggttaggctggtggtgctggtgtctggattcctggttccagcagtgat
M K L P V R L L V L V F W I P V S S S D
 gttgtgatgaccagactccactctccctgcctgtcagctcttggagatcaagcctccatc
 V V M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I
 tcttgcagatctagtcagagccttgtacacagtgatggaaacacctatttacattggtac
 S C R S S Q S L V H S D G N T Y L H W Y
 ctgcagaagccaggccagctctccaaagctcctgatctacaaagtttccaaccgattttct
 L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S
 ggggtcccagacaggttcagtgggcagtgatcagggacagatttcacactcaagatcagc
 G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S
 agagtggaggctgaggatctgggagtttatttctgctctcaaagtacacatgttcctccg
 R V E A E D L G V Y F C S Q S T H V P P
 acgttcgggtggaggcaccagctggaaatcaaacgggctgatgctgcaccaactgtat cc
 T F G G G T K L E I K R A D A A P T V S
 Atcttcccaccatccagt atcttttctagaagatctcctacaatattctcagctgccatgg
 I F P P S S
 aaaatcgatgttcttcttttattctctcaagatcttcaggctgtatattaaaacttatat

MKV1 : ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTG
MKC: antiparallel: CCATCTCCCACCATCCAGT

variabler Teil der schweren Kette c#17:

actcactatagggagagcggcgccagatcttccggatggctcgagtttttcagcaagat
 atggactttgggctcagcttactta tttttgtccttatttttaaaaggtgtccagtgtag
M D F G L S L L I F V L I L K G V Q C E
 gtgaagctgggtggagtctgggggaggcttagtgagcctggaggggtcccggaaactctcc
 V K L V E S G G G L V Q P G G S R K L S
 tgtgcagcctctggattcactttcagtgactacggaatggcgtgggttcgacaggctcca
 C A A S G F T F S D Y G M A W V R Q A P
 ggggaagggcctgagtgggtagcattcattagtaatttggcatatagtatctactatgca
 G K G P E W V A F I S N L A Y S I Y Y A
 gacactgtgacggggccgattcaccatctctagagagaatgccaagaacaccctgtacctg
 D T V T G R F T I S R E N A K N T L Y L


```

gaaatgagcagctctgaggtctgaggacacagccatgtactactgtgcaaggtatgactac
E M S S L R S E D T A M Y Y C A R Y D Y
gataatatcttgactatgttatggactactggggcaaggaacctcagtcaccgtctcc
D N I L D Y V M D Y W G Q G T S V T V S
Tcagccaaaacaacacccccatcagtcctatccactgatctttctagaagatctcctacaa
S A K T T P P S V Y P L
tattctcagctgccatggaaaactgatgttcttcttttattctctcaagattttcaggct

```

MKV4 : ATGRAC TTTGGGYTCAGCTTGR TTT
MHCG2b : antiparallel: CCCCCATCAGTCTATCCACTG

6.3 Anhang zum Ergebnisteil

Zu Ergebnisteil 3.1.1

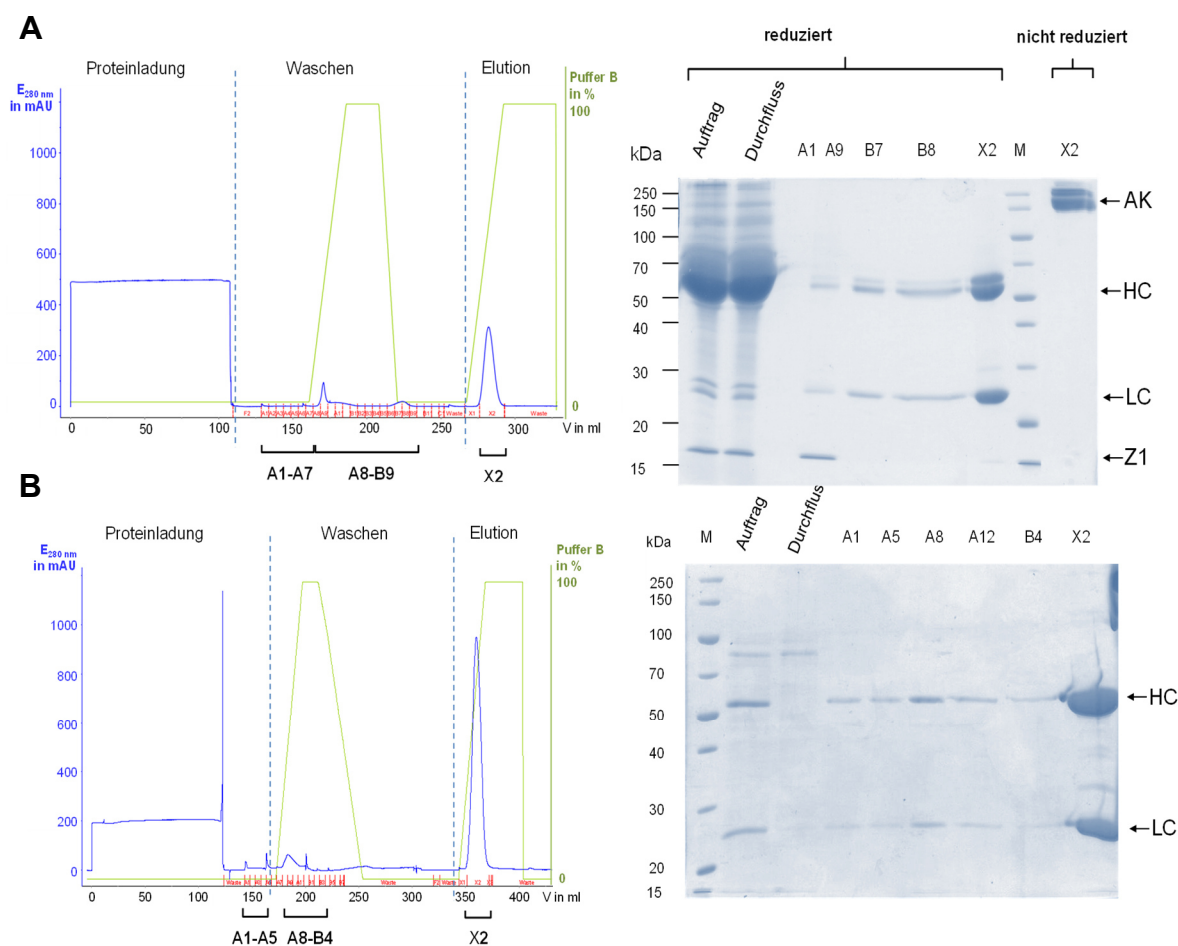


Abb. 6.1: Beschreibung der Reinigung der Antikörper #17 (A) und #24 (B) mittels Affinitätschromatographie an Protein G und SDS-PAGE

A) Links: Chromatogramm der Reinigung des AK #17 aus 1 L Zellkulturüberstand von Hybridomazellen (unter Kultivierung mit DMEM+FBS) mittels Affinitätschromatographie an Protein G. Nach Beladung wurde die Säule mit Bindungspuffer (Fraktionen A1-A7) und Waschpuffer (A8-B9) gewaschen. Der Waschvorgang und die Elution wurde über die Einstellung eines Gradienten (2 ml/min, 5 min; 2,5 ml/min, 10 min) zur Erreichung von 100 % Puffer B eingestellt. Die erhaltene AK-Menge betrug 8 mg. B) Links: Chromatogramm der Reinigung des AK #24 aus 2 L Zellkulturüberstand von Hybridomazellen (unter Kultivierung mit SFM). Beladene Säule wurde mit Bindungspuffer (Fraktionen A1-A5) und Waschpuffer (A8-B4) gewaschen. Die erhaltene AK-Menge betrug 15 mg. A und B) Rechts: 24 µl der Auftrags- und Durchflussfraktion, sowie ausgewählter Waschfraktionen und Elutionsfraktion X2 wurden mittels 12 % SDS-PAGE analysiert. Die HC und LC unter reduzierten sowie der zusammengesetzte AK unter nicht reduzierten Bedingungen ist gekennzeichnet. Z1 repräsentiert ein unspezifisch gebundenes Protein. M = Marker

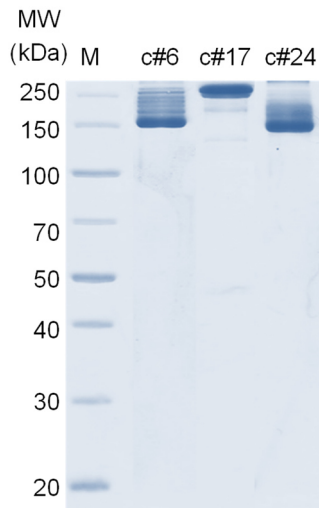


Abb. 6.2: Analyse der pE3-A β -spezifischen AK mittels nichtreduzierender SDS-PAGE

Sowohl AK c#6, c#17 und c#24 wurden über Affinitätschromatographie an Protein-G gereinigt und mittels 12 % SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetragen. Dabei bleibt der gereinigte Antikörper intakt und migriert zwischen 150-250 kDa mit einem berechneten Molekulargewicht von ~150 kDa.

Zu Ergebnisteil 3.1.2

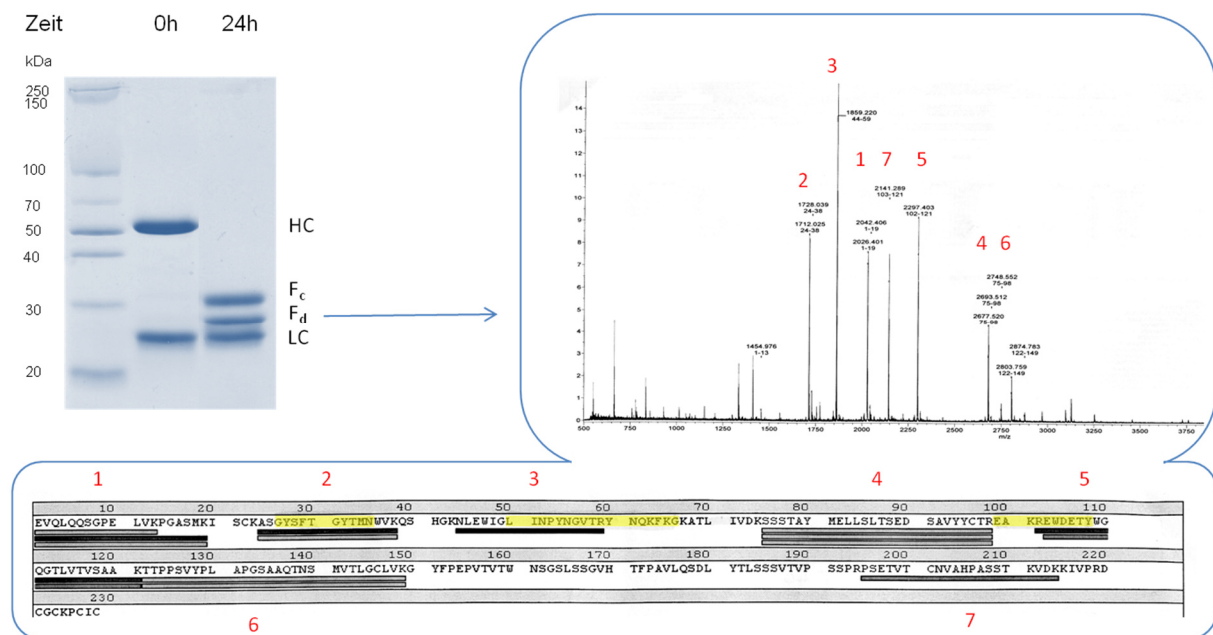


Abb. 6.3: Massenspektrometrische Analyse des F_d-Fragments von Antikörper c#6

Auftrag: Nach 0h Stunden und nach 24 Stunden Papainbehandlung wurden Antikörperproben (c#6) entnommen und davon 15 μ g Protein auf ein 12 % Polyacrylamidgel unter reduzierten Bedingungen geladen. Nach Färbung des Gels konnte das unterste Fragment der Probe, welche nach 24 h Inkubation mit Papain entnommen wurde, der leichten Kette zugeordnet werden, da diese auch ohne Papainbehandlung (0h) vorhanden war. Eines der beiden anderen Fragmente der dieser Probe, welches unterhalb der 30 kDa-Marke migriert, wurde ausgeschnitten und mittels Massenspektrometrie analysiert, wobei eindeutig das F_d-Fragment bestätigt wurde. Dabei stimmen die analysierten Proteinfragmente (siehe rechts, Nummer 1-7) mit Abschnitten der Aminosäuresequenzen (siehe unten) des F_d-Fragments überein. Somit muss es sich bei dem verbleibenden Fragment, welches bei einer Höhe von über 30 kDa migriert, um das F_c-Fragment handeln

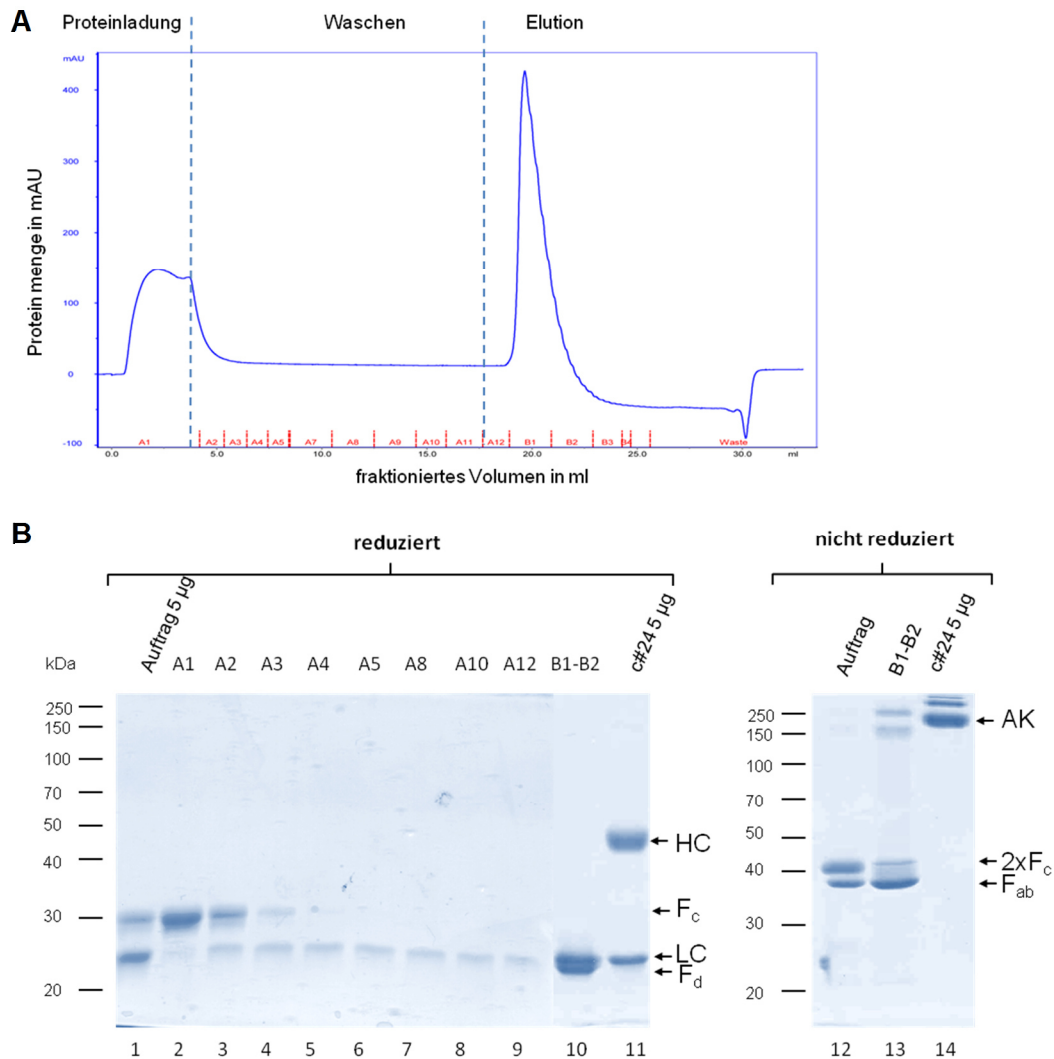


Abb.6.4: Beschreibung der Reinigung des F_{ab} -Fragments c#24 vom $2xF_c$ -Fragment mittels Affinitätschromatographie an Protein G und SDS-PAGE

Der verdauten Antikörper c#24 wurde auf eine Protein G-Säule geladen. Nach Proteinladung von 4 ml begann eine sofortige Fraktionierung. A) Chromatogramm: Während der Säulenbeladung und Waschung bindet ein Teil des Proteins nicht an der Protein-G-Säule. Durch die Beladung von 18 μ l jeder Fraktion auf ein reduzierendes 12 % SDS-Polyacrylamidgel (B) kann das F_c -Fragment in den Fraktionen A1-A3 (Spur 2-4) detektiert werden. Nach der Elution ist ein dominanter *peak* (Fraktion B1-B2) im Chromatogramm zu sehen (A), welcher mittels SDS-PAGE (B, Spur 10) als das F_{ab} -Fragment, bestehend aus LC und F_d -Fragment, identifiziert werden kann. Trägt man vergleichend den Proteinauftrag und die *peak* fraktion B1-B2 auf ein nicht reduzierendes 12 % Gel auf, so ist zu erkennen, dass es sich bei der unteren Bande in Spur 12 bei einer Höhe von unter 40 kDa um das F_{ab} -Fragment handeln muss, da dies auch in der gereinigten B1-B2 Fraktion (Spur 23) vorkommt, währenddessen die obere Bande mit einer Migrationshöhe von über 40 kDa das $2xF_c$ -Fragment darstellen muss.

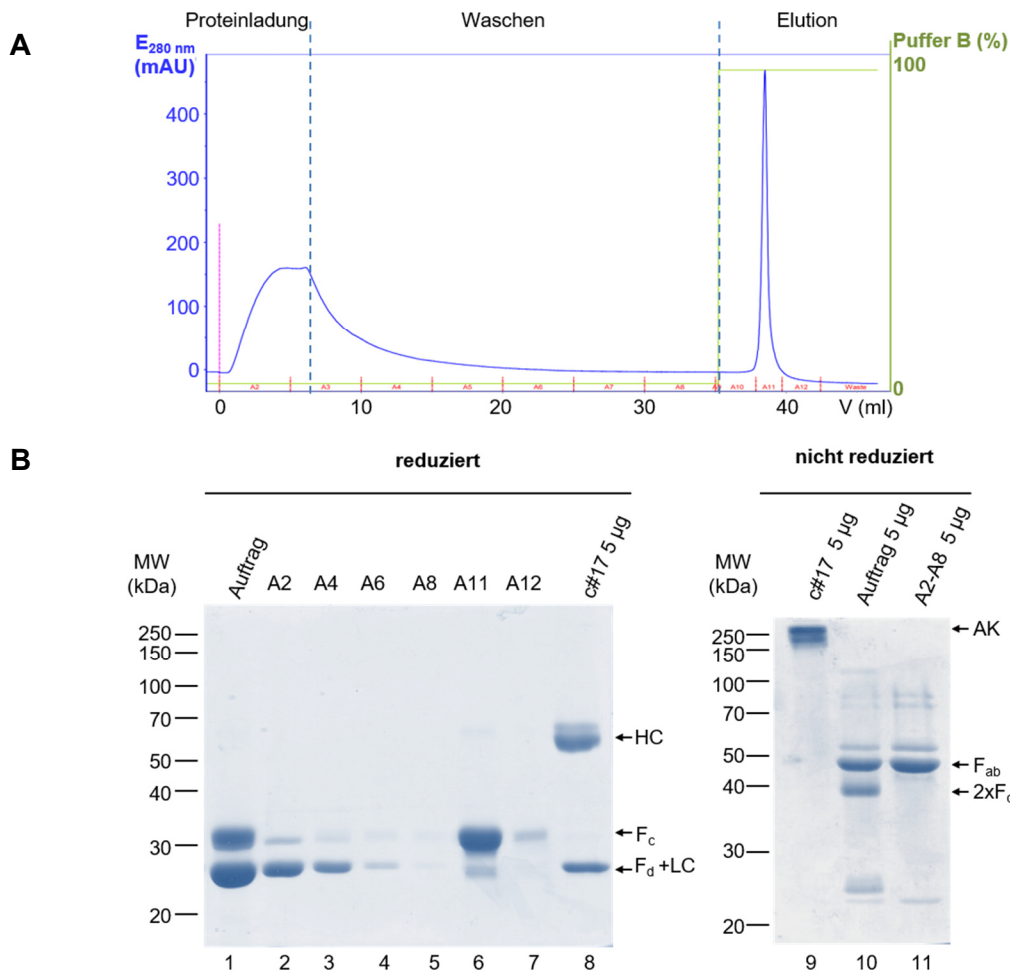


Abb. 6.5: Chromatographische Darstellung der Abtrennung des F_{ab} -Fragments c#17 vom $2xF_c$ -Fragment mittels Affinitätschromatographie an Protein G und SDS-PAGE

A) Der Ansatz (5 ml) des gespaltenen Antikörper c#17 wurde auf eine 1 ml Protein-G-Säule geladen und deren Trennungverhalten mittels eines Chromatogramms aufgezeichnet. Der Durchfluss wurde in Fraktionen mit Volumen von 5 ml gesammelt. Nach der Beladung erfolgte das Waschen mit Bindungspuffer und einer anschließende sauren Elution. B) 18 μ l wurden von jeder Fraktion (Spur 2-7) und vom Proteinauftrag (Spur 1) auf mittels 12 % reduzierender SDS-PAGE analysiert. Während der Beladung und des Waschens wurde das F_{ab} -Fragment, bestehend aus F_d -Fragment und LC, im Durchfluss gesammelt (Spur 2-4). Unter nicht-reduzierenden Bedingungen konnte dieses F_{ab} -Fragment in Fraktion A2-A8 bei einer Höhe von 50 kDa nachgewiesen werden (Spur 11). In den Elutionsfraktionen wurde eine dominante Bande des F_c -Fragments im Gel detektiert (Spur 6-7), welches unter nicht-reduzierenden Bedingungen als $2xF_c$ -Fragment bei einer Höhe von 40 kDa im Proteinauftrag (Spur 10) zu beobachten ist.

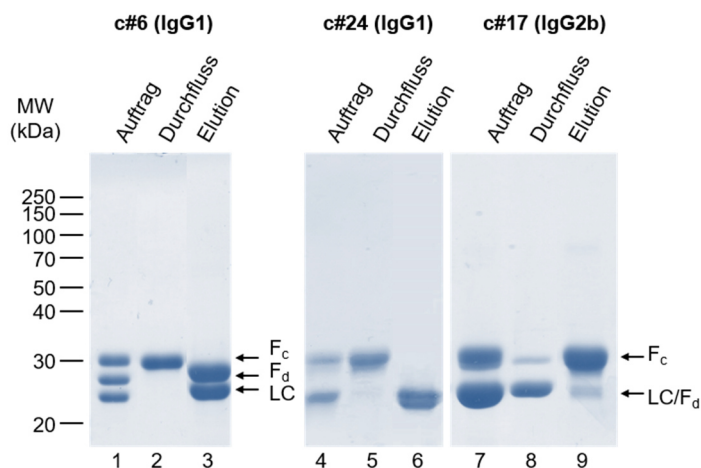


Abb. 6.6: Vergleich der Bindungseigenschaften der F_{ab} - und $2xF_c$ -Fragmente an die Protein-G-Matrix mittels SDS-PAGE

Das F_{ab} -Fragment der IgG1-Antikörper c#6 und c#24 band an die Protein-G-Matrix, währenddessen das F_c -Fragment nicht affin war. So gelangte das F_c -Fragment in den Durchfluss (Spur 2,5) und wurde vom F_{ab} -Fragment getrennt, welches durch saure Elution von der Matrix gelöst wurde (Spur 3,6). Das F_{ab} -Fragment des IgG2b-Antikörpers c#17 hingegen band nicht an Protein G und wurde im Durchfluss detektiert (Spur 8). Das F_c -Fragment hatte im Gegensatz eine Bindungsaffinität zur Matrix und wurde somit vom F_{ab} -Fragment getrennt. Es wurde anschließend sauer eluiert.

Zu Ergebnisteil 3.1.3

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der variablen Bereiche der drei leichten und drei schweren Ketten wurde mit Hilfe einer Sequenzanalyse durch den BLAST-Server (*Basic Logic Alignment Search Tool*) im Hinblick auf deren Sequenzidentität durchgeführt. Dabei wurde die Identität der variablen Domäne der LC separat von der variablen Domäne der HC zum AK c#6 betrachtet.

Sequenzalignment VL c#6 (Query) mit VL c#24 (Sbjct)

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	221 bits(564)	3e-80()	Compositional matrix adjust.	108/112(96%)	111/112(99%)	0/112(0%)
Query	1	DVVMQTPLTSLVSTIGQPASISCKSSQSLLYSDGKTYLNWLLQRPQGSPMRLIYLVSKLD	60			
		DVV+TQTPLTSLVSTIGQPASISCKSSQSLLYS+GKTYLNWLLQRPQGSP RLIY+VSKLD				
Sbjct	1	DVVLQTPLTSLVSTIGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYVVSCLD	60			
Query	61	SGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCVQGTHTFPFTFGSGTKLEIK	112			
		SGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCVQGTHTFPFTFGSGTKLEIK				
Sbjct	61	SGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCVQGTHTFPFTFGSGTKLEIK	112			

Sequenzalignment VH c#6 (Query) mit VH c#24 (Sbjct)

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	162 bits(410)	8e-57()	Compositional matrix adjust.	84/119(71%)	93/119(78%)	4/119(3%)
Query	1	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWKQSHGKNLEWIGLINPYNGVTRY	60			
		+VQLQQSG ELV+PG+S+KISCKASGY F Y +NWKQ G+ LEWIG I P +G T Y				
Sbjct	1	QVQLQQSGAELVSRPGSSVKISCKASGYIFNNYWINWVKQRPQGQLEWIGQIYPGDGDTNY	60			
Query	61	NQKFKGKATLIVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCTREAKREWDETYWGQGLVTVSA	119			
		N KFKGKATL DKSSSTAYM+L SLTSEDSAVY+C RE YWGQGLVTVSA				
Sbjct	61	NGKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAREGYI----VYWGQGLVTVSA	115			

Sequenzalignment VL c#6 (Query) mit VL c#17 (Sbjct)

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	174 bits(442)	7e-62()	Compositional matrix adjust.	86/112(77%)	96/112(85%)	0/112(0%)
Query	1	DVVMQTPLTSLVSTIGQPASISCKSSQSLLYSDGKTYLNWLLQRPQGSPMRLIYLVSKLD	60			
		DVVMQTPL+L V++G ASISC+SSQSL++SDG TYL+W LQ+PGQSP LIY VS				
Sbjct	1	DVVMQTPLSLPVSIGDQASISCRSSQSLVHSDGNTYLHWYLVKPGQSPKLLIYKVSNRF	60			
Query	61	SGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCVQGTHTFPFTFGSGTKLEIK	112			
		SGVPDRF+GSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVY+C Q TH P TFG GTKLEIK				
Sbjct	61	SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPPTFGGGTKLEIK	112			

Sequenzalignment V_H c#6 (Query) mit V_H c#17 (Sbjct)

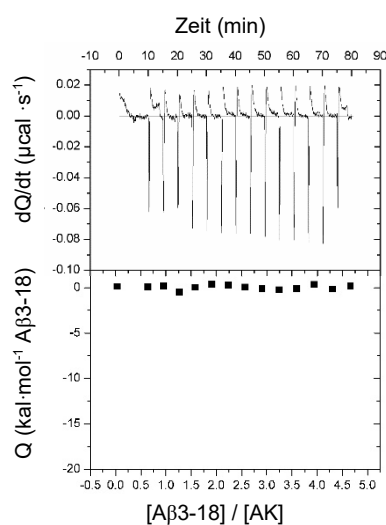
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
103 bits(256)	1e-33()	Compositional matrix adjust.	53/122(43%)	77/122(63%)	3/122(2%)
Query 1		EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKNLEWIGLINPYNGVTRY	60		
		EV+L +SG LV+PG S K+SC ASG++F+ Y M WV+Q+ GK EW+ I+ Y			
Sbjct 1		EVKLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSDYGMWVRQAPGKGP EWVAFISNLAYSIIY	60		
Query 61		NQKFKGKATLIVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCTR---EAKREWDETYWGQGTLVTV	117		
		G+ T+ + + +T Y+E+ SL SED+A+YYC R + ++ YWGQGT VTV			
Sbjct 61		ADTVTGRFTISRENAKNTLYLEMSSLRSEDTAMYYCARYDYDNILDYVMDYWGQGTSVTV	120		
Query 118	SA 119				
	S+				
Sbjct 121	SS 122				

Zu Ergebnisteil 3.2.1

Tab. 6.1: Ermittlung des Mittelwertes der relative RU-Werte der Plateauphase aus zweifacher OPR-Messung

AK c#	C _{AβE3-18} in nM	Aβ _{pE3-18}	Aβ _{pE3-18}	Mittelwert in rel RU	STABW
		Bindung in rel RU 1.Messung	Bindung in rel RU 2.Messung		
6	0	0	0	0	0,000
	2	2,55	3,05	2,8	0,354
	5	8,91	10,72	9,815	1,280
	10	16,63	17,28	16,955	0,460
	20	22,49	22,77	22,63	0,198
	50	27,71	27,96	27,835	0,177
24	0	0	0	0	0,000
	1	1,57	1,54	1,555	0,021
	2	1,67	2,64	2,155	0,686
	5	4,71	5,81	5,26	0,778
	10	7,32	8,85	8,085	1,082
	20	9,28	10,93	10,105	1,167
	50	11,58	11,27	11,425	0,219
17	100	11,83	11,85	11,84	0,014
	0	0	0	0	0,000
	0,5	2,94	1,55	2,245	0,983
	1	5,68	5,04	5,36	0,453
	2	10,22	9,45	9,835	0,544
	5	16,54	15,2	15,87	0,948
	10	19,39	17,47	18,43	1,358
20	20,65	19,55	20,1	0,778	

Zu Ergebnisteil 3.2.2

Abb.6.7: Darstellung der ITC-Daten des AK c#6 mit dem $\text{A}\beta_{3-18}$ -Peptid bei 30 °CTab. 6.2: OPR-Messung des gebundenen AK c#6 mit Zugabe verschiedener Konzentrationen des $\text{A}\beta_{3-18}$ -Peptids unter abweichenden Bedingungen

Bedingung	$c_{\text{A}\beta_{3-18}}$ in nM	$\text{A}\beta_{\text{E}3-18}$			
		Bindung in rel RU	KD-Wert in nM	k_{on} in 1/Ms	k_{off} in 1/s
500 mM NaCl	20	0,229	562	$0,135 \cdot 10^5$	$7,60 \cdot 10^{-3}$
	50	1,76			
	100	3,63			
	200	6,3			
	1000	13,6			
	2000	15,7			
	5000	17,5			
	10000	18,8			
0,05%Tween20	20000	19	434	$0,115 \cdot 10^5$	$4,99 \cdot 10^{-3}$
	50	3,43			
	100	5,58			
	200	8,88			
	500	14,7			
	1000	16,9			
	2000	20,3			
	5000	22,2			
10000	23,4				

Zu Ergebnisteil 3.3.1:

Sequenzalignment LC c#6 (Query) mit LC 1ZEA (Sbjct)

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	394 bits(1012)	1e-144()	Compositional matrix adjust.	190/216(88%)	200/216(92%)	0/216(0%)
Query	1	DVVMTQTPLTTLSTVIGQPASISCKSSQSLLYSDGKTYLNWLLQRPGQSPMRLIYLVSKLD				60
Sbjct	1	DV+MTQTPL+L V++G ASISCKSSQS+++S G TY W LQ+PGQSP LIY VS				60
Query	61	SGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCVQGTHFPFTFGSGTKLEIKRADAAPT				120
Sbjct	61	SGVPDRF+GSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC QG+H PFTFGSGTKLEIKRADAAPT				120
Query	121	SIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYISM				180
Sbjct	121	SIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYISM				180
Query	181	SSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNR		216		
Sbjct	181	SSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNR		216		

Sequenzalignment Fd-Fragment c#6 (Query) mit Fd-Fragment 1ZEA (Sbjct)

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	306 bits(785)	6e-110()	Compositional matrix adjust.	160/219(73%)	185/219(84%)	3/219(1%)
Query	1	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYFTGYTMNWKQSHGKNLEWIGLINPYNGVTRY				60
Sbjct	1	++QL QSGPEL PG +++ISCKASGY+FT Y M+WVKQ+ GK +W+G IN Y+GV Y				60
Query	61	NQKFKGKATLIVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCTREAKREWDETYWGQGLVTVSAA				120
Sbjct	61	FKG+ ++ S+STAY+++ +L +ED+A Y+C A+R W WG GT VTVS+A				117
Query	121	KTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTGLCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDL				180
Sbjct	118	KTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTGLCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDL				177
Query	181	YTLSSSVTVPSSTWPS+TVTCNVAHPASSTKVDKIVPR		219		
Sbjct	178	YTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDKIVPR		216		

Sequenzalignment LC c#24 (Query) mit LC 1ZEA (Sbjct)

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	
	395 bits(1014)	5e-145()	Compositional matrix adjust.	190/216(88%)	202/216(93%)	0/216(0%)	
Query	1	DVVL	TQTPL	TL	SV	TIGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNWLLQRP	60
Sbjct	1	DV++	TQTPL+L	V++G	ASISCKSSQS+++S+G	TY W LQ+PGQSPK LIY VS	60
Query	61	SGVPDR	F	TGSGSGTDF	TLKISRVEAEDLGVYYCVQ	GTHFPFTFGSGTKLEIKRADAAPT	120
Sbjct	61	SGVPDR	F	TGSGSGTDF	TLKISRVEAEDLGVYYC	QG+H PFTFGSGTKLEIKRADAAPT	120
Query	121	SIFPPS	SEQLTSGGASVVCFLNNFY	PKDINVKWKIDG	SERQNGVLNSWTDQ	DSKDYSTM	180
Sbjct	121	SIFPPS	SEQLTSGGASVVCFLNNFY	PKDINVKWKIDG	SERQNGVLNSWTDQ	DSKDYSTM	180
Query	181	SSTL	TLTKDEYERHNSYTCEATHKT	STSP	IVKSFNR		216
Sbjct	181	SSTL	TLTKDEYERHNSYTCEATHKT	STSP	IVKSFNR		216

Sequenzalignment Fd-Fragment c#24 (Query) mit Fd-Fragment 1ZEA (Sbjct)

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	
	299 bits(765)	3e-107()	Compositional matrix adjust.	159/216(74%)	179/216(82%)	1/216(0%)	
Query	1	QVQL	QQSGAELVRPGSSVKISCKASGYIF	NNYWINWVKQ	RPGQGLEWIGQI	YPGDGTNY	60
Sbjct	1	Q+QL	QSG EL PG +V+ISCKASGY F Y ++WVKQ	PG+G +W+G I G Y			60
Query	61	NGKFKG	KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDS	AVYFCAREG-YIVYWG	QGLTVTVSAAKTT		119
Sbjct	61	ADDFKGR	F	A	F	A	120
Query	120	PPSVY	PLAPGSAAQTNSMVT	LGCLVKGYFPEP	VTVTWNSGSLSSGVHT	FPAVLQSDLYTL	179
Sbjct	121	PPSVY	PLAPGSAAQTNSMVT	LGCLVKGYFPEP	VTVTWNSGSLSSGVHT	FPAVLQSDLYTL	180
Query	180	SSSVTV	PSSTWPSETVTCNVAHPASSTK	V	D	K	215
Sbjct	181	SSSVTV	PSSTWPSETVTCNVAHPASSTK	V	D	K	216

Sequenzalignment LC c#17 (Query) mit LC 2DQT (Sbjct)

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	435 bits(1118)	9e-161()	Compositional matrix adjust.	208/219(95%)	216/219(98%)	0/219(0%)
Query	1	DVVMQTPLSLPVS	LGDQASISCRSSQ	SLVHSDGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVS	NRF	60
Sbjct	1	DV+MTQTPLSLPVS	LGDQASISCRSSQ++VHS+G+TYL W+LQKPGQSPKLLIYKVS	NRF		60
Query	61	SGVPDRFSGSGS	GTDFTLTKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPPTFGGGTKLEIKRADAAPT	V	120	
Sbjct	61	SGVPDRFSGSGS	GTDFTLTKISRVEAEDLGVY+C Q +HVPPTFGGGTKLEIKRADAAPT	V	120	
Query	121	SIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDY	STYSM	180		
Sbjct	121	SIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDY	STYSM	180		
Query	181	SSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC		219		
Sbjct	181	SSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC		219		

Sequenzalignment Fd-Fragment c#17 (Query) mit Fd-Fragment 2DQT (Sbjct)

	Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
	315 bits(806)	6e-113()	Compositional matrix adjust.	170/222(77%)	187/222(84%)	2/222(0%)
Query	1	EVKLVESGGGLVQPGGSRKLS	CAASGFTFSDYGMWVRQAPGKGP	EWVAFISNLAYSIIY	60	
Sbjct	1	EVKLVESGGGLV+PGGS	KLSCAASGFTFS+Y M+WVRQ P K EWV IS+ SIYY		59	
Query	61	ADTVTGRFTISRENAKNTLYLEMSSLRSEDTAMY	YCARY-DYDNILDYVMDYWGQTSVT	119		
Sbjct	60	D+V GRFT+SR+NA+N LYL+M+SLRSEDTAMY+CAR	YD D+ D WG GTSVT	119		
Query	120	VSSAKTTPPSVYPLAPGCGD	TGSSVTLGCLVKGYFPE	SVTVTWNSGSLSSSVHTFPALL	179	
Sbjct	120	VSSAKTTPPSVYPLAPG T S VTLGCLVKGYFPE	VTVTWNSGSLSS VHTFPA+L	179		
Query	180	QSGLYTMSSSVTVPSSTWPSQ	TVTCSVAHPASSTVDK	KLEP 221		
Sbjct	180	QS LYT+SSSVTVPSSTWPS+TVTC+VAHPASST	VDK+ P	221		

Tab. 6.3: Proteinstrukturdaten nach Kristallisation aller gelösten F_{ab}-Strukturen/F_{ab}-Komplexe

	c#6 / Aβ _{pE3} - 12PEGb	c#24/ Aβ _{pE3} -18	c#17/ Aβ _{pE3} - 12PEGb	c#17m/ Aβ _{pE3} - 18PEGb	c#17wo	c#6wo
Statistik d. Datensammlung						
Strahlungsquelle	Rotating anode (in-house)	BESSY BL 14.1	Rotating anode (in-house)	BESSY BL 14.2	BESSY BL 14.1	Rotating anode (in-house)
Wellenlänge	1,5418	0,9184	1,5418	0,9184	0,9184	1,5418
Raumgruppe	P1	C2	P2 ₁	P1	P2 ₁	P4 ₃
Längen der Einheitszelle(Å)	53,79; 65,99; 67,77	115,63; 95,95; 90,38	43,17; 87,14; 58,03	40,91; 42,94; 57,98	45,18; 82,96; 127,71	95,57; 95,57; 102,27
Winkel (°)	62,9; 82,9; 84,2	90,0; 101,2; 90,0	90,0; 96,06; 90,0	83,85; 83,34; 90,30	90,0; 92,91; 90,00	90,0; 90,0; 90,0
Auflösungsbereich (Å)	30 – 1,59	30 – 1,49	30 – 2,21	30-1,6	43,23-1,91	29,0-2,9
Höchste Auflösungsschale(Å)	1,69 – 1,59	1,58 – 1,49	2,31 – 2,21	1,7-1,6	2,03-1,91	3,0-2,9
Rmerge (%)	3,4 (33,3)	4,7 (64,4)	8,1 (22,9)	2,9(41,3)	6,9 (64)	7,5 (98,2)
I / σ	17,8 (2,0)	19,0 (2,2)	14,2 (3,4)	16,33(2,0)	13,86 (1,9)	18,41 (1,5)
Vollständigkeit (%)	89,3 (54,3)	98,3 (90,0)	96,8 (78,5)	94,5(93,7)	99,4(99,1)	98,5(96,5)
Multiplizität	2,8 (1,4)	4,2 (4,0)	4,6 (1,9)	2,0 (2,0)	3,08 (3,04)	3,8(3,3)
Lösungsmittelgehalt/ F _{ab} pro ASE	41%/2	49 % / 2	45 % / 1	41,7 % /1	48,0 %/2	47,9/2
Datenprozessierung	XDS	XDS	XDS	XDS	XDS	XDS
verwendetes Model für ME	1ZEA	1ZEA	2DQT	c#17	c#17	c#6/Aβ _{pE3} - 12PEGb- Komplex ohne Ligand
Verfeinerungsstatistik						
Verwendetes Program zum Bauen der Struktur	COOT	phenix.autobuild	COOT	COOT	COOT	COOT
Verfeinerung	phenix.refine	phenix.refine	phenix.refine	phenix.refine	CCP4	phenix.refine
Validierung	MolProbity	MolProbity	MolProbity	MolProbity	MolProbity	MolProbity
Verfeinerungsstrategie	-	-	-	TLS	-	TLS, NCS, Twin*
Anzahl der Reflexe (work/test)	99419/ 4972	154378 / 7719	40700 / 2042	48636/ 2433	69055/ 3635	39466/ 1997
R _{work} /R _{free}	0,180 / 0,215	0,181 / 0,213	0,186 / 0,249	0,173/ 0,210	0,209/ 0,251	0,199/ 0,250
No. Atome						
Protein	6941	6776	3321	3346	6714	6091
Ligand	86	246	54	47		
Wasser	1157	1462	191	392	165	
B-Faktor (Å²)						
Protein	18,4	18,7	23,8	24,6	27,7	72,3
Ligand	35,4	26,25	26,2	25,5		
Wasser	29,8	31,5	26,1	34,3	25	
Bindungslängen r.m.s.d.	0,006	0,005	0,008	0,006	0,018	0,010
Winkel r.m.s.d.	0,86	0,83	0,988	0,86	1,9	1,540
Ramachandran plot: (% in bevorzugte/erlaubt/außerhalb Regionen)	97,7/2,2/0,1	98,2/1,7/0,1	97,5/2,5/0	98,6/1,4/0,0	96,8/3/0,2	93,0/6,2/0,8
MolProbity clashscore	4,58	2,38	5,74	3,31		21,47

*In der Verfeinerung wurde der Zwillingsoperator h, -k, -l berücksichtigt und ein Verzwilligungsanteil (*twin fraction*) von 0.5 ermittelt; TLS = *translation, liberation* und *screw*; NCS = nicht-kristallographische Verwandtschaft (non-crystallographic symmetry); wo = *without ligand*

Zu Ergebnisteil 3.3.2:

Tab.6.4: Mögliche nichtkovalente Interaktionen zwischen dem F_{ab}c#6 und A β _{pE3-12Pbio}

LC/HC	Seitenkette	Rückgrad	A β _{pE3-12}	Seitenkette	Rückgrad	Distanz (Å)
Wasserstoffbrücken						
LC Tyr37	OH		His6		C=O	3,00 -H ₂ O- 2,78
LC Asn39	NH ₂		Phe4		C=O	2,94
LC Gly96		C=O	Arg5	NH		2,80
LC Thr97		C=O	Arg5	NH ₂		2,89
HC Asn35	C=O		Ser8	OH		2,81-H ₂ O-2,39
HC Asn52	NH ₂		Gly9		C=O	2,95
HC Thr97	OH		pGlu3	C=O		2,62
HC Glu99	C=O		pGlu3	N-H		2,66
	C-O ⁻		Arg 5		NH	2,99
	C-O ⁻		Phe4		NH	2,88
	C-O ⁻		Ser8	OH		2,86-H ₂ O-2,39
HC Ala 100		C=O	Asp7		NH	2,83
hydrophobe Interaktionen						
LC Val94	x		Phe4	x		3,56
(LC Phe101	x		Phe4	x		4,77)
LC Phe103	x		Phe4	x		3,44
LC Tyr31	x		Arg5	x		4,30
LC Tyr37	x		Arg5	x		3,90
HC Val37	x		Phe4	x		3,84
HC Trp47	x		Phe4	x		4,10
HC Trp109	x		Phe4	x		4,39

Tab.6.5: Mögliche nichtkovalente Interaktionen zwischen dem F_{ab}C#24 und Aβ_{pE3-18}

LC/HC	Seitenkette	Rückgrad	Aβ _{pE3-12}	Seitenkette	Rückgrad	Distanz (Å)
Wasserstoffbrücken						
LC Lys 35	NH ₃ ⁺		Asp7	C-O ⁻		2,70
LC Tyr 37	OH		As7	C=O		2,58
LC Asn39	NH ₂		pGlu3		C=O	2,87
	NH ₂		Phe4		C=O	2,95
	C=O		His6		NH	2,90-H ₂ O-3,0
LC Gly96		C=O	Arg5		NH	2,43
LC Thr97		C=O	Arg5	NH ₂		3,09
HC Trp33	NH		Ser8		C=O	2,91
HC Asn35	NH ₂		pGlu3	C=O		3,01
HC Gln50	C=O		Ser8	OH		3,03-H ₂ O-2,83
HC Glu99	C=O		Phe4		NH	2,87
	C=O		Arg5		NH	2,86
	C-O ⁻		pGlu3	NH		2,87
hydrophobe Interaktionen						
LC Val94	x		Phe4	x		3,30
LC Phe101	x		Phe4	x		3,70
LC Phe103	x		Phe4	x		3,83
HC Val 37	x		Phe4	x		4,33
HC Trp 47	x		Phe4	x		3,42
HC Trp 105	x		Phe4	x		4,39
H-pi Interaktionen						
LC Tyr37	6-Ring (π-H)		Arg5	C _v		4,28
LC Tyr54	CD2 (H-π)		His6	5-Ring		3,70
HC Tyr101	6-Ring (π-H)		His6	NH		3,46
Ionische Wechselwirkung						
LC Lys 35	NH ₃ ⁺		Asp7	C-O ⁻		2,70

Zu Ergebnisteil 3.3.5:

Tab.6.6: Mögliche nichtkovalente Interaktionen zwischen dem F_{ab}C#17 und A β _{pE3-12Pbio}

LC/HC	Seitenkette	Rückgrad	A β _{pE3-12}	Seitenkette	Rückgrad	Distanz(Å)
Wasserstoffbrücken						
HC Ser52	OH		Asp 7	C-O ⁻		2,49
HC Asn53	C=O		Asp7		NH	2,71
	NH ₂		Asp 7		C=O	2,87
HC Leu54		NH	Asp7	C-O ⁻		2,82
HC Tyr56		NH	Asp7	C-O ⁻		3,32
HC Ser57	OH		Arg5		C=O	2,56-H ₂ O-2,55
			Asp7	C=O		2,56-H ₂ O-2,62
HC Tyr99	OH		pGlu3	C=O		2,71
HC Ile104		C=O	Arg5	NH ₂ ⁺		3,14
			His6		NH	2,96
HCAsp106	C=O	C=O	pGlu3	NH		2,70
			His 6	NH		2,79
			Phe4		C=O	2,74
hydrophobe Interaktionen						
LC Val99	x		Phe4	x		4,02
LC Pro101	x		Phe4	x		3,80
(HCTrp47	x		Phe4	x		4,94)
HCPhe50	x		Phe4	x		3,99
HCLeu105	x		pGlu3	x		4,30
π-π-Interaktionen						
HCPhe50	6-Ring		Phe4	6-Ring		3,99
HCTyr101	6-Ring		His6	5-Ring		3,79

Zu Ergebnisteil 3.3.7

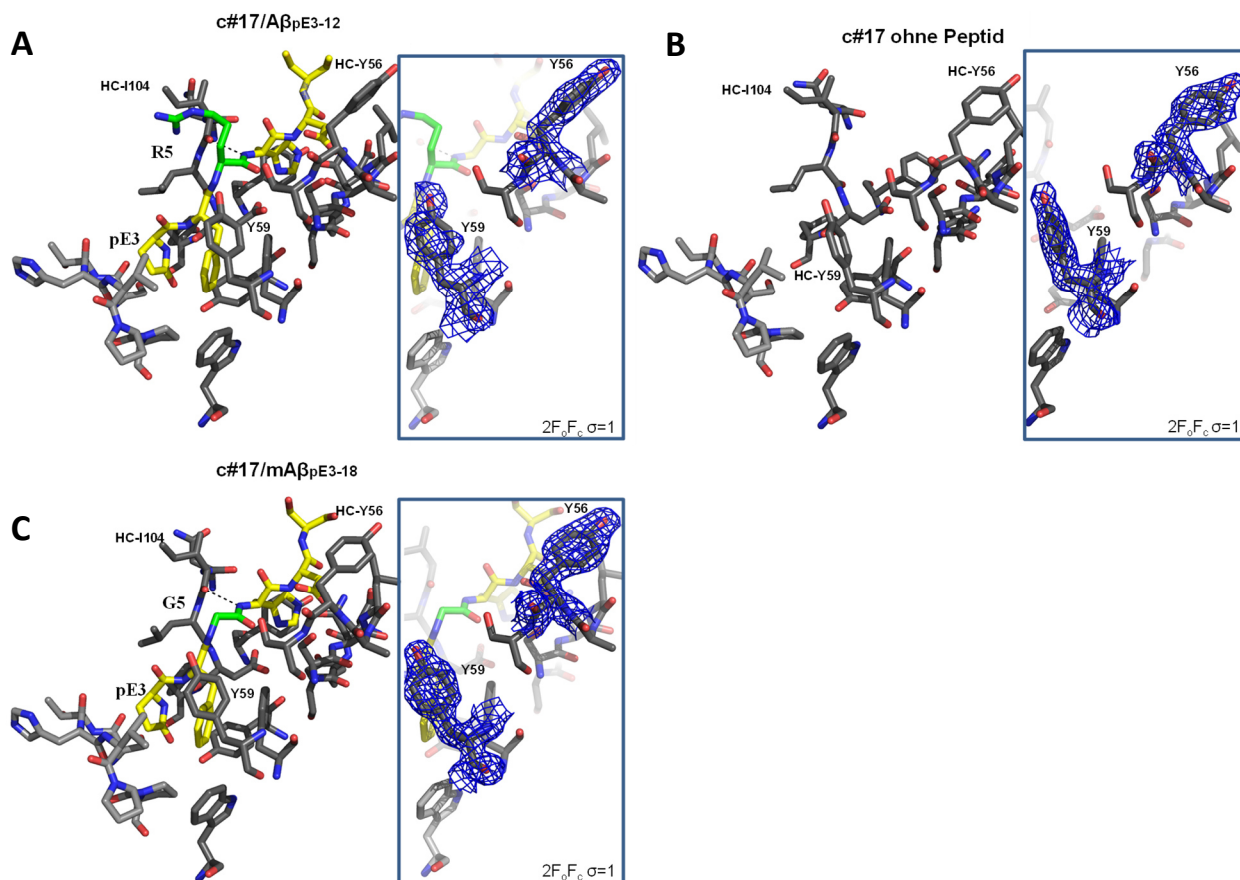


Abb. 6.8: Bindetasche des Antikörper F_{ab}-Fragments c#17 mit und ohne A β -Ligand

A) F_{ab} c#17/A β pE3-12-Komplex. Position der Substitution ist grün markiert. B) F_{ab} c#17 ohne Ligand. C) F_{ab} c#17/mA β pE3-18-Komplex. Die 2F_oF_c-Dichte konturiert mit $\sigma=1.0$ der Tyrosine 56 und 59 der HC ist gezeigt. Die Orientierung des Tyr56 in A) und Tyr59 in B) wird durch Kristallkontakte (hier nicht gezeigt) beeinflusst.

Zu Ergebnisteil 3.4.2

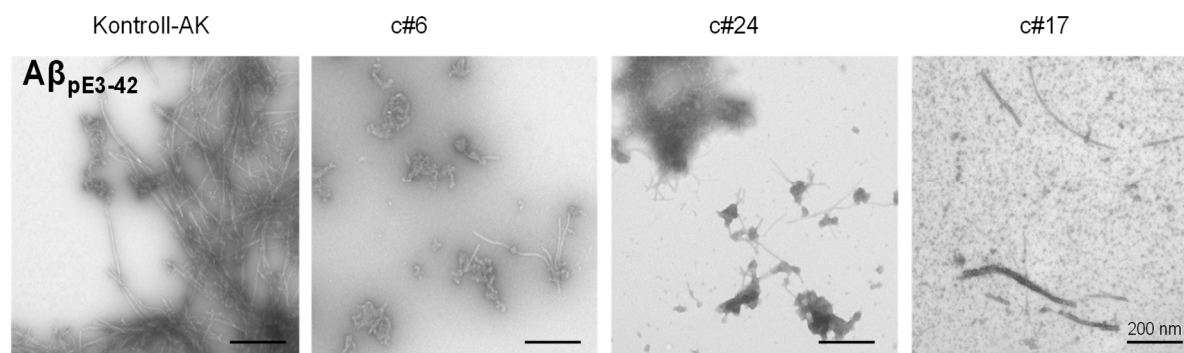


Abb.6.9: TEM-Analyse der A β pE3-42-Fibrillen (10 μ M) unter Zugabe von 4 μ M A β pE3-spezifischen AK

A β pE3-42 wurde mit dem Kontroll-AK bzw. mit den A β pE3-spezifischen AK c#6, c#24 und c#17 in einem molaren Verhältnis von 1:2.5 AK/A β -Peptid inkubiert. Die gebildeten Fibrillen bzw. Fragmente wurden mittels TEM analysiert und sind hier in einer 50 000 fachen Vergrößerung repräsentiert.

6.4 Publikationsliste

Piechotta, A., Parthier C., Kleinschmidt M., Gnoth K., Pillot T., Lues I., Demuth H.-U., Schilling S., Rahfeld J.-U. and Stubbs M.T. Structural and functional analyses of pyroglutamate-A β -specific antibodies as a basis for Alzheimer immunotherapy. Eingereicht in *The Journal of Biological Chemistry* am 31.01.2017; Manuskript ID#: JBC/2017/777839

Patent (Proprietätsanmeldung):

Rahfeld, J., Gillies S., Piechotta A., Schilling S., Kleinschmidt M. (2015) (Probiodrug AG) Humanized antibodies. Eingereicht am 16.07.2015. *application number*: US 62/193356

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Milton T. Stubbs für die Möglichkeit, meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können. Besonders möchte ich mich bei Ihm bedanken, dass ich meine bereits begonnene Promotion bei Ihm fortführen durfte und somit die Methode der Röntgenkristallstrukturanalyse erlernen konnte. Ich danke ihm ebenfalls sehr herzlich dafür, dass aus der kreativen Zusammenarbeit eine tolle „Geschichte“ entstanden ist. Ebenso möchte ich mich bei der Graduiertenförderung des DFG Graduiertenkolleg 1026 – *Conformational transition in macromolecular interactions*- für die Gewährung eines Stipendiums zur finanziellen Unterstützung meiner Dissertation bedanken.

Ich möchte mich ebenfalls ganz besonders bei Herrn Prof. Hans-Ulrich Demuth für die Aufnahme in seiner Firma Probiodrug und die Überlassung eines sehr interessanten Dissertationsthemas bedanken. Nach einer unvorhersehbaren Entwicklung des Unternehmens wurde meine Arbeitszeit frühzeitig beendet, allerdings ermöglichte mir Herr Prof. Demuth, mein Dissertationsthema in die Arbeitsgruppe von Prof. Stubbs zu nehmen, um es dort zu Ende zu bringen. Für dieses Vertrauen, das er in mich gesetzt hat, bin ich sehr dankbar.

Ich möchte mich bei der Arbeitsgruppe von Probiodrug für das herzliche Arbeitsklima und die vielseitige Unterstützung bedanken. Ganz besonderer Dank geht dabei an meinem Betreuer Herrn Dr. Jens Rahfeld für die vielseitige Diskussionsbereitschaft zu wissenschaftlichen Fragestellungen. Mit seiner freundlichen, ruhigen Art war es mir stets eine Freude, an die Arbeit zu gehen. Ebenfalls danke ich Herrn Dr. Stephan Schilling für die vielen Gedankenanstöße und seiner wissenschaftlichen Hilfestellung in „*Paperfragen*“. Darüber hinaus möchte ich mich bei vielen Mitarbeitern bedanken, die mir die Erlernung unterschiedlicher Methoden erleichtert haben und mir dadurch die Möglichkeit gegeben haben, selbstständig und wissenschaftlich kreativ sein zu dürfen. Ich bedanke mich darüber hinaus zum einen bei Frau Anka Thümmeler für ihre optimistischen Herangehensweisen, Dinge auch mal aus einer anderen Perspektive zu betrachten. Ein weiterer Dank gilt Frau Dr. Nadine Taudte und Frau Dr. Kathrin Gnoth für ihre lebhaften Gespräche als auch Herrn Dr. Martin Kleinschmidt für die Hilfe in thermodynamischen Fragestellungen.

Gleichermaßen möchte ich mich bei der AG Stubbs für die willkommene Aufnahme in ihrer Arbeitsgruppe bedanken. Die gemeinsame Arbeitszeit als auch die Arbeitsgruppenausflüge nach Krumhennersdorf und Naumburg haben uns zusammenwachsen lassen. Ich danke besonders Herrn Dr. Christoph Parthier für die Unterstützung bei der Auswertung der Datensätze sowie

deren Diskussion und Frau Dr. Constanze Breithaupt für das Korrekturlesen der kristallographischen Themengebiete in meiner Dissertation.

Ich möchte mich ebenfalls bei Herrn PD Dr. Ralph Golbik für das Korrekturlesen meiner Arbeit bedanken und für die vielen wertvollen Tipps und guten Ratschläge, die meinen Werdegang beeinflusst haben. Ein weiterer Dank geht an Herrn Dr. Dr. Gerd Hause für die Unterstützung bei der Erstellung der Elektronenmikroskopiebilder.

Ich danke meiner Familie und meinen Freunden für die vielen Ermunterungen, für die Kraft und Ausdauer, die sie in mich gesteckt haben und besonders ihrer Treue, immer an meiner Seite zu sein. Ich möchte mich bei meinen Eltern Petra und Peter Piechotta bedanken und bei meiner Schwester Maike Richter für eine so friedvolle und gleichzeitig lebendige Kindheit, für ihre Geduld und für die immerwährend schöne Zeit als Familie. Ich danke meinen Großeltern Verena und Hans Schindler für die vielen gemeinsamen Momente, um zur Ruhe kommen zu dürfen und neue Kreativität zu entfalten. Ganz besonders danke ich meinem René und meiner Tochter Fiona für ihre stetige Begeisterung, ihre großartige Fantasie und ihre Liebe. Ihr lasst mich stets erkennen, wer ich wirklich bin.

Vielen Dank.

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit „Charakterisierung von Antikörpern gegen das Pyroglutamat-3-Amyloid-beta Peptid ($A\beta_{pE3}$ -Peptid) als Voraussetzung für eine potentielle Anwendung in der Alzheimer Immuntherapie“ erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe, die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Anke Piechotta

Halle (Saale), 28.02.2017

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname: Piechotta, Anke
 Geburtsdatum/-ort: 09.04.1985 / Burg
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Familienstand: ledig
 Kind: 1, geboren Mai 2013
 Anschrift: Bernhardstr. 20 / 06110 Halle (Saale)

Ausbildung

seit 02/2015 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Fraunhofer Institut für Zelltherapie und Immunologie, IZI Leipzig (Abteilung für Molekulare Wirkstoffbiochemie und Therapieentwicklung, Halle)

05/2012 – 01/2015 Wissenschaftlicher Mitarbeiter
 in der Arbeitsgruppe Prof. Stubbs am Institut für Biochemie und Biotechnologie – physikalische Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Fortführung der Promotion in Kooperation mit der Firma Probiodrug (Halle)
Dissertationsthema: Charakterisierung von Antikörpern gegen das Pyroglutamat-3-Amyloid-beta Peptid (A β pE3-Peptid) als Voraussetzung für eine potentielle Anwendung in der Alzheimer Immuntherapie.

11/2010 – 04/2012 Beginn der praktischen Arbeit zur Promotion
 (Dissertationsthema siehe oben, durch Prof H.-U. Demuth)
 in der Abteilung Molekularbiologie der Firma Probiodrug (Halle)

-
- 09/2009-10/2010 Wissenschaftlicher Mitarbeiter
in der Arbeitsgruppe Prof. Behrens am Institut für Biochemie
und Biotechnologie- Mikrobielle Biotechnologie der Martin-
Luther-Universität Halle-Wittenberg
Thema: Interaktionsstudie von NOD1, einem intrazellulären
Sensor für mikrobielle Infektionen, mit dem an der HCV-
Replikation beteiligten Wirtsfaktor NF90.
- 06/2009 Diplom in Biologie
in der Arbeitsgruppe Prof. Behrens am Institut für Biochemie
und Biotechnologie- Mikrobielle Biotechnologie der Martin-
Luther-Universität Halle-Wittenberg
Thema: Analysen zur Regulation der Zyklisierung viraler RNA
als Voraussetzung für die Replikation verschiedener Viren aus
der Familie *Flaviviridae*.
- 10/2004 – 06/2009 Studium der Biologie, Martin-Luther-Universität Halle-
Wittenberg
- 07/2004 Abitur
- 08/1995 – 07/2004 Domgymnasium Merseburg
- 08/1991 – 07/1995 Grundschule Rosental Merseburg

Anke Piechotta

Halle, den 28.02.2017