

Aus dem Institut für Neuropathologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Guido Reifenberger

Generierung und Charakterisierung von Alzheimer-Antikörpern
gegen Amyloid- β im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Aaron Raphael Zittlau

2022

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Carsten Korth

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Michael Sabel

Gewidmet meinen Eltern.

Zusammenfassung Deutsch

Neben den klinischen Charakteristika wie Verlust mnestischer und kognitiver Fähigkeiten finden sich bei Morbus Alzheimer distinkte histopathologische Veränderungen. Fokus der Untersuchungen liegt hierbei auf dem Amyloid- β -Protein ($A\beta$), welches der Amyloid-Kaskaden-Theorie nach zufolge durch Aggregation über Oligomere zur Bildung von extrazellulären Plaques und letztendlich Inflammation neuronalen Gewebes und dessen Untergang führen soll. Es zeigte sich, dass die Quantität der unlöslichen Plaques nicht mit dem klinischen Ausmaß der Erkrankung korreliert. Viel mehr fanden sich lösliche $A\beta$ -Spezies, deren Auftreten mit neurotoxischen Prozessen einhergeht. Die kleinste Einheit unter den löslichen $A\beta$ -Oligomeren stellen die $A\beta$ -Dimere dar. Ziel dieser Arbeit war es, Antikörper gegen $A\beta$ bzw. konformationsspezifische Antikörper gegen $A\beta$ -Dimere zu generieren. Nach Immunisierung zweier Mäuse mit zuvor stabilisiertem S8C- $A\beta$ -Dimer erfolgte die Generierung immortalisierter antikörperproduzierender Hybridomazellen. Insgesamt konnten aus der Fusion 490 Klone gewonnen werden, worunter in einem ersten Screening mittels ELISA 115 auf $A\beta$ -Dimer positiv reagierende identifiziert werden konnten. Zur Differenzierung zwischen konformationsspezifischen und -unspezifischen Antikörpern erfolgten weitere Testungen mittels ELISA. Drei der monoklonalen Antikörper (4H8, 7A12, 17F4.G9) mit der auffälligsten Bindungsstärke wurden genauer auf ihre Eigenschaften untersucht. 4H8 und 7A12 zeigten in der Immunpräzipitation (IP) eine spezifische Affinität zu dimerem S8C- $A\beta$. Im direkten $A\beta$ -Nachweis zeigten die Klone für synthetisches $A\beta$ eine unspezifische Bindung, wobei 4H8 eine höhere Affinität für dimeres und 7A12 eine höhere Affinität für monomeres $A\beta$ besaß. Bei zellulär sekretiertem $A\beta$ zeigte sich eine spezifische Bindung an monomeres $A\beta$. Ursächlich hierfür können posttranslationale Modifikationen am $A\beta$ sein oder auch die Freilegung von zuvor verdeckten Epitopen durch Denaturierungsprozesse. 17F4.G9 zeigte sowohl in der IP als auch im direkten $A\beta$ -Nachweis eine unspezifische Bindung an $A\beta$ -Monomere und -Dimere. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Zielsetzung der Arbeit grundlegend erfüllt wurde. Weitere Untersuchungen der Klone und Wiederholungen von Testungen sind weiterhin von Nöten, wobei diese durch eine *per se* gegebene Instabilität der Klone und irreversible Verluste bei Subklonierungen einer natürlichen Limitation unterliegen. Diese Antikörper könnten als medizinische Biomarker diagnostisch zum frühzeitigen Nachweis einer Alzheimererkrankung oder therapeutisch zur Limitation der Erkrankung eingesetzt werden. Des Weiteren ist es möglich die funktionale Bedeutung der $A\beta$ -Dimere im Verlauf der Alzheimererkrankung zu definieren.

Abstract English

Next to clinical characteristics as loss of mnemonic and cognitive functions as well as progressive decline in the ability of handling everyday life, there are distinct histopathological hallmarks in Alzheimer's disease, the most common cause of dementia. The focus of research regarding these is lying on the amyloid- β -protein ($A\beta$). A protein which, according to the amyloid-cascade-theory, leads through fibril aggregation into oligomers to insoluble $A\beta$ -plaque formation and inflammation and damage of neurological tissue. It was shown that the quantity of insoluble plaques did not correlate with the clinical extent of the disease. However, the presence of newly found soluble toxic $A\beta$ -species correlates with neurotoxic processes. The smallest unit among the $A\beta$ -species are $A\beta$ -dimers. Goal of this thesis was firstly to generate antibodies against $A\beta$ and secondly conformation specific antibodies against S8C- $A\beta$ -dimers. After immunizing two mice with stabilized S8C- $A\beta$ -dimers, their splenocytes were fused with melanoma cells to generate immortalized antibody producing hybridoma cells. Overall, 490 clones were won. Among these, 115 were tested positive for S8C- $A\beta$ in a first screening ELISA. For further differentiation between conformation specific and non-specific antibodies additional ELISA tests were performed. Three monoclonal antibodies (4H8, 7A12, 17F4.G9) with exceptional affinity were selected and further characterized. 4H8 and 7A12 showed a specific affinity to S8C- $A\beta$ in immunoprecipitations (IPs). In tests where $A\beta$ is directly detected by the clones, a non-specific binding affinity to synthetic $A\beta$ was shown. Yet, 4H8 showed a higher affinity to dimers, while 7A12 showed a higher one for monomers. In the same procedure done with cellular secreted $A\beta$ both clones showed a specific affinity to monomeric $A\beta$. This might be a result of posttranslational modification or due to protein denaturation where covered epitopes could be exposed. 17F4.G9 showed a non-specific binding to $A\beta$ -monomers and -dimers in IPs as well as in direct detection experiments of $A\beta$. In conclusion, the main goal of this thesis was basically fulfilled. Supplementary characterizations, e.g. epitope mapping, or repetition of experiments are still necessary. However, this might be subjected to a natural limitation due to a given instability of the clones or an irreversible loss while subcloning. The antibodies might help as a diagnostic or therapeutic tool do detect Alzheimer's disease in an early stage or to limit the progress all in all. Furthermore, they might lead to better understanding of the functional role of $A\beta$ during the course of Alzheimer's disease.

Abkürzungsverzeichnis

Aβ	Amyloid- β Protein
Aβ-S8C	dimeres Amyloid- β Protein, mit Disulfidbrücke durch Cystein-Mutation an Position 8
Aβ-wt	Amyloid- β Protein, Wildtyp
Abb.	Abbildung
ADAM	<i>A desintegrin- and mettalloproteasis</i>
ADDL	<i>Aβ-derived diffusable ligand</i>
AICD	<i>APP-intracellular domain</i>
APOE	Apolipoprotein E
APP	<i>Amyloid Precursor Protein</i>
APP-wt	Amyloidvorläuferprotein, aus dem Amyloid- β vom Wildtyp entsteht
APP-S8C	Amyloidvorläuferprotein, aus dem dimeres Amyloid- β mit Cystein-Mutation an Position 8 entsteht
Asp	Aspartat
A.U.	<i>Absorbance Unit</i>
BACE1	<i>Beta-site-APP-cleaving enzyme 1</i>
Bio.	Billion
BSA	Bovines Serumalbumin
CERAD	<i>Consortium to establish a registry for Alzheimer's disease</i>
CTF α/β	C-terminales Fragment α/β
CHO	<i>Chinese ovary hamster</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ELIFA	<i>Enzyme-linked immunosorbent filtration assay</i>
EUR	Euro
F_{ab}	antigenbindendes Fragment
F_c	kristallisierendes Fragment
FCS	fetales Kälberserum
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
haPrP	Hamster Prion-Gen
HSA-Aβ	an humanes Serumalbumin gekoppeltes Amyloid- β
HT	Hypoxanthin/Thymidin
Ig	Immunglobulin

IgA	Immunglobulin der Klasse A
IgD	Immunglobulin der Klasse D
IgE	Immunglobulin der Klasse E
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IgM	Immunglobulin der Klasse M
IP	Immunpräzipitation
i.v.	intravenös
kDa	Kilodalton
kgKG	Kilogramm Körpergewicht
KO	<i>Knock-Out</i>
LTD	Langzeitdepression
LTP	Langzeitpotenzierung
M.	Morbus
mAk	monoklonaler Antikörper
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
n	Anzahl der Versuche
NF	Neurofibrille
NMDA	N-methyl-D-Aspartat
LANUV	Landesamt für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz
NTE-Aβ	<i>N-terminally extended amyloid-β</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PET	Positronenemissionstomographie
POD	Peroxidase
PrnP	Prion-Protein
PSEN1	Presenilin 1
PSEN2	Presenilin 2
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
sAPP α/β	lösliches Amyloid- β -Protein α/β
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TACE	<i>Tumor necrosis factor-α converting enzyme</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Morbus Alzheimer	1
1.2	Senile Plaques, Beta Amyloid und das Amyloid Precursor Protein.....	3
1.3	A β -Monomere, Oligomere und Fibrillen – Die A β -Spezies	5
1.4	Die Amyloid-Kaskaden Theorie.....	8
1.5	Monoklonale Antikörper	9
1.6	Proteinkonformationen	11
1.7	Therapieansätze des Morbus Alzheimer.....	12
1.8	Zielsetzung dieser Arbeit.....	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Aktenzeichen des LANUV NRW und der ZETT.....	16
2.2	Material.....	16
2.3	Fusion	20
2.4	Züchten der Klone	20
2.5	Subklonieren.....	21
2.6	Einfrieren und Lagerung der Klone.....	22
2.7	ELISA.....	22
2.7.1	Beschichten der ELISA-Platten.....	23
2.7.2	Durchführung ELISA	23
2.8	Gewinnung zellulär sekretierten A β s	25
2.9	Splitten der CHO-Zellen.....	26
2.10	Immunpräzipitation	27
2.11	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	29
2.12	Stripe-Verfahren/Direkter A β -Nachweis.....	30
2.13	Western Blot.....	31
2.14	IgM-Aufreinigung aus Hybridoma-Medium.....	33
2.15	Isotypisierung des Antikörpers.....	35
2.16	Durchführung von Hirnschnitten.....	35
3	Ergebnisse.....	38
3.1	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	38
3.2	Detektierung A β ₄₂ -S8C-Dimer-sensitiver Klone	39
3.3	Differenzierung zwischen A β -Dimer-spezifischen und non-spezifischen Antikörpern.....	40

3.4	Selektion der prominentesten Klone.....	41
3.5	Immunpräzipitation	42
3.6	Direkter Nachweis von synthetischen und zellulären A β -Spezies	42
3.7	Hirnschnitte	43
3.8	4H8	44
3.8.1	Isotypisierung des Antikörpers.....	44
3.8.2	Immunpräzipitation	44
3.8.3	Stripe-Verfahren	45
3.9	7A12	46
3.9.1	Isotypisierung des Antikörpers.....	46
3.9.2	Immunpräzipitation	46
3.9.3	Stripe-Verfahren	47
3.10	17F4.G9.....	47
3.10.1	Isotypisierung	47
3.10.2	Immunpräzipitation	48
3.10.3	Stripe-Verfahren	49
4	Diskussion.....	50
4.1	Generierung und Screening von monoklonalen Antikörpern auf der Suche nach A β -Dimer spezifischen Antikörpern.....	50
4.2	Immunhistologie.....	51
4.3	4H8 und 7A12	51
4.4	17F4.G9	53
4.5	Instabilität bei Fusion und Subklonierungen.....	54
4.6	Fazit	55
5	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	56
6	Anhang.....	67

1 Einleitung

1.1 Morbus Alzheimer

Demenzen sind Krankheiten, die klinisch durch den Verlust von Gedächtnis, höheren kognitiven Fähigkeiten und damit Einbußen im Alltagsleben gekennzeichnet sind [1]. Der häufigste Demenztyp ist Morbus (M.) Alzheimer (60-80%), gefolgt von vaskulärer Demenz (5-10%), Lewy-Body-Demenz (~5%) und Frontotemporale Demenz (~3%). Mischformen treten in bis zu ca. 50% der Demenzerkrankungen auf [2]. Es wird geschätzt, dass derzeit 40 Millionen Menschen weltweit an Morbus Alzheimer erkrankt sind und sich diese Zahl bis 2050 vervierfachen wird [3, 4]. Die durch Alzheimer entstandenen Gesamtkosten wurden für 2018 auf 1 Bio. EUR berechnet. Bis 2030 soll sich diese Summe verdoppeln [5].

Histologisch charakterisiert ist die Erkrankung durch das Auftreten von extrazellulären Plaques bestehend aus Amyloid- β -Protein ($A\beta$), zytoplasmatischen Neurofibrillen (NF) aus hyperphosphoryliertem Protein Tau sowie Untergang neuronalen Gewebes, vor allem der Hippocampus-Formation [6-8]. Neuropathologisch wird die Alzheimer-Erkrankung nach dem ABC-Schema bewertet und in Stadien eingeteilt. Anhand der Verteilung der $A\beta$ -Ablagerungen (Thal-Stadien I-V), der Verteilung der Neurofibrillen (Braak-Stadien I-VI) und der senilen Plaques (Einteilung nach CERAD (*Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease*)-Protokoll) wird der *ABC-Score* errechnet [9, 10]. Die Ablagerung von $A\beta$ erfolgt ausgehend vom Neocortex. Mit Voranschreiten der Erkrankung breiten sich die Ablagerungen auf den Allocortex (u.a. Bereich des Hippocampus), gefolgt von den diencephalen Kernen, dem Striatum und den cholinergen Kernen des basalen Frontalhirns aus. Zuletzt sind sowohl die Kerne des Hirnstamms als auch das Cerebellum von $A\beta$ -Ablagerungen betroffen [11]. Die Ausbreitung der Neurofibrillen erfolgt von transenthorhinalen Regionen über den enthorhinalen Cortex auf den Isocortex [12]. Die betroffenen Areale umfassen Hirnregionen, die essenziell für das Lernen und das Gedächtnis sowie zur Verarbeitung aufgenommener Informationen sind [13]. $A\beta$ -Ablagerungen finden sich ebenfalls in den kleinen Gefäßen der Meningen und des Cortex, zusammengefasst unter dem Begriff zerebrale Amyloidangiopathie [13].

Morbus Alzheimer wird nach Erkrankungsalter in eine *early-onset* (Erkrankungsalter <65 Jahre) und eine *late-onset* Form (Erkrankungsalter >65 Jahre) unterteilt. *Early-onset* Alzheimer tritt in <1% der Fälle auf, *late-onset* Alzheimer stellt mit >99% die weitaus häufigere Form der

Erkrankung dar [14]. Die *early-onset* Form oder auch familiäre Form des M. Alzheimer wird durch genetische Veränderungen ausgelöst. Bisher wurden autosomal-dominante Mutationen in den Genen *APP* (*Amyloid Precursor Protein*) auf Chromosom 21, *PSEN1* (Presenelin-1) auf Chromosom 14 und *PSEN2* (Presenelin-2) auf Chromosom 1 nachgewiesen, welche mit einer gesteigerten Amyloid- β -Produktion einhergehen [15-18]. Die Ätiologie der *late-onset* oder auch sporadischen Form beruht auf einer multifaktoriellen Genese, die noch nicht vollständig erfasst ist. Es haben sich einige nicht-veränderbare Risikofaktoren herauskristallisiert, die einen Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung nehmen [2]. Der Prozess des Alterns stellt einen der wichtigsten Risikofaktoren dar [19]. In verschiedenen Studien hat sich gezeigt, dass sowohl die Prävalenz als auch die Inzidenz mit dem Alter zunehmen [20, 21]. Die altersabhängige Prävalenz verdoppelt sich ab dem 65. Lebensjahr alle 5 Jahre. Die Inzidenz zeigt ein annähernd exponentielles Wachstum bis zum 85. Lebensjahr [22]. Ein starker genetischer Einflussfaktor ist das Apolipoprotein E (*APOE*)-Gen [23]. Das *APOE* ϵ 4-Allel ist der stärkste genetische Risikofaktor [24]. Heterozygoties Auftreten des *APOE* ϵ 4-Allels steigert das Risiko für Alzheimer um das Dreifache. Bei Homozygotie ist das Risiko um das 8- bis 12-fache gesteigert [25]. Weiterhin sinkt das Erkrankungsalter bei Trägern des *APOE* ϵ 4-Allels. Jedes Allel senkt das Erkrankungsalter um annähernd 10 Jahre. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei nicht-Trägern bei 84 Jahren, bei ϵ 4-heterozygoten Trägern bei 76 Jahren und bei homozygoten Trägern bei 68 Jahren. [24, 26]. *APOE* ϵ 4 stört zum einen die Spaltung von $A\beta$, zum anderen wird *APOE* ϵ 4 selbst in neurotoxische Fragmente gespalten [27, 28]. Es zeigt sich zusätzlich einen Einfluss auf verschiedene Signalwege, resultierend im Untergang von Gefäßen und der Blut-Hirn-Schranke [29]. Entzündungen im Hirngewebe stellen einen weiteren pathogenetischen Faktor dar [30]. In Bereichen von durch Entzündung aktivierter Glia erfolgt eine Hochregulierung des *Amyloid Precursor Protein* (*APP*) schneidenden Enzyms β -Sekretase, resultierend in höheren Mengen an $A\beta$ und $A\beta$ -Aggregaten [31]. Weitere veränderbare Faktoren beeinflussen das Risiko an Morbus Alzheimer zu erkranken. Dazu zählen vaskuläre Risikofaktoren [32], Diabetes mellitus Typ 2 [33], Tabakkonsum [34] und traumatische Hirnschädigung [35]. Protektiv wirken sich sowohl physische Aktivitäten [36] als auch kognitive Betätigung [37] und eine mediterrane Ernährung aus [38]. Eine gute Ausbildung [39] und ein gutes soziales Netzwerk [40] haben ebenfalls einen schützenden Einfluss.

1.2 Senile Plaques, Beta Amyloid und das *Amyloid Precursor Protein*

Senile Plaques sind eines der histologischen Kennzeichen von Morbus Alzheimer. Sie besitzen eine große Variabilität in ihrem Aussehen und ihrer Zusammensetzung. Klassische Plaques messen zwischen 10 – 200 µm im Durchmesser und setzen sich aus extrazellulären fibrillären und nicht-fibrillären Amyloid-β-Peptiden sowie zu einem geringeren Anteil aus degenerierten Axonen und Dendriten zusammen. Neben diffusen Ablagerungen gibt es Formationen mit einem zentralen Amyloid-Kern umgeben von Mikroglia und reaktiven Astrozyten [41-43]. Amyloide sind stark wasserunlösliche Aggregate aus ca. 6 – 10 nm großen Proteinfilamenten, die sich in verschiedenen Organen ablagern. Sie besitzen einen hohen Anteil an β-Faltblattstruktur, so dass sie stark congophil reagieren und im polarisierten Licht grün erscheinen [44]. Amyloid-β ist die vorrangige Komponente der senilen Plaques [45]. Es wurde 1984 im Gehirngewebe von Patienten mit Trisomie 21 und aus Blutgefäßen von Patienten mit Morbus Alzheimer zum ersten Mal isoliert [46, 47]. Es handelt sich um ein 4 kDa schweres und zwischen 39 und 43 Aminosäuren langes Peptid, das durch Spaltung des *Amyloid Precursor Protein* mittels β- und γ-Sekretase entsteht [48]. Sowohl unlösliches als auch lösliches Aβ ist ein physiologisches Produkt des Stoffwechsels [49]. Es findet sich neben dem Hirnparenchym im Liquor cerebrospinalis und zu geringer Menge im Plasma [50, 51]. Im Mausmodell zeigte sich Aβ essenziell für das Überleben der Hirnzellen [52] und beeinflusst Lernen und Gedächtnis [53]. Immunologische Effekte werden diskutiert [54]. Die Aufgaben von Amyloid-β sind noch nicht vollständig verstanden. Abgebaut wird es zentral über die Zink-Metalloproteasen *Insulin Degrading Enzyme*, *Neprilysin* und *Endothelin Converting Enzyme* [55]. Ein Teil von Amyloid-β wird über die Blut-Hirn-Schranke in die Peripherie transportiert [56]. Dort wird der Großteil über die Leber abgebaut, ein kleiner Teil über die Nieren [57]. Aβ besitzt einen amphipatischen Charakter. Das N-terminale Segment ist hydrophil, das C-terminale Segment hydrophob [58].

Das *Amyloid Precursor Protein* ist ein einfaches integrales Membranprotein des Typ 1 mit einem großen extrazellulären glykosylierten N-Terminus und einem kürzeren zytoplasmatischen C-Terminus [48]. Die Aβ-Sequenz findet sich in der Nähe des C-terminalen Ende [59]. APP kommt durch alternatives *Splicing* in unterschiedlichen Isoformen mit Längen zwischen 650 und 770 Aminosäuren vor [60-62]. Es nimmt Einfluss auf unterschiedliche neuronale Steuer- und Signalmechanismen [63]. Die Funktionsweise ist bisher noch nicht vollständig verstanden. Das entsprechende Gen liegt auf Chromosom 21 [48]. Dies kann das Auftreten von Alzheimer entsprechenden Pathologien in jungen Jahren von Menschen mit

Trisomie 21 durch eine gesteigerte Produktion und Ablagerung von β -Amyloid erklären [64]. APP wird von drei Enzymen gespalten (Abb. 1). Das Enzym α -Sekretase ist noch nicht vollständig identifiziert. Bisher erscheinen TACE (*Tumor Necrosis Factor- α Converting Enzyme*) oder membrangebundene Metalloproteasen der ADAM (*A Disintegrin And Metalloprotease*)-Familie am wahrscheinlichsten [65]. β -Sekretase, auch BACE1 (*Beta-site APP-Cleaving Enzyme 1*) genannt, ist ein integrales Membranprotein, welches als Aspartyl-Protease fungiert [66]. γ -Sekretase bildet einen intramembranständigen Proteasekomplex aus Presenilin, Nicastrin, PEN-2 und APH-1, der in verschiedenen Signalwegen involviert ist [67]. Die Spaltung erfolgt auf zwei verschiedenen Wegen. Im nicht-amyloidogenen Weg wird APP von α -Sekretase zwischen den Aminosäuren 16 und 17 innerhalb der A β -Sequenz gespalten. Dabei entstehen die Peptide sAPP α und C83. C83 wird entweder über Lysosomen abgebaut oder von der γ -Sekretase weiter in die Peptide p3 und C53 prozessiert. Es wird angenommen,

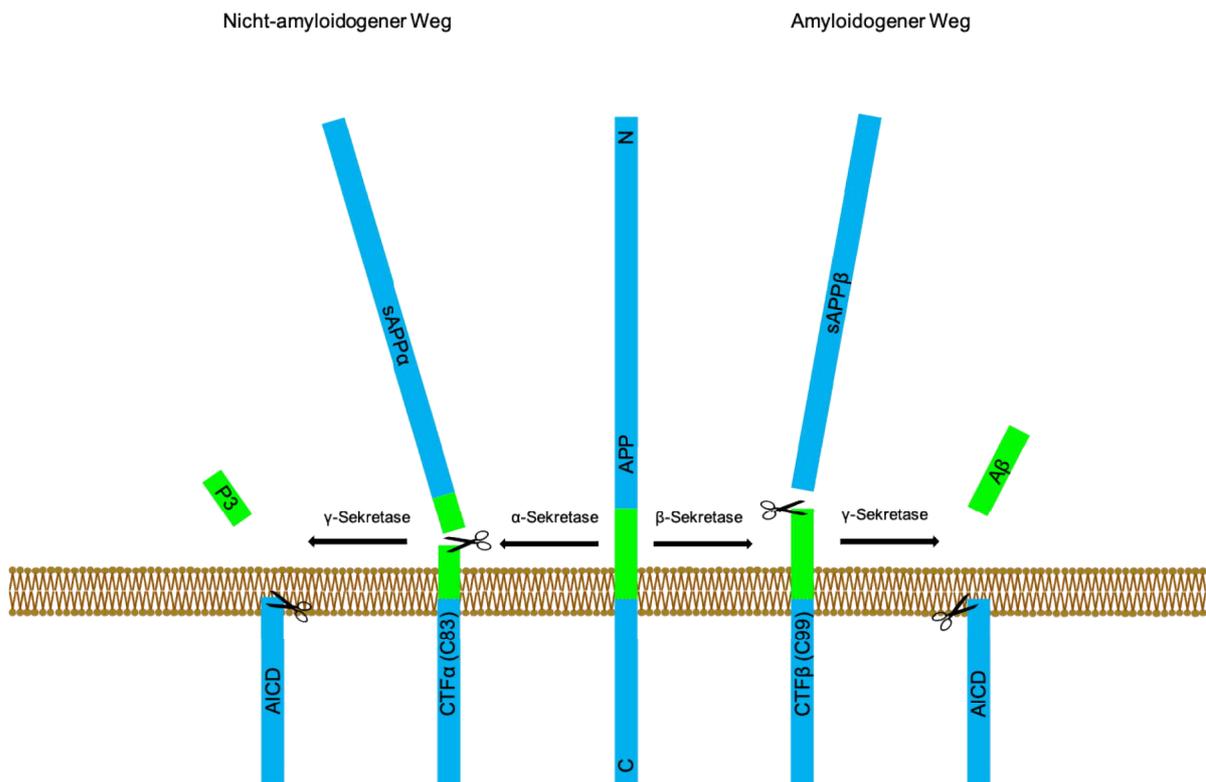


Abb. 1: Schematische Darstellung des amyloidogenen und nicht-amyloidogenen Wegs der APP-Spaltung. Das *Amyloid Precursor Protein* (APP) wird im nicht-amyloidogenen Pfad von der α -Sekretase innerhalb der A β -Sequenz geschnitten. Dabei entstehen die Peptidfragmente sAPP α und CTF α bzw. C83. Die γ -Sekretase zerschneidet CTF α in die Peptide P3 und AICD. Im amyloidogenen Weg wird APP zunächst von der β -Sekretase in sAPP β und CTF β bzw. C99 zerschnitten. A β wird durch die γ -Sekretase von CTF β abgespalten. Zurück bleibt AICD. A β , Amyloid- β ; APP, *Amyloid Precursor Protein*; AICD, *APP-Intracellular Domain*; C, C-Terminus; CTF α/β , *C-Terminal Fragment α/β* ; N, N-Terminus; sAPP α/β , *soluble Amyloid- β -Protein α/β* . Abbildung modifiziert nach Chen et al., 2017 [58]

durch das Zerschneiden innerhalb der Sequenz werde die Herstellung von funktionstüchtigem A β verhindert und somit die Wahrscheinlichkeit an einem Morbus Alzheimer zu erkranken verringert. Im amyloidogenen Weg wird APP zunächst von der β -Sekretase an Position 671 in sAPP β und C99 gespalten. C99 wird durch γ -Sekretase in A β_{40} , A β_{42} oder A β_{43} und die APP-intrazelluläre Domäne (AICD, engl. *APP-intracellular domain*) zerschnitten. Es wird vermutet, dass AICD eine Rolle bei der Regulierung der Genexpression einnimmt [68].

1.3 A β -Monomere, Oligomere und Fibrillen – Die A β -Spezies

Im Spaltprozess von APP entstehen unter anderem die Isoformen A β_{40} , A β_{42} und A β_{43} . Diese Isoformen unterscheiden sich in der Länge ihres C-Terminus, welcher Einfluss auf das Aggregationsverhalten nimmt [69]. Obwohl A β_{42} im Vergleich zu A β_{40} nur zu einem wesentlich geringeren Anteil produziert wird [70], aggregiert es deutlich schneller als A β_{40} [71] und bildet als unlösliche Amyloid-Fibrillen die Hauptkomponente der senilen Plaques [72, 73]. *In vitro* zeigte sich zunächst, dass unlösliche A β -Fibrillen, wie damals angenommen im Gegensatz zu A β_{40} - und A β_{42} -Monomeren, neurotoxisch auf hippocampale Zellkulturen einwirken [74, 75]. Dennoch wurde in mehreren Studien deutlich, dass das Vorkommen der Fibrillen bzw. Plaques nicht mit den klinischen Symptomen und den pathophysiologischen Vorgängen eines M. Alzheimer übereinstimmte. Zum einen korrelierte die Quantität der unlöslichen Plaques nicht mit dem kognitiven Defizit [76, 77], zum anderen fanden sich Plaques im Hirnparenchym von Menschen ohne alzheimerartige Symptome [78]. Weiterhin zeigte sich für fibrilläres A β *in vivo* nur eine schwache Korrelation in Bezug auf neuronalen Zelltod und den Verlust von Synapsen [79]. In verschiedenen Tier- und Zellmodellen konnte beobachtet werden, dass pathologische Veränderungen bereits vor Ablagerung der Plaques einsetzen [80, 81] und β -Amyloid unabhängig von Plaque-Bildung synaptotoxische Effekte besitzt [82]. Weiterhin zeigte sich bis heute, dass auch A β -Monomere durch pathophysiologische Prozesse, z.B. Induktion von BACE1 oder Eingriffe in den Tau-Stoffwechsel, neurotoxisch wirken [83]. Der Schwerpunkt der Forschung verschob sich von A β -Fibrillen zu löslichen A β -Oligomer-Spezies. Definiert werden diese im Allgemeinen durch ihre Eigenschaft, in wässrigen Puffern löslich zu sein und sich nicht durch Ultrazentrifugation herabsedimentieren zu lassen. Lösliche A β -Oligomere wirken neurotoxisch. Sie hemmen die Langzeitpotenzierung und die neuronale Plastizität [84]. Ihr Ausmaß korreliert mit der Schwere der Neurodegeneration sowie dem kognitiven Defizit [85-87]. Auf dem Weg, die löslichen

Amyloid- β -Formationen besser zu charakterisieren, wurden mehrere Entitäten beobachtet. Sie variieren in Masse und Molekularstruktur. 1977 wurden die A β -Protofibrillen entdeckt [88]. Sie sind die Vorstufe der A β -Fibrillen und sind im Vergleich kürzer und schmaler, besitzen eine β -Faltblattstruktur und binden Congorot und Thioflavin [89]. Niedermolekulare A β -Oligomere und A β -Protofibrillen stehen in einem chemischen Gleichgewicht, während die finale Bildung von Fibrillen einen irreversiblen Vorgang darstellt [90]. In *in vitro* Experimenten ließ sich die Neurotoxizität von A β -Oligomeren nachweisen. A β -Protofibrillen zeigten eine ähnliche biologische Aktivität wie reife A β -Fibrillen [91]. 1986 wurden *in vitro* unter Hemmung der Fibrillogense kleine globuläre Oligomere (*A β -Derived Diffusible Ligands*, ADDL) entdeckt [92]. ADDLs wirken in nanomolarer Menge neurotoxisch und inhibieren die Langzeitpotenzierung im Hippokampus [93]. Unter dem Elektronenmikroskop konnten ringförmige A β -Oligomere aus synthetischem β -Amyloid beobachtet werden [94]. Neben den *in vitro* generierten synthetischen A β -Spezies, wurden weitere A β -Entitäten in *in vivo* Experimenten entdeckt. In Hirnhomogenaten von tg2576-Mäusen fand sich ein A β -Dodecamer (A β *56), welcher in Untersuchungen das Gedächtnis von Ratten inhibiert [95]. Tg2576-Mäuse überexprimieren eine mutierte Form von APP₆₉₅ und gehen mit stark erhöhter Amyloid- β - und Plaque-Ablagerung einher [96]. In Zellkulturen mit endogenem transfizierten APP ließen sich stabile Dimere und Trimere im Zellüberstand nachweisen [97, 98]. Diese niedermolekularen Oligomere inhibierten ebenfalls die Langzeitpotenzierung in Ratten [99]. Die kleinste lösliche und toxische Oligomer-Einheit bilden die Dimere. Aus dem Gehirn von Alzheimer-Patienten extrahierte natürlich sekretierte A β -Dimere zeigen neben der Inhibition der Langzeitpotenzierung (LTP, engl. *Long-Term Potentiation*) eine Steigerung der Langzeitdepression (LTD, engl. *Long-Term Depression*) und eine Reduktion der dendritischen Dornenfortsätze [100], äquivalent dem Verlust der Synapsenfunktion bzw. der kognitiven Einschränkung [77]. Mehrere Studien kamen zu dem Ergebnis, dass lösliche A β -Dimere ausreichend toxisch seien und als mögliche Initiatoren der Amyloid-Kaskade in Betracht kämen [100-102].

Bei der genaueren Untersuchung von löslichen A β -Dimeren offenbarten sich mehrere Probleme. Im Vergleich von synthetischem zu natürlich sekretiertem Amyloid- β zeigten sich deutliche Unterschiede in der Reinheit und Toxizität. Natürliches A β besitzt eine 100fach höhere biologische Aktivität in Bezug auf die Inhibition der LTP als synthetisches A β [103]. Synthetisches A β bildet im Herstellungsprozess unterschiedliche Konformationen aus, die mit unterschiedlichen Toxizitäten einhergehen [104]. Natürlich sekretiertes A β weist aufgrund einer geringen Menge im nanomolaren Bereich sowie einer starken Kontrolle durch verschiedene Co-

Faktoren eine geringere unspezifische Aggregation und somit einen höheren Reinheitsgrad auf. Zusätzliche Herausforderungen bilden die Herstellung und das Experimentieren mit natürlich sekretiertem β -Amyloid. Der Herstellungs- bzw. Extraktionsprozess ist aufwendig. Die Menge in Gehirnen verschiedener transgener Mausmodelle oder in menschlichen Alzheimer-Gehirnen ist gering [105]. Und $\text{A}\beta$ -Oligomere stehen mit ihren Konformeren im Gleichgewicht, so dass keine große Menge an reinem $\text{A}\beta$ -Dimer generiert werden kann [106]. Müller-Schiffmann *et al.* stabilisierten Dimere durch die Einführung einer intermolekularen Disulfidbrücke mittels Cystein-Mutation an Position 8 des $\text{A}\beta$ -Peptids ($\text{A}\beta$ -S8C). Die transfizierte Zelllinie exprimierte ausschließlich $\text{A}\beta$ -S8C-Dimere [107]. Das dazu passende Mausmodell, die sogenannte „tgDimer-Maus“, exprimierte neben $\text{A}\beta$ -S8C-Dimeren weder Monomere, Amyloid-Plaques noch unlösliche $\text{A}\beta$ -Spezies. Ferner fand keine Entwicklung von Astrogliose oder Neuroinflammation statt. Dennoch zeigte sich in Versuchen eine inhibierte LTP sowie eingeschränktes Lernen und Gedächtnis [105]. Der Aggregationsmechanismus von löslichen $\text{A}\beta$ -Oligomeren *in vivo* bleibt bisher unverstanden. Favorisiert wird die *Seed*-Hypothese (von engl. *seed*, Saat), laut derer die Aggregation von einem Amyloid-Kern ausgeht und sich fortsetzt (Abb. 2) [108]. Jüngere Untersuchungen haben ergeben, dass stabilisierte $\text{A}\beta$ -S8C-Dimere die Aggregation von $\text{A}\beta_{42}$ *in vivo* und *in vitro* verzögern, aber keinen Einfluss auf das Wachstum besitzen [109].

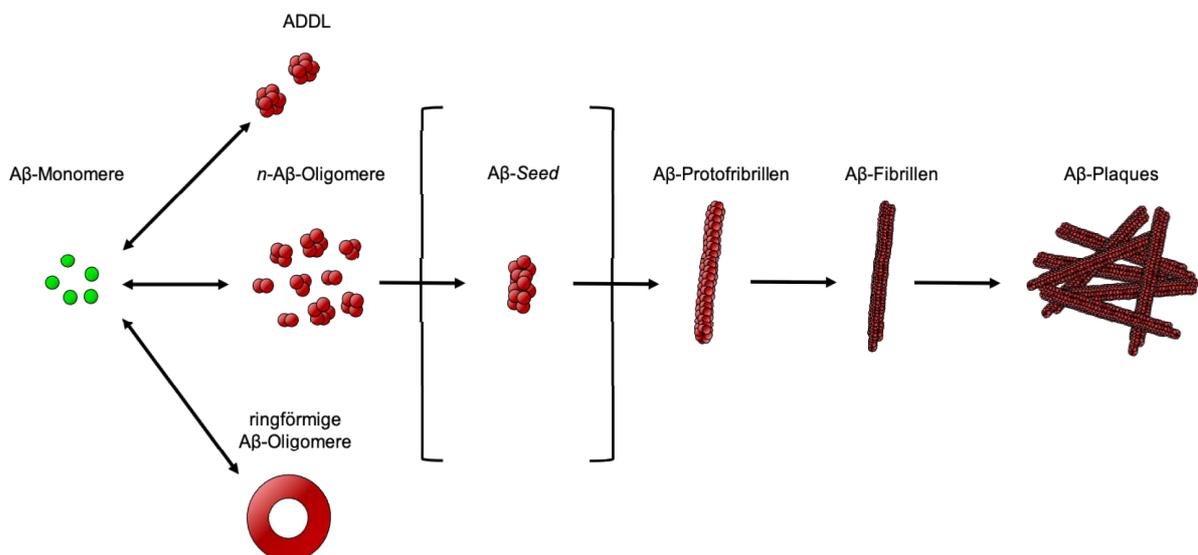


Abb. 2: Schematische Darstellung des $\text{A}\beta$ -Aggregationsprozesses und der $\text{A}\beta$ -Spezies. $\text{A}\beta$ -Monomere aggregieren zu verschiedenen Oligomer-Formen. Lösliche niedermolekulare Oligomere stehen mit $\text{A}\beta$ -Protofibrillen in einem chemischen Gleichgewicht. $\text{A}\beta$ -Protofibrillen lagern sich über einen $\text{A}\beta$ -Seed (engl. Saat oder Samen) irreversibel zu $\text{A}\beta$ -Fibrillen zusammen, aus denen final $\text{A}\beta$ -Plaques entstehen. $\text{A}\beta$, Amyloid- β ; ADDL, *Amyloid- β Derived Diffusable Ligands*.

1.4 Die Amyloid-Kaskaden Theorie

Die Entdeckung der zwei histopathologischen Hauptmerkmale Amyloid- β -Plaques und NF warf die Frage auf, welcher der beiden Prozesse als initiales Ereignis der Alzheimer-Erkrankung zu betrachten sei. Darauf basierend, dass APP-Mutationen die Produktion von A β oder dessen Aggregationsaffinität steigern [15], entwickelten *Hardy und Higgins* 1991 die Amyloid-Kaskaden-Theorie (Abb. 3). Diese geht davon aus, dass A β oder APP-Spaltprodukte, die A β enthalten, neurotoxisch wirken, die Bildung von Neurofibrillen anregen und zum Zelltod führen [110]. Nach Aufkommen der löslichen A β -Oligomer-Spezies wurde die Amyloid-Kaskaden-Hypothese um diese erweitert [111].

Viele Argumente unterstützen diese These. Genetische Veränderungen, die zu einer M. Alzheimer-Erkrankung führen, befinden sich in Genen für Proteine, aus denen A β generiert wird oder die im Spaltungsprozess zur Bildung von A β involviert sind. Lösliche Oligomere inhibieren die LTP, steigern die LTD und induzieren Hyperphosphorylierung des Protein Tau. Im Rahmen der Weiterentwicklungen von Amyloid-Bildgebung und Biomarkern zeigte sich, dass eine verringerte Menge an A β_{42} im Liquor cerebrospinalis und eine positive Amyloid-PET (Positronen-Emissions-Tomographie) einer Alzheimer-Manifestation mehrere Jahre voraus gehen. Als kostengünstigere non-invasive Methode wird fehlgefaltetes A β im Serum untersucht. *Stockmann et al.* demonstrierten, dass der Nachweis dieser A β -Strukturen als Biomarker das Auftreten von milder kognitiver Beeinträchtigung und Morbus Alzheimer voraussagen konnte [112]. Dem gegenüber stehen Ergebnisse aus mehreren Studien, die Zweifel an der Amyloid-Kaskaden-Theorie aufkommen lassen. Die Plaque-Last korreliert nicht mit dem Ausmaß der kognitiven Einschränkung und Menschen ohne Alzheimer-Symptome präsentierten in einer *post mortem* Untersuchung Plaques. Die Studienlage in Bezug auf Neurofibrillen ist uneins. Manche postulieren, die Ablagerung von NF gehe der der Plaques voraus. Und Studien mit Medikamenten, die A β als Zielstruktur besitzen, haben bisher keine erfolgreichen Ergebnisse hervorgebracht [113]. Aufgrund der Komplexität der Alzheimer-Erkrankung konnte bisher nicht die ganze Breite an Pathogenen reproduziert und einzeln, im Zusammenspiel sowie neben *in vitro* Versuchen auch *in vivo* untersucht werden. Viele Fragen bleiben weiterhin offen und müssen genauer untersucht werden [114]. Diese Hypothese bleibt trotz der zahlreichen Kritikpunkte eine der prominentesten.

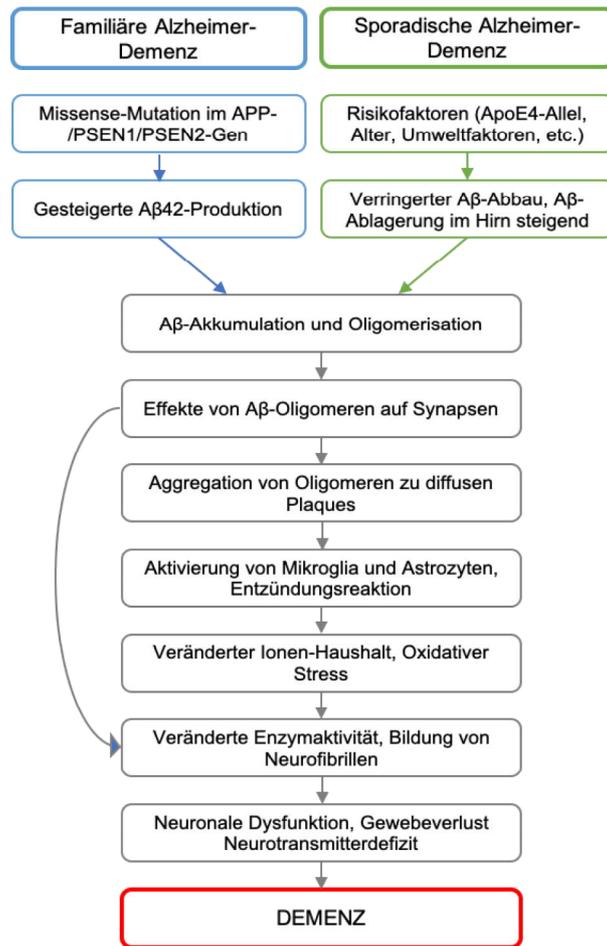


Abb. 3: Schematischer Ablauf der Amyloid-Kaskaden-Hypothese. Die Amyloid-Kaskaden-Theorie geht davon aus, dass die Pathogenese des M. Alzheimer initial auf einem Ungleichgewicht zwischen Auf- und Abbau basiert. Aggregierte A β -Oligomere stören die neuronale Plastizität. Plaques induzieren Entzündungsreaktionen und oxidativen Stress. Dies führt zu neuronaler Dysfunktion, Gewebeuntergang und final zur Demenz. Abbildung modifiziert nach Selkoe und Hardy 2016 [113].

1.5 Monoklonale Antikörper

Das Immunsystem des Menschen besitzt zwei unterschiedliche sich ergänzende Mechanismen, auf defekte oder entartete körpereigene Zellen oder körperfremde Organismen wie Bakterien oder Viren zu reagieren. Sie unterteilen sich in die zelluläre und die humorale Immunantwort. Im Rahmen der zellulären Abwehr werden Leukozyten und T-Lymphozyten aktiviert und Zytokine ausgeschüttet. Diese stimulieren die humorale Abwehr und gehen selbst direkt gegen Pathogene vor. B-Lymphozyten bilden die Grundlage der humoralen Infektionsabwehr. Sie produzieren nach Antigen-Exposition und Aktivierung passende Antikörper bzw. Immunglobuline, welche das Antigen auf verschiedene Weise unschädlich machen. Antikörper, die nur ein bestimmtes Epitop erfassen und von identischen B-Lymphozyt-Klonen abstammen, werden als monoklonale Antikörper bezeichnet. Antikörper setzen sich aus zwei leichten Ketten (engl. *light*, L-Kette) und zwei schweren Ketten (engl. *heavy*, H-Kette), die über Disulphidbrücken miteinander verbunden sind, zusammen (Abb. 4). Jede einzelne Kette besitzt

am N-terminalen Ende eine variable Region (V-Domäne) und am C-terminalen Ende eine bis vier konstante Regionen (C-Domänen). Immunglobulinmoleküle sind durch die Scharnierregion in zwei Fragmente unterteilt. Das antigenbindende Fragment (F_{ab} , engl. *fragment antigene-binding*) und das kristallisierende Fragment (F_c , engl. *fragment cristallizable*). Das F_{ab} -Fragment besteht aus einer V- und einer C-Domäne. Eine V-Domäne beinhaltet das Paratop, so dass ein F_{ab} -Segment zwei Epitope eines Antigens binden kann. Das F_c -Fragment ist die Bindungsstelle für Makrophagen oder Lymphozyten und aktiviert das Immunsystem nach Erkennen des Antigens [115].

Immunglobuline (Ig) werden in verschiedene Isotypen eingeteilt. Immunglobuline der Klasse M (IgM) sind Pentamere mit einem hohen Molekulargewicht (Abb. 4b). Die einzelnen Subdomänen der IgMs besitzen eine meist geringe Antigen-bindende Affinität, welche sie zum Teil durch die pentamere Struktur und die daraus resultierende höhere Avidität ausgleichen können. Andererseits sind sie durch ihre Struktur starke Aktivatoren des Komplementsystems. Sie werden als erste Antikörper der humoralen Immunantwort sekretiert und spielen eine Rolle in der frühen Infektabwehr [116]. Immunglobuline der Klasse G (IgG) folgen auf die primäre Immunantwort (Abb. 4a). Sie sind monomere Strukturen und machen den größten Teil der Immunglobulinklassen aus (ca. 60%). IgG aktivieren das Komplementsystem und können selbst Toxine und Viren neutralisieren [117]. Neben IgG und IgM gibt es noch die Klassen A, D und E (IgA, IgD, IgE).

Die 1975 von *Köhler und Milstein* entwickelte Hybridoma-Methode ermöglichte es, kontinuierlich identische Antikörper-produzierende B-Zell-Klone zu generieren [118]. Es werden Milzzellen einer zuvor immunisierten Maus mit Myelomzellen fusioniert. Dies sind bösartig entartete Zellen des Immunsystems, die sich schnell teilen und große Mengen an Antikörpern produzieren. Die daraus entstehenden Hybridom-Zellen produzieren identische Klone von Zellen, die den gewünschten Antikörper sekretieren. Diese Methode wurde weiter optimiert und ausgebaut, so dass es heutzutage möglich ist, verschiedenste Antikörper herzustellen und zu untersuchen.

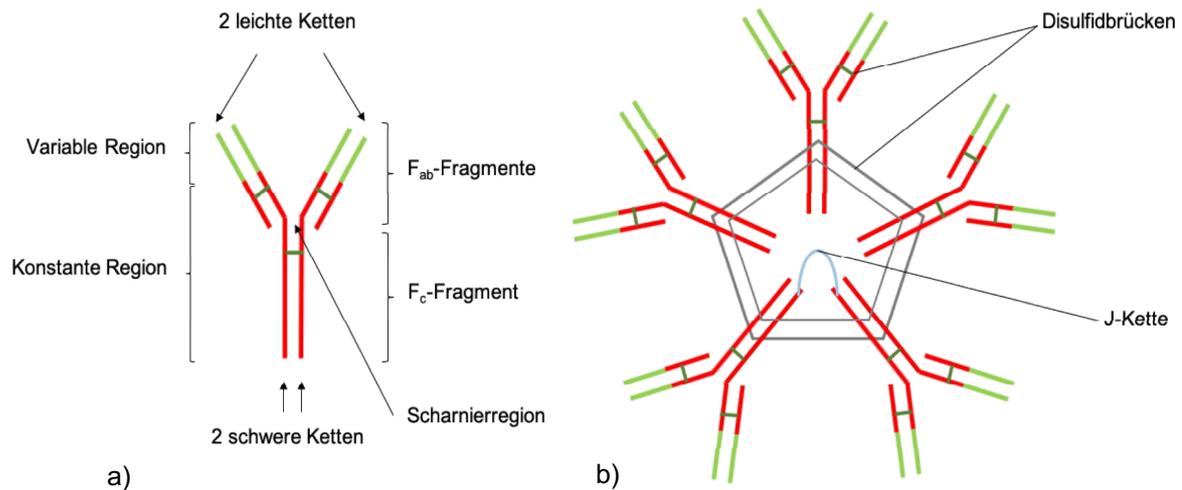


Abb. 4: a) Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers. Die Bindungen der leichten und schweren Ketten erfolgt über Disulfidbrücken. F_{ab} = „Fragment antigene-binding“, F_c = „Fragment cristallizable“. b) Schematische Darstellung eines IgM-Antikörpers. Rote Linie, konstante Region; grüne Linie, variable Region

1.6 Proteinkonformationen

Die Proteinkonformation beschreibt die räumliche Anordnung eines Proteins. Ein Protein kann verschiedene Konformationen besitzen, die unterschiedliche Eigenschaften präsentieren. Es wird davon ausgegangen, dass neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, frontotemporale Demenz oder Morbus Parkinson initial aufgrund einer pathologischen Proteinstruktur, die die Krankheitskaskade in Gang setzt, entstehen [119]. Die Fehlfaltung eines Proteins kommt auch im gesunden Organismus vor, wird aber auf verschiedene Weisen wie Autophagozytose unschädlich gemacht [120]. Eine Störung dieser Mechanismen, resultierend in einem insuffizienten Abbau, oder eine zum Beispiel durch Mutation gesteigerte Produktion dieses pathologischen Proteins führt zu unlöslichen Aggregaten, die sich im Hirnparenchym ansammeln und in Neurodegeneration resultieren [121]. Zur Unterscheidung der Konformere eignen sich konformationsspezifische monoklonale Antikörper. Diese erkennen entweder ein bestimmtes dreidimensionales Epitop oder eine bestimmte Abfolge von Aminosäuren, welche in anderen Konformeren verdeckt ist [122]. Die Generierung solcher Antikörper ermöglichte es, verschiedene A β -Konformationen als Bestandteil der Plaques zu entdecken und zu quantifizieren [123].

A β -Monomere vollziehen eine Konformationsänderung von α -Helices in Membran-ähnlichem Medium zur β -Faltblattstruktur in wässrigem Medium. Dies kann mit dem Vorgang während des APP-Spaltprozesses verglichen werden und unterstützt die Hypothese von löslichen A β -Oligomeren als eigentliche neurotoxische Spezies [124]. In Experimenten zeigte sich, dass synthetisches A β die LTP geringer inhibierte als natürlich sekretiertes A β in gleicher Konzentration. Unterschiedliche Konformationen bieten eine Erklärung und einen Ansatzpunkt für weitere Forschung [107]. Das Verständnis von Konformationen und ihrer Dynamik lässt Schlüsse über zelluläre Vorgänge und damit auf die Krankheitspathogenese ziehen.

1.7 Therapieansätze des Morbus Alzheimer

Aktuell zugelassene pharmakologische Therapeutika sind Acetylcholinesterase-Hemmer (Rivastigmin, Galantamin, Donepezil) und NMDA-Antagonisten (Memantin). In *post mortem* Untersuchungen der Gehirne von Alzheimer-Patienten konnte eine Reduktion der nikotinergen Acetylcholin-Rezeptoren (nAChR) festgestellt werden [125]. Diese beteiligen sich an neuronalen Kommunikationsprozessen im Gehirn. Acetylcholinesterase-Hemmer sollen diesen Mangel ausgleichen [126]. Neben dem nAChR-Mangel wurde ein Überschuss im Glutamat-Haushalt und eine Überreaktivität von Glutamat-abhängigen N-methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDA-Rezeptoren) festgestellt [127, 128]. NMDA-Rezeptoren, die für synaptische Plastizität und Langzeitpotenzierung essentiell sind, befinden sich anstelle von phasischen Erregungen in einem tonischen Erregungszustand [129]. Diese Überaktivierung führt durch einen übermäßigen Ca²⁺-Einstrom zu synaptischen Fehlfunktionen und final zum Zelltod [130]. NMDA-Antagonisten relativieren die überschüssige Aktivität der Rezeptoren [131]. Beide Medikamentenklassen verschaffen nur eine kurzfristige Besserung der Symptome, verlangsamen oder stoppen den Verlauf der Erkrankung aber nicht.

Krankheitsmodifizierende Medikamente befinden sich in der Entwicklung. Vorrangig wurden Medikamente, die auf A β bzw. A β -Aggregation abzielten, entwickelt und in klinischen Studien untersucht (Abb. 5) [132]. Bapineuzumab ist ein monoklonaler non-selektiver A β -Antikörper. In einer Phase-III-Studie konnte kein verbessertes Outcome für Alzheimer-Patienten gezeigt werden [133]. Solanezumab bindet lösliche A β -Spezies. In den Phase-III-Studien EXPEDITION 1 und 2 ließ sich keine Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten nachweisen [134]. Aducanumab bindet A β -Fibrillen und lösliche Oligomere [135]. In einer Phase-Ib-Studie (PRIME) reduzierte der Antikörper A β im Gehirn von Alzheimer-Patienten

mit milder Symptomatik [136]. Eine Zwischenberechnung der Phase-III-Studien ENGAGE und EMERGE (2016-2019) erbrachte zunächst keine signifikanten Resultate, so dass die Studien eingestellt wurden. Nach Einbeziehung von weiteren Studiendaten deuteten sich jedoch überraschend Hinweise auf eine signifikante positive Wirkung des Antikörpers an. In Messungen mittels Florbetapir PET-Scans visualisierten A β -Plaques zeigte sich eine signifikante Reduktion der Plaque-Last in Patienten, welche 54 Wochen mit 3, 6 und 10 mg/kgKG Aducanumab i.v. behandelt wurden, gegenüber denen, die ein Placebo erhielten [137]. Ein Antrag auf Zulassung der FDA wurde 2021 entgegen eines Expertenvotums im Rahmen eines Eilverfahrens („*Accelerated Approval Program*“) angenommen. Dieses ist allerdings an die Resultate einer folgenden Phase-IV-Studie gebunden, so dass die Wirksamkeit in weiteren Studien evaluiert werden muss. Auch die monoklonalen Antikörper Gantenerumab und BAN2401 zeigten in Phase-III-Studien keine Verbesserung des Outcomes [138]. BAN2401 bindet an lösliche A β -Protofibrillen und soll auf diese Weise eine Aggregation von A β verhindern [139]. Gantenerumab bindet an aggregiertes A β und fördert dessen Elimination durch Phagozytose [140]. In Maus-Versuchen ließ sich die Plaque-Last mittels passiver und aktiver Immunisierung verringern [141, 142]. Daraufhin wurden Impfungen mit dem Impfstoff AN1792 am Menschen getestet. Die Phase-IIa-Studie wurde aufgrund von Meningoenzephalitiden bei 6% der Probanden eingestellt [143]. Studien zu Therapeutika gerichtet gegen β -Sekretase und γ -Sekretase wurden eingestellt. Die Sekretase-Inhibitoren sollen die Bildung von A β und somit die Aggregation verhindern. Verubecestat und Umibecestat (β -Sekretase-Inhibitoren) zeigte in einer Phase-III-Studie keine Verbesserung der Klinik von Morbus Alzheimer [144-146]. Die Studie zu Semagacestat (γ -Sekretase-Inhibitor) wurde aufgrund von mangelnder Wirkung und verstärkten Nebenwirkungen eingestellt [147]. Präparate, die hyperphosphoryliertes Tau als Angriffspunkt hatten, erbrachten bisher ebenfalls keine Erfolge [148]. Nach der Zulassung von Memantin 2002 wurde kein weiteres Medikament in Deutschland zugelassen. Es werden weiterhin Medikamente, die an verschiedenen Punkten der Neuropathogenese ansetzen, erforscht.

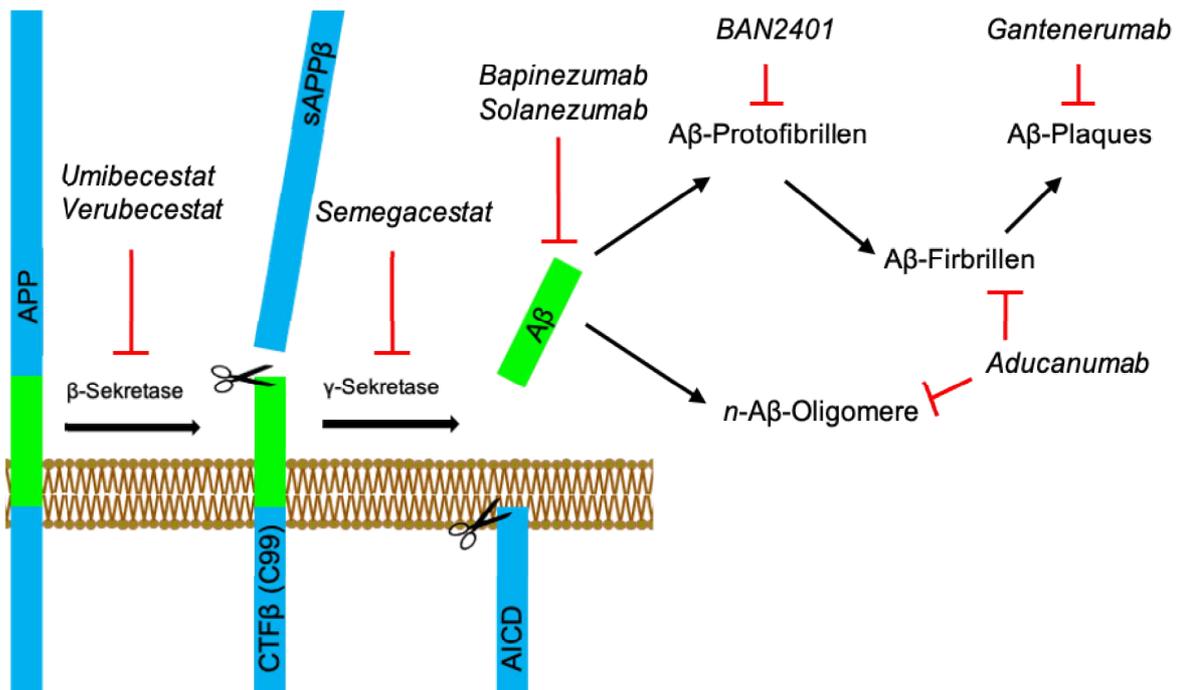


Abb. 5: Ansatzpunkte der krankheitsmodifizierenden Medikamente im Plaquetbildungsprozess. β - und γ -Sekretase-Inhibitoren setzen im Spaltprozess von APP an und reduzieren die Produktion von A β . Direkte A β -Antikörper verhindern die Aggregation zu Plaques. Aducanumab bindet sowohl A β -Fibrillen als auch lösliche A β -Oligomere. BAN2401 bindet an A β -Protofibrillen. Beide Antikörper reduzieren die Plaquetbildung. Gantenerumab bindet an aggregiertes A β und fördert die Eliminierung mittels Phagozytose. Das Ziel aller Medikamente ist die Reduktion der Plaquet-Last. A β , Amyloid- β ; APP, *Amyloid Precursor Protein*; AICD, *APP-Intracellular Domain*; CTF β , *C-Terminal Fragment β* ; sAPP β , *soluble Amyloid- β -Protein β*

1.8 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es monoklonale Antikörper gegen A β , speziell gegen A β -Dimere zu generieren. Die hohe Prävalenz und Inzidenz sowie die deutlichen Auswirkungen der Erkrankung auf persönlicher und finanzieller Ebene verdeutlichen die Dringlichkeit, die klinische Behandlung von Diagnostik bis hin zur Therapie zu optimieren. Die Diagnose einer *late-onset* Alzheimer-Erkrankung zu Lebzeiten des Patienten ist ausschließlich klinisch zu stellen. Definitiv kann die Erkrankung nur *post mortem* histologisch bestätigt werden. Diverse begrenzt symptomatisch wirksame Medikamente sind in Deutschland und weltweit zugelassen, krankheitsmodifizierende Medikamente in Deutschland bisher keine. Die bis *dato* durchgeführten klinischen Studien mit monoklonalen Antikörpern zeigten keinen Erfolg. Sie wurden eingestellt oder erlangten aufgrund von Nebenwirkungen keine Zulassung.

Genauere Untersuchungen von A β -Dimeren, der kleinsten toxischen Einheit unter den löslichen Oligomer-Spezies, waren aufgrund der Fragilität der Proteine und ihrer Aggregationseigenschaften erschwert. Die Produktion stabiler A β -Dimere wurde durch die Einführung einer Disulfidbrücke und Generierung des tgDimer-Maus-Modells [105, 107] etabliert. Dies ermöglichte die Generierung spezifischer monoklonaler Antikörper gegen A β -Dimere, welche einen neuen Ansatzpunkt zur Entwicklung von diagnostischen Messwerten oder Medikamenten darstellen. Monoklonale Antikörper gegen A β -Dimere können zum Beispiel anhand der Entwicklung von Bluttests die Diagnostik der Erkrankung *ante mortem* ermöglichen und das Alter bei Diagnosestellung herabsetzen. Des Weiteren können sie zur Intervention als antikörperbasierte Therapie verwendet werden und das Voranschreiten der Erkrankung im besten Fall heilen oder verzögern.

1. Generierung von monoklonalen Antikörpern gegen A β .
2. Generierung von A β -S8C-Dimer spezifischen monoklonalen Antikörpern.

2 Material und Methoden

2.1 Aktenzeichen des LANUV NRW und der ZETT

Das Aktenzeichen des Landesamtes für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz NRW (LANUV) lautet: 84-02.05.30.11.070. Das Aktenzeichen der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität lautet: A70/11 Prof. Korth. Die Isolation der Zellen erfolgte durch die Träger des Fachkundenachweis gemäß §9 des geltenden Tierschutzgesetzes Prof. Carsten Korth und Frau Dr. Sandra Gunne, Institut für Neuropathologie, Uniklinikum Düsseldorf. Ein Ethikvotum war für diese Arbeit nicht von Nöten.

2.2 Material

Im Folgenden werden die für diese Arbeit verwendeten Materialien aufgelistet. An dieser Stelle werden die allgemein verwendeten genannt, die speziell verwendeten Materialien sind neben den durchgeführten Versuchen zu finden.

In der Zellkultur:

Cell Culture Flask 25 cm ²	Greiner Bio One	690160
Cell Culture Flask 75 cm ²	Greiner Bio-One	658175
Doxycycline hydrochloride	Sigma	D3447
Fetal Calf Serum (FCS)	PAA	A15-649
Hypoxanthine /Thymidine (HT)	Gibco	41065-012
L-Glutamin	Gibco	25030-024
MEM (1x)	Gibco	21090-022
Penicillin/Streptomycin	Gibco	15140-122
RPMI Medium 1640 (1x)	Gibco	31870-025
Tissue culture Plate, 10 cm	NUNC	172958
Tissue culture Plate, 12 Well	NUNC	150628
Tissue culture Plate, 24 Well	NUNC	142475
Tissue culture Plate , 96 Well	Greiner Bio-one	655180

Weitere Materialien:

10/20 µl XL Graduated Tip	Star Lab	S1110-3700
200 µl Bevelled Tip	Star Lab	S1111-1700
1000 µl Graduated Tip	Star Lab	S1111-6700
anti-µ chain Agarose	Sigma	A4540
Beckman coulter Allegra 6KR Centrifuge		
BioTrace PVDF 0,45 µm	PALL	T303241
MLS 50 Rotor		
Cellstar PP-Test tubes 15 mL	Greiner Bio-one	188271
Cellstar PP-Test tubes 50 mL	Greiner Bio-one	227261
Combitips advanced 5 mL	Eppendorf	0030089456
Combitips advanced 25 mL	Eppendorf	0030089472
Costar Stripette, non-pyrogenic, 2 mL	Greiner Bio-one	710180
Costar Stripette, non-pyrogenic, 5 mL	Corning	487
Costar Stripette, non-pyrogenic, 10 mL	Corning	4488
Costar Stripette, non-pyrogenic, 25 mL	Corning	4489
DPBS	Gibco	14190-094
ELISA Platte	NUNC	439454
Eppendorf Multipette M4 1µL – 10 mL		
Eppendorf research Pipetten 0,1-1,5 µL		
Eppendorf research Pipetten 0,5-10 µL		
Eppendorf research Pipetten 2-20 µL		
Eppendorf research Pipetten 20-200 µL		
Eppendorf research Pipetten 100-1000 µL		
Eppendorf research pro 20 – 300 µL		
Eppendorf safe-lock tubes (Eppi) 1,5 mL		
Eppendorf safe-lock tubes (Eppi) 2 mL		
Eppendorf Mini Spin		
Hettich Tischzentrifuge Rotina 46R		
Hettich Zentrifuge Rotofix 32		
Hirschmann Laborgeräte Pipetus only		
IsoStrip	Roche	1493027

Millipore MilliQ plus
 NanoDrop, PreqLab, ND1000 Spectrometer
 Nitrozellulose Membran 0,2
 pH Elektrode SenTix 21
 Sartorius ML210P (Waage)
 Tecan-Safire Spectrometer
 WTW digital pH Meter

Verwendete Puffer und Medien:

Elutionspuffer

100 mM Glycine pH 2,5	Roth	3908.2
500 mM NaCl	Merck	K34243404 504

Einfrier-Lösung

FCS	PAA	A15-649
10% DMSO	Sigma	D5879

HT-Medium

MEM	Gibco	21090
10% FCS	PAA	A15-649
2% HT Supplement 50x	Gibco	41065-012
1% L-Glutamin 100x	Gibco	25030-024
1% Penicillin/Streptomycin	Gibco	15140-122

MEM-Medium

MEM	Gibco	21090
10% FCS	PAA	A15-649
1% L-Glutamin 100x	Gibco	25030-024
1% Penicillin/Streptomycin	Gibco	15140-122

PBS-T

137 mM NaCl	Merck	K34243404 504
2,7 mM KCl	Roth	6781.3

2 mM KH ₂ PO ₄	Sigma	P0662
10 mM Na ₂ HPO ₄	Sigma	S0751
0,05% Tween 20	Sigma	P1379
RPMI-Medium		
RPMI Medium 1640 (1x)	Gibco	31870-025
10% FCS	PAA	A15-649
1% L-Glutamin 100x	Gibco	25030-024
1% Penicillin/Streptomycin	Gibco	15140-122
TBS		
25 mM Trisbase pH 7,5	Merck	1.08382.2500
2,7 mM KCl	Roth	6781.3
137 mM NaCl	Merck	K34243404 504
TBS-T		
25 mM Trisbase pH 7,5	Merck	1.08382.2500
2,7 mM KCl	Roth	6781.3
137 mM NaCl	Merck	K34243404 504
0,05% Tween 20	Sigma	P1379
Transfer Puffer		
24 mM Trisbase	Merck	1.08382.2500
192 mM Glycine	Roth	3908.2
20% Methanol	Merck	1.06009.2500
Tris-Tricine-Puffer		
100 mM Tris	Merck	1.08382.2500
100 mM Tricine	Roth	6977.3
0,1% SDS	Roth	CN30.3

2.3 Fusion

Mit Dank an das Team der Arbeitsgruppe Korth – “Neurodegeneration,, am Institut für Neuropathologie des Uniklinikum Düsseldorf wurden in Vorbereitung auf das Projekt zwei Mäuse (Maus 97 und 98) über sechs Runden mit 50 µg oxidiertem synthetischem S8C-Aβ-Dimeren immunisiert. Die Splenozyten dieser Mäuse wurden mit immortalisierten P3U-Myelomzellen fusioniert, um unsterbliche Antikörper-produzierende Hybridomzellen herzustellen (Abb. 6). Diese Zellen wurden auf 96-Well-Platten ausgesät und kultiviert.

2.4 Züchten der Klone

Im Rahmen des Fusions-Protokolls werden die Hybridom-Zellen auf 20 96-Well-Platten ausgesät. Nach 4 Tagen werden die Zellen mit HT-Medium inkubiert. Nach einer Woche beginnen die Zellen makroskopisch sichtbare Kolonien am Boden der Wells zu bilden, deren metabolische Aktivität sich im gelben Farbumschlag des Mediums widerspiegelt. Diese Zellen werden mittels ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) einem ersten Screening unterzogen. Im Resultat negative Zellen werden verworfen, ELISA-positive Zellen werden von der 96-Well-Platte in eine 12-Well Platte umgesetzt und mit HT-Medium aufgefüllt. Nach erneutem Farbumschlag des Mediums werden die Zellen in Flaschen umgesetzt, in denen sie im Inkubator gehalten werden können.

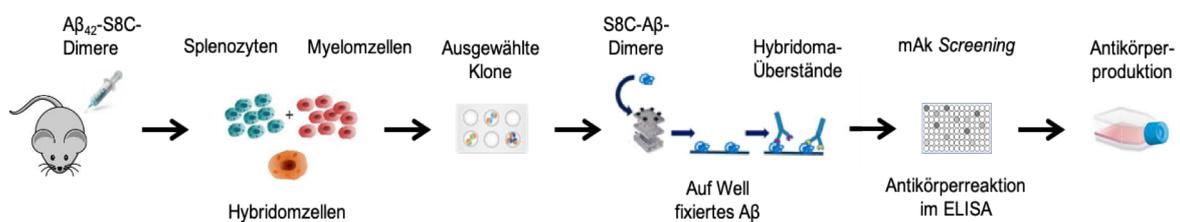


Abb. 6: Schematische Darstellung des Fusions-Prozesses. Die Mäuse 97 und 98 wurden zunächst über sechs Zyklen mit Aβ₄₂-S8C-Dimeren immunisiert. Deren Splenozyten wurden mit immortalen Myelomzellen fusioniert, so dass Hybridomzellen entstanden. Die Zellen wurden auf 96 Well-Platten ausgesät und kultiviert. Die Überstände wurden im ELISA-Verfahren bezüglich Reaktivität auf S8C-dimeres Aβ geprüft. Positiv reagierende Klone wurden zur weiteren Antikörperproduktion kultiviert. Aβ, Amyloid-β; ELISA, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*; mAk, monoklonale Antikörper

2.5 Subklonieren

Nach Identifikation positiver Zellkolonien werden diese subkloniert. Um das Wachstum unterschiedlicher oder auch ELISA-negativer monoklonaler Klone innerhalb einer Zellkolonie zu vermeiden, werden diese verdünnt und im Durchschnitt auf unter 0,5 Zellen pro Well reduziert. Durch mehrfaches Subklonieren werden eine hohe Stabilität Antikörperproduzierender Hybridoma-Zelllinien und ein hoher Reinheitsgrad an monoklonalen Antikörpern erreicht.

Material:

HT 50x	Gibco	41065-012
MEM-Medium		
Neubauer Zählkammer		
Tissue culture Plate , 96 Well	Greiner Bio-one	655180

1. Entnahme der Platten mit den entsprechenden zu subklonierenden Zellen
2. Durch Auf- und Abpipettieren des Mediums Zellen vom Boden des Wells lösen, Medium mit Zellen aufnehmen und in ein mit 1,7 mL Medium gefülltes Eppi umsetzen
3. Ca. 10 μ L der Zell-Lösung auf die Zählkammer geben und unter dem Lichtmikroskop die Zellen zählen

Zählen: jeweils Zellen in den vier Eckquadranten zählen und davon den Durchschnitt berechnen. Anzahl der Zellen mit 10.000 multiplizieren. Dies entspricht der Zellzahl in 1 mL.

Mittels Dreisatz Berechnung der Verdünnung von <100 Zellen pro 50 mL pro Well

4. Im Falcon 9 mL Medium und 1 mL HT-Supplement vorlegen und die ausgerechnete Menge der Zell-Lösung dazu geben
5. Die gesamte Lösung mit 100 μ L je Well auf eine 96-Well-Platte verteilen
6. Die Platte zum Wachsen lassen in den Inkubator stellen

2.6 Einfrieren und Lagerung der Klone

Zur langfristigen Lagerung der Klone werden diese in FCS (Fetales Kälberserum, engl. *Fetal Bovine Serum*) versetzt mit 10% DMSO eingefroren. Die kurzfristige Lagerung der Zellen erfolgt bei -80 °C. Zur langfristigen Lagerung erfolgt die Konservierung der Zellen in flüssigem Stickstoff.

Material:

Cryotube	NUNC	368632
Einfrier-Lösung		

1. Entnahme der Hybridom-Zellen aus dem Inkubator. Kontrolle auf Aktivität unter dem Mikroskop
2. Umdekantieren in 15 mL Falcon
3. Herabzentrifugieren der Zellen (1000 g, 5 min, Raumtemperatur)
4. Absaugen des Überstandes mit einer Glaspipette
5. Resuspendieren des Zell-Pellets mit 2 mL Einfrierlösung und Umfüllen in ein Cryotube
6. Lagerung bei -80 °C

2.7 ELISA

Der *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) ist eine sensitive Methode zum Nachweis und zur Bestimmung der Konzentration von Antigenen und Antikörpern. Hierbei wird das zu untersuchende Antigen zunächst auf einem festen Träger (hier eine 96-Loch Platte) gekoppelt. Im nächsten Schritt wird das Antigen mittels Primärantikörper gebunden. Zum Nachweis wird ein mit einem farbumschlagenden Enzym gekoppelter Sekundärantikörper verwendet. Die Nutzung zweier Antikörper dient zur Erhöhung der Sensitivität. In meinem Fall galt es nicht, die Menge des Antigens zu bestimmen, sondern die Funktion des jeweils generierten Klons als spezifischen Primärantikörper zu eruieren.

2.7.1 Beschichten der ELISA-Platten

Material:

A β -Dimer Lösung (0,5 μ g/Well in PBS+DMSO)

A β -Wildtyp Lösung (0,5 μ g/Well in PBS+DMSO)

Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma	A7906
Maxisorp Immuno Plates	NUNC	083837
TBS-T Puffer		

1. Pipettieren von 50 μ L A β -Dimer Lösung (0,5 μ g/Well in PBS+DMSO) auf eine halbe Platte einer 96 Well Maxisorp Platte (NUNC) und für 2 h bei 37 °C inkubieren
2. Absaugen der Flüssigkeit
3. Je 250 μ L/Well 5% BSA in TBS-T-E zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen der Maxisorp-Platte in alle Wells pipettieren und über Nacht bei 4 °C inkubieren
4. Ausklopfen der Flüssigkeit und Lagerung der Platten bei -20 °C

2.7.2 Durchführung ELISA

Material:

BD OptEIA™ TMB Substrate Reagent Set	BD Bioscience	555214
Beschichtete Nunc-Platten (s.o.)		
POD markierter <i>goat</i> anti-Maus-IgG Sekundärantikörper	Pierce	31444
25% Schwefelsäure	Merck	8027344
TBS-T		
Tecan Safire Plate Reader		

1. Auftauen der präparierten und zur Lagerung eingefrorenen ELISA-Platte
2. 5 min Waschen mit TBS-T-E

In der Zellkultur:

3. 100 μL Überstand aus dem gelbverfärbten Hybridoma-Überstand aus der 96 Well-Platte auf die rein BSA-beschichteten Wells pipettieren. Die Gelbfärbung des Überstandes erfolgt als chemische Reaktion auf metabolische Aktivität der Zellen.
4. 100 μL Hybridoma-Medium auf die Wells aus denen die 100 μL Überstand entnommen wurden, um das Wachstum der Zellen aufrecht zu erhalten.

Im Labor:

5. Je 50 μL aus den Wells der Negativkontrolle mit reinem BSA in die korrespondierenden Aß-Wells pipettieren und 1 h bei Raumtemperatur inkubieren
6. Wells mit Glaspipette und Vakuumpumpe absaugen
7. 3 Mal 10 min Waschen mit je 100 μL /Well TBS-T-E, nach jedem Waschen Absaugen der Flüssigkeit
8. Je Well 50 μL sekundär Antikörper (Anti-mouse POD 1:10.000 in TBS-T-E verdünnt) hinzufügen, Inkubation für 1 h
9. 3 Mal 10 min mit je 100 μL /Well TBS-T-E waschen, nach jedem Mal Absaugen der Flüssigkeit
10. Je 100 μL /Well BD OptEIA™ (TMB substrate reagent set, cat no.: 555214) geben
11. Beobachten der Reaktion (Blaufärbung) und bei beginnender Hintergrundreaktion Abstoppen mit Schwefelsäure (28% H_2SO_4), dabei erfolgt ein Farbumschlag von blau zu gelb
12. Auswertung der Elisa-Platte am *Tecan Plate Reader* mit folgenden Einstellungen:
Absorption = 450 nm

2.8 Gewinnung zellulär sekretierten A β s

Chinese Hamster Ovary (CHO)-Zellen sind eine aus den Ovarien des chinesischen Zwerghamsters generierte Zelllinie [149]. Aufgrund ihrer günstigen Eigenschaften bezüglich qualitativ hochwertiger Genexpression, finden sie große Anwendung im Bereich der Biotechnologie. Das APP/A β der CHO-Zellen unterliegt einer Tetracyclin-abhängigen Expression. In Abwesenheit von Doxycycline, einem stabileren Tetracycline-Derivat, ist die gewünschte Genexpression supprimiert. Durch die Zugabe von Doxycycline wird die Suppression aufgehoben und die Expression aktiviert.

Material:

Doxycycline	Sigma	D3447
RPMI-Medium		

Induktion der CHO-Zellen:

In der Zellkultur:

1. Entnahme der Zellen aus dem zur Lagerung verwendeten Inkubator, Kontrolle unter dem Mikroskop, ob die Zellen Kontaminationen erlitten
2. Absaugen des Mediums mit Glaspipette
3. 7,5 mL Medium in die Petrischale pipettieren und mit 1 μ g/mL Doxycycline (gelöst in DMSO, hier 7,5 μ L) versetzen und mehrmals schwenken, sodass sich das Doxycycline gut in der Petrischale verteilt.

Ernte des zellulär sekretierten A β :

1. Nach Untersuchung auf mögliche Kontamination Umdekantieren in 15 mL-Falcons
2. Zentrifugieren des Überstandes (4000 rpm, 5 min, 4 °C), um den Überstand von letzten zellulären Bestandteilen zu trennen

Die Lagerung der Falcons bis zur weiteren Verwendung erfolgte auf Eis.

2.9 Splitten der CHO-Zellen

Sobald die Zellen ein konfluierendes Stadium erreicht haben, mussten sie geteilt werden. So wurden ein kontinuierliches Wachstum und die A β -Produktion aufrechterhalten.

Material:

CHO-Zellen Typ APP-wt

CHO-Zellen Typ APP-S8C

DPBS	Gibco	14190-094
------	-------	-----------

RPMI-Medium

TrypZean [®] Solution	Sigma	T3449
--------------------------------	-------	-------

1. Entnahme je einer Petrischale konfluierender CHO-Zellen vom Typ APP-wt und APP-S8C, Kontrolle der Zellen auf mögliche Kontamination unter dem Mikroskop
2. Absaugen des Mediums mit der Glaspipette
3. Spülen der Zellen mit 10 mL DPBS unter leichtem Schwenken. Absaugen des DPBS mit Glaspipette.
4. 1 mL TrypZean[®] auf die Petrischale geben und 5 min im Inkubator einwirken lassen, die Zellen sollten sich vom Boden der Petrischale ablösen
5. Hinzufügen von 9 mL RPMI-Medium, Durchmischen und Überführen in 15 mL Falcon
6. Herabzentrifugieren der Zellen (1000 g, 5 min, Raumtemperatur)
7. Überschüssigen Überstand absaugen
8. Resuspendieren des Zell-Pellets mit 10 mL Medium
9. Zellen zu 1:20 bzw. 1:40 mit RPMI-Medium in neuer Petrischale verdünnen und zurück in den Inkubator stellen

2.10 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation (IP) ist eine Methode, um spezifische Proteine aus einem komplexen Gemisch zu isolieren (Abb. 7). Im ersten Schritt werden Antikörper im Überstand an Antikörper-bindende Agarose-Kügelchen gekoppelt. Die Kopplung erfolgt mittels nicht-kovalenter Bindung an das F_c-Fragment der generierten Antikörper. Im zweiten Schritt wird hieran das gewünschte Antikörper-spezifische Target gebunden. Im letzten Schritt wird das Target vom Komplex gelöst und mithilfe des Western Blot-Verfahrens nachgewiesen. In meinem Fall diente die Immunpräzipitation dazu, die generierten Antikörper auf den gewünschten Effekt hin zu überprüfen.

Material:

Antikörper-Überstand (15 mL)

Anti-Mouse IgM (<i>μ-chain specific</i>)-Agarose	Sigma	A4540
Protein A/G Plus Agarose	Santa Cruz	sc-2003
Zellulär sekretiertes wt-A β		
Zellulär sekretiertes S8C-A β		

Kopplung der Beads:

1. Für IgG-Klone Zugabe von 20 μ L Protein A/G, für IgM-Klone Zugabe von 20 μ L anti-IgM Agarose zu 15 mL Antikörper-Überstand. Die Positivkontrolle besteht aus 15 mL MEM-Medium versetzt mit 5 μ L IC-16 und 20 μ L A/G-Agarose. Die Negativkontrolle beinhaltet reines MEM-Medium mit 20 μ L A/G-Agarose.
2. Für 30 Minuten unter kontinuierlicher Bewegung im Drehrad bei 4 °C inkubieren
3. zur Kontrolle der Agarose-Menge Proben zentrifugieren (4000 rpm, 5 min), gegebenenfalls Menge durch Hinzufügen von Agarose korrigieren
4. Inkubation im Drehrad bei 4 °C über Nacht

Ernte des zellulär sekretierten A β :

1. Entnahme von je 12 Petrischalen mit induzierten wt-APP- und S8C-APP-CHO-Zellen aus dem Inkubator, Überprüfung auf Kontamination unter dem Mikroskop

2. Umdekantieren in 15 mL Falcons, Lagerung auf Eis
3. zur Abtrennung des Zelldetritus Zentrifugation (4000 rpm, 5 min), Lagerung auf Eis

Inkubation der Beads mit A β :

1. Entnahme der Falcons vom Drehrad
2. Zentrifugation (4000 rpm, 5 min)
3. Dekantieren des Überstands, Überstand verwerfen
4. Auffüllen mit 10 mL PBS
5. Zentrifugation (4000 rpm, 5 min)
6. Dekantieren des Überstands, restlichen Überstand abpipettieren, Überstand verwerfen
7. Auffüllen mit 10 mL PBS
8. Zentrifugation (4000 rpm, 5 min)
9. Dekantieren des Überstands, restlichen Überstand abpipettieren, Überstand verwerfen
10. Auffüllen der gereinigten Beads mit je 15 mL sekretierter wt-A β - oder S8C-A β -Lösung
11. Inkubation über Nacht bei 4 °C auf dem Drehrad

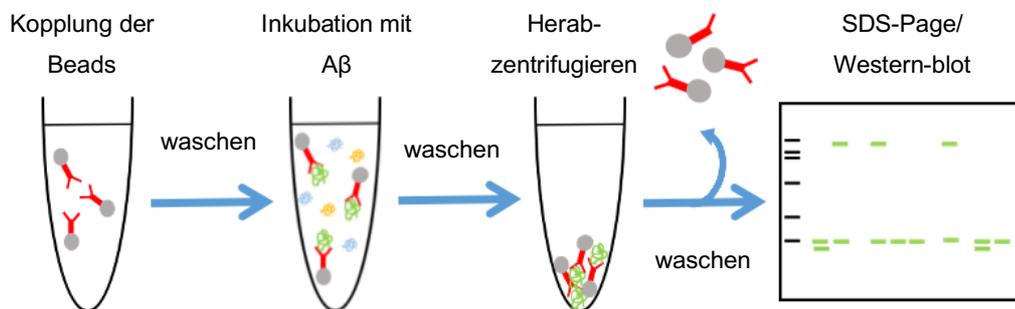


Abb. 7: Schematische Darstellung des Ablaufs einer Immunpräzipitation. Die Antikörper binden mittels nicht-kovalenter Bindung an Agarose-Beads. Nach dem Waschen der Beads mit PBS werden die Antikörper gekoppelten Beads mit dem zellulär sekretierten A β inkubiert. Die Beads werden mit PBS gewaschen, abzentrifugiert und die Antikörper aufgetrennt und sichtbar gemacht.

2.11 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung der Proteine nach Größe wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Die aufzutrennenden Proteine werden denaturiert und negativ geladen, so dass sie während der Elektrophorese zur Anode wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle ist abhängig von der Molekülmasse. Im Vergleich der Wanderungsgeschwindigkeit mit der von Molekülen mit bekannter Größe kann die Masse der zu untersuchenden Proteine bestimmt werden.

Material:

Criterion™ Cell	Bio-Rad	165-6030
Page Ruler Prest	Thermo Scientific	26616
Tris-Tricine-Puffer		
Tricine Proben Puffer	Bio-Rad	161-0739
10 -20%Criterion™ Tris-Tricine Gel	Bio-Rad	345-0068

1. Entnahme der Proben aus dem Drehrad im Kühlraum
2. Herabzentrifugieren der Beads in der Zentrifuge (4000 rpm, 5 min, 4 °C)
3. Abkippen des Überstandes aus den Falcons
4. Auffüllen und Durchmischen des Rückstandes mit 1 mL PBS, dabei Umfüllen in Eppendorf Reaktionsgefäße (Eppi) 1,5 mL
5. Herabzentrifugieren der Beads (6000 g, 1 min) und Abpipettieren des Überstandes
6. zweiter Waschgang mit 1 mL PBS; vortexen
7. Herabzentrifugieren der Beads (6000 g, 1 min) und erneut Überstände abpipettieren
8. Für wenige Sekunden bei 6000 g erneut zentrifugieren und restliche Überstände mit 200 µL-Pipette abnehmen
9. 15 µL/20 µL Proben-Puffer (Tris-Tricine) dazu geben
10. vortexen, auf der Heizplatte bei 100 °C für 5 min kochen und erneut vortexen
11. Herabzentrifugieren der Beads (6000 g, 1 min)
12. Vorbereiten des Gels:
 1. Gel auspacken, Versiegelungs-Band nach unten abziehen, Kamm vorsichtig ziehen, Gel in Behälter einsetzen

2. zuerst Kammer des Gels, dann Vorderkammer des Behälters mit Tris-Tricine-Puffer auffüllen
3. Spülen der Kammern mit 100 μL -Pipette mit Puffer, um Gelrückstände zu lösen und auszuspülen
13. Erste Tasche: 2 μL *Page Ruler Prestained* (Marker), restliche Taschen 20 μL nach Protokoll
14. Gellauf bei 140 V-160 V für ca. 1 $\frac{1}{2}$ h

2.12 *Stripe*-Verfahren/Direkter A β -Nachweis

Zur Beurteilung der Fähigkeit, A β als Primärantikörper direkt nachzuweisen, wurde das *Stripe*-Verfahren angewandt. Synthetisches oder mittels IC-16 präzipitiertes zellulär sekretiertes A β wird zunächst mittels SDS-Page aufgetrennt. Im folgenden Schritt erfolgt die Visualisierung durch die Western-Blot-Methode, wobei als Primärantikörper der zu testende Überstand verwendet wurde.

Material:

Synthetisches A β_{1-42} und A β -S8C

Zellulär sekretiertes A β_{1-42} und A β -S8C

1. Vorbereitung der Proben:
 1. Verdünnen von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ reinem A β_{1-42} und S8C-A β 1:100 mit PBS
 2. 20 μL dieser verdünnten Lösung in 380 μL (1:1) PBS/Tris-Tricine-Proben-Puffer
Dies entspricht bei 20 μL Lösung pro Bande, 10 ng A β pro Bande.
2. Kochen der Eppis bei 100 °C für 5 min
3. wie im Kapitel „SDS-Page“ beschriebene Vorbereitung des Tris-Tricine-Gels
4. erste Tasche des Gels mit 2 μL des *Page Ruler Prestained* (Marker) befüllen, die restlichen mit je 20 μL der synthetischen/zellulär sekretierten A β -Lösung
5. Gellauf bei 140 V-160 V für ca. 1 $\frac{1}{2}$ h

2.13 Western Blot

Für die Visualisierung von immunpräzipitiertem A β und im Rahmen der Stripe-Analysen wurde die Western-Blot-Technologie angewandt. Im Western Blot werden mittels SDS-PAGE aufgetrennte Proteine unter Aufbau eines elektrischen Feldes aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Während des Transfers bleibt die ursprüngliche eindimensionale Auftrennung erhalten.

Nach Inkubation mit einem zur untersuchten Spezies passenden und gegen die gesuchte Struktur gerichteten Primärantikörper erfolgt die eigentliche Visualisierung der Ergebnisse durch einen Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper. Durch eine chemische Reaktion bei in Kontakt treten von Peroxidase mit Luminol wird über Katalyse von Oxidationsprozessen schwaches Licht mit einer Wellenlänge von 428 nm emittiert. Mithilfe von Fotopapier werden schwach leuchtenden Banden abgebildet. Die Intensität des Lichtes ist proportional zur Menge der gebundenen Sekundärantikörper, welche in Relation zur Menge des Primärantikörpers steht.

Material:

Amersham Hyperfilm	Amersham	RPN2103K
Amersham Protran 0,2 μ m NC	GE Healthcare	10600001
DPBS	Gibco	14190-094
ECL tm Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare	RPN2232
Entwicklermaschine	Cavomat	2000IR
POD Goat anti-Maus-IgG Sekundärantikörper	Pierce	31444
Skim Milk Powder	Oxoid	LP0031
Transfer-Puffer		
Trans-Blot Cell für Westernblot + Zubehör	Bio-Rad	179-3946
Whatman Blottingpapier GB0003	Whatman	10426890
4G8 Antibody α A β ₁₇₋₂₄	Biologend	800701

Durchführung Western-Blot:

1. Whatman-Papier und Membran zurechtschneiden
2. die Plastikfassung des Gels an den Seiten aufbrechen und das Gel entnehmen
3. die Transfer-Kassette in folgender Reihenfolge aufbauen: Wattman-Papier, Gel, Membran, Wattman-Papier. Dabei darauf achten, dass die Lagen zu jederzeit mit Puffer befeuchtet und blasenfrei sind.
4. Lauf des Blots bei 400 mA „const.“ für 2 Stunden bei 4 °C
5. die Membran in eine Glasschüssel umlagern und mit einem 1:1-Gemisch Wasser/PBS bedecken und für 10 min in der Mikrowelle auf höchster Stufe kochen. Hierdurch werden Epitope im synthetischen bzw. zellulär exprimierten A β nach möglichem Zusammenfallen erneut für den Antikörper zugänglich gemacht [150].
6. Danach Blocken der freien Bindungsstellen der Membran mit 5% Milchpulver in PBST für eine Stunde unter kontinuierlicher Bewegung, um unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers vermeiden
7. die Block-Lösung verwerfen und die Membran mehrmals mit reinem Wasser abspülen bis die Flüssigkeit frei von Milchbestandteilen ist
8. Inkubation mit dem Primärantikörper (Bei der IP: 4G8 *monoclonal antibody* (1:500), beim Stripe-Verfahren: Überstand) bei 4 °C über Nacht bei kontinuierlicher Bewegung

Visualisierung der Ergebnisse:

1. Entnahme des über Nacht (bei 4 °C) auf dem Wackeltisch zur Inkubation gelagerten Blots
2. Abdekantieren des Primärantikörpers und Wiedereinlagerung bei -80 °C
3. Drei Mal waschen mit PBST auf dem Wackeltisch für je 10 min
4. 1 μ L Zweitantikörper (POD Goat anti-Mouse Antibody; 1:25000) in 25 mL PBST und über die Membran geben, für 1 h Inkubation unter ständiger Bewegung bei Raumtemperatur
5. dreimaliges Waschen mit PBST auf dem Wackeltisch für je 10 min
6. Membran auf Klarsichtfolie legen und Entwicklerlösung (0,5 mL Lösung A (*Peroxid Solution*) + 0,5 mL Lösung B (*Luminol Enhancer Solution*)) auf der Membran verteilen

7. Folie zuklappen, mit Papiertuch die Flüssigkeit herausdrücken und an allen Seiten verschweißen

In der Entwicklungskammer:

8. Membran in die Belichtungsplatte legen, Belichtungsfilm darauflegen und verschließen
9. nach ausreichend Belichtungszeit (1 s, 3 s, 1 min, 3 min, 5 min, 10 min) Platte öffnen und den Film abnehmen
10. den Film in die Entwicklermaschine legen und warten bis der entwickelte Film auf der gegenüberliegenden Seite ausgeworfen wird

2.14 IgM-Aufreinigung aus Hybridoma-Medium

Um unspezifische Reaktionen anderer Antikörper im Überstand zu verringern wurden die Antikörper aus einer größeren Menge Überstand isoliert. Hierbei kam das gleiche Prinzip wie bei der Immunpräzipitation zu tragen. Der Überstand wurde über eine mit IgM-Agarose gefüllte Säule gegeben, aus der die herausgefilterten Antikörper final eluiert und aufgefangen wurden.

Material:

Spritze

Watte-Papier

anti- μ chain Agarose

Sigma A4540

Trisbase pH 8,5

Merck 1.08382.2500

Elutionspuffer

NaN₃

Sigma S8032

Nano-Drop

Vorbereiten der Säule:

1. Dickes Whatman-Papier auf Spritze zuschneiden und flach an den Boden der Spritze drücken
2. Vorlegen von 5-10 mL TBS in eine Spritze/Säule
3. Hinzufügen von 1-2 mL anti- μ chain Agarose (Sigma A4540; zuvor über Nacht bei 4 °C mit Hybridoma-Überstand inkubiert)
4. Auffüllen mit TBS und flach mit Watte bedecken
5. Waschen mit ca. 20-30 ml TBS bei 1 ml/min

Eluieren des Antikörpers:

1. Einfüllen von ca. 10 mL Elutionspuffer
2. Tröpfchenweises Auffangen des Eluats in Eppis, um die Verdünnung möglichst gering zu halten
3. Wiederholen des Vorganges bis Antikörper ausgewaschen sind
4. Neutralisieren der Eluate mit 200 mM Tris pH 8,5 und Versetzen mit 10 mM NaN_3 zur Konservierung und Schutz vor möglicher Kontamination durch Bakterien oder Funghi
5. Neutralisieren der Agarose-Beads in der Säule mit TBS

Konzentrationsbestimmung des Antikörpers

1. Einschalten des Nano-Drop Gerätes
2. Kalibrieren mit einem Tropfen destilliertem Wasser
3. Nach Einstellen auf Messwert „IgG“ Eichung mit einem Tropfen PBS als Nullwert
4. Messen der Probe

2.15 Isotypisierung des Antikörpers

Material:

IsoStrip	Roche	1493027
DPBS	Gibco	14190-094

1. Pipettieren von 150 μ L des frischen Überstandes in das Probenröhrchen des Kits
2. Inkubation unter leichter Bewegung für 30 s bei Raumtemperatur
3. Eintauchen des Teststreifens nach Anleitung
4. Inkubation für 1 min bei Raumtemperatur
5. Ablesen des Testergebnisses nach 5-10 min

2.16 Durchführung von Hirnschnitten

Zur Testung der Klone *in vivo* wurden immunhistologische Präparate von Maushirnen angefertigt. Es wurde eine KO (*Knock-Out*)-Maus, eine S8C-Maus und eine CRND8-Maus zur Kontrolle verwendet. Die S8C- bzw. tgDimer Maus exprimiert humanes APP₇₅₁ mit der Dimermutation innerhalb der A β -Sequenz (S679C) [105]. TgCRND8 Mäuse exprimieren humanes APP₆₉₅ mit der familialen schwedischen (K670N/ M671L) und Indiana (V717F) Mutation unter Kontrolle eines syrischen Hamster-Prion-Gen (haPrP) Promotors. [151]. In den *Knock-Out*-Mäusen waren die Allele für APP homozygot ausgeschaltet. Die Mäuse waren im Alter von 11 bis 27 Wochen und wurden unter Standardlaborbedingungen mit Licht von 7 Uhr bis 19 Uhr und Essen und Trinken *ad libitum* gehalten. In Vorbereitung auf das Experiment wurden mit Dank an das Labor Korth die Maushirne heraus präpariert sowie das dazu gehörende Mausserum aufgefangen. Nach Entwässerung wurden die Hirnhälften auf Kork platziert und zur Lagerung bei -80°C eingefroren. Vor der immunhistologischen Färbung mussten die Gehirne zurechtgeschnitten und auf Objektträgern fixiert werden.

Material:

Dako Antibody Diluent	Agilent	S0809
Eukitt	Sigma	03989

Hämalaun	Sigma	109249
H ₂ O ₂ in PBS (0,3%ig)		
Korkplatte		
Kryostat		
Präparierte Maushirnhälfte		
N-Histophine [®] Mousestain Kit	Nichirei	414321F
Objektträger „ <i>superfrost ultra plus</i> “	Thermo Scientific	10417002
O.C.T. Compound Cryostat Embedding Medium	Scigen	23.730-625
Paraformaldehyd in PBS (4%ig)		

Anfertigen von Kryoschnitten:

1. Zur Lagerung gefrorene Probe auf Kork auf der der Korkhalterung mittels O.C.T. Einbett-Medium fixieren und im Kryostat einspannen
2. Abschneiden eines 8 µm dicken Hirnschnittes
3. Entfaltung des Schnitts im Wasserbad
4. Aufnahme auf Objektträger
5. Trocknung bei Raumtemperatur für 60 min

Fixierung der Kryoschnitte:

1. Getrocknete Objektträger in 4% Paraformaldehyd-PBS-Lösung auf Eis inkubieren
2. 2 Mal in PBS waschen
3. Zur Inaktivierung der endogenen Peroxidase 0,3%iger H₂O₂-Lösung in PBS für 10 min inkubieren
4. 2 Mal in PBS waschen

Anfärben der Kryoschnitte:

1. Vorsichtiges Säubern des Bereichs um die auf dem Objektträger aufgetragenen Hirnschnitte mit einem Tuch
2. Auftragen von 2 Tropfen des *Blocking Reagent A* auf jeglichen Hirnschnitten. Diese sollten vollständig mit der Lösung bedeckt sein

3. Inkubation bei Raumtemperatur für 60 min
4. 3 Mal für 5 min in frischem PBS waschen
5. Vorsichtiges Säubern und Trocknen des Bereichs um die Hirnschnitte mit einem Tuch
6. 2 Tropfen des zu testenden Maus-Antikörpers gelöst in 400 µL Antibody Diluent, der Positivkontrolle und der Negativkontrolle auf die dazu gehörigen Präparate. Die Hirnschnitte sollten vollständig mit Lösung bedeckt sein.
7. Inkubation bei Raumtemperatur für 60 min
8. 3 Mal für 5 min in frischem PBS waschen
9. Vorsichtiges Säubern und Trocknen des Bereichs um die Hirnschnitte mit einem Tuch
10. Auftragen von 2 Tropfen des *Blocking Reagent B* auf alle Hirnschnitte. Diese sollten vollständig mit Lösung bedeckt sein.
11. Inkubation bei Raumtemperatur für 10 min
12. 3 Mal für 5 min mit frischem PBS waschen
13. Säubern und Trocknen des Bereichs um die Hirnschnitte mit einem Tuch
14. Auftragen von 2 Tropfen *Simple Stain Mouse MAX PO* (Universales Immunoperoxidase Polymer) auf alle Hirnschnitte. Die Präparate sollten vollständig bedeckt sein.
15. Inkubation bei Raumtemperatur für 10 min
16. 3 Mal für 5 min mit frischem PBS waschen
17. Vorsichtiges Säubern und Trocknen des Bereichs um die Hirnschnitte mit einem Tuch
18. Auftragen von 2 Tropfen *Chromogen/Substrate Reagent* auf alle Hirnschnitte. Diese sollten vollständig mit Lösung bedeckt sein.
19. 3 Mal für 5 min in destilliertem Wasser waschen
20. Kurze Gegenfärbung mit Hämalaun
21. Dehydratation in einer Reihe Ethanol in aufsteigender Konzentration: 70% Ethanol → 96% Ethanol → 100% Ethanol → Xylol
22. Eindecken mit Eukitt®

3 Ergebnisse

3.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Name	Immunisiert mit	ELISA	Immunpräzipitation	Stripes	Iso-Typ
4H8	S8C-A β in PrnP-knock out Mäusen [152]	Spezifität für synthetisches S8C-A β	Spezifisch für zelluläres S8C-A β	Synth. A β : nicht-spezifische Bindung an A β (S8C>wt) Zell. A β : spezifisch für monomeres A β	IgM _K
7A12	S8C-A β in PrnP-knock out Mäusen	Affinität gegenüber synthetischem S8C-A β , geringe Reaktion auf wt-A β .	Spezifisch für zelluläres S8C-A β	Synth. A β : nicht-spezifische Bindung an A β (wt>S8C). Zell. A β : spezifisch für monomeres A β	IgM _K
17F4.G9	A β ₁₋₁₆ in PrnP-knock out Mäusen	Spezifisch für HSA-A β , nicht-spezifische Bindung an S8C- und wt-A β	Nicht-spezifische Bindung an A β	nicht-spezifische Bindung an synthetisches und zellulär sekretiertes A β . Signal im 6 kDa-Bereich.	IgG _{b2}
<p>Aβ, β-Amyloid; HSA- Aβ, β-Amyloid gekoppelt an humanes Serumalbumin; synth., synthetisches; PrnP, Prion-Protein; wt, Wildtyp; zell., zellulär sekretiert.</p>					

3.2 Detektierung A β ₄₂-S8C-Dimer-sensitiver Klone

Aus den zwei mit S8C-A β -Dimeren immunisierten Mäusen wurden insgesamt 490 Klone gewonnen. Zum Nachweis einer S8C-A β -Dimer-spezifischen Sensitivität wurden diese Klone im ELISA im Vergleich zu Platten mit bovinem Serumalbumin (BSA) getestet. Als Negativkontrolle wurde MEM-Medium ohne Zusätze und als Positivkontrolle Mausserum und MEM-Medium versetzt mit Antikörper IC-16 verwendet. Die Positivität der Reaktion wurde über die Absorption determiniert (Tabelle 1). Der Cut-off-Wert der Absorption lag bei 0,1. Einzig Klone, deren Reaktion auf A β den Cut-Off überschritt, wurden als positiv gewertet. Klone, deren Reaktion sowohl auf A β als auch auf BSA über dem Cut-off lagen, wurden nicht als positiv gewertet (Diagramm 1). Insgesamt 115 Klone zeigten eine positive Reaktion. Die restlichen 375 Klone wurden verworfen.

Tabelle 1: Beispielhafte Darstellung der ELISA-Auswertung.

Zur Untersuchung der Sensitivität auf A β wurden die Klone im ELISA im Vergleich zu BSA untersucht. Die Auswertung erfolgte nach der Stärke der

Klon	A β	BSA	Wertung
A	0,4588	0,0781	positiv
B	0,1943	0,2305	negativ
C	0,0618	0,0781	negativ

Absorption. Der Cut-off-Wert wurde auf 0,1 festgelegt. Klon A zeigt eine alleinige positive Reaktion auf A β . Er wird insgesamt positiv gewertet. Klon B zeigt eine positive Reaktion auf A β und auf BSA. Er wird insgesamt negativ gewertet. Klon C zeigt keine positive Reaktion und gilt als negativer Klon. Absorption: 450 nm. Fett gedruckt, Klone mit Absorption >0,1. A β , Amyloid- β ; BSA, Bovines Serum Albumin.

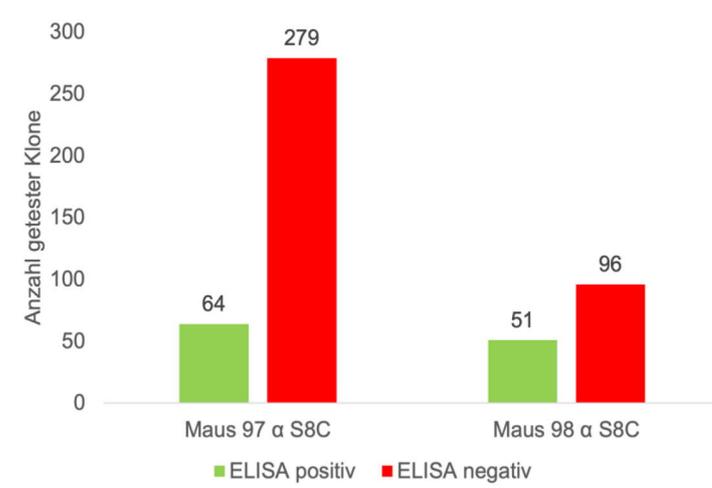


Diagramm 1: Graphische Darstellung der im ELISA getesteten Klone. Gezeigt werden die Anzahl der S8C-spezifischen positiv (grün) und negativ (rot) getesteten Klone.

3.3 Differenzierung zwischen A β -Dimer-spezifischen und non-spezifischen Antikörpern

Die Bestimmung der unterschiedlichen Spezifität gegenüber A β ₄₂-S8C Dimeren und A β ₄₂-Monomeren wurde ebenfalls mittels ELISA evaluiert. Dazu wurden auf je einer Maxisorp-Platte 0,5 μ g/Well synthetisches A β ₄₂-S8C und 0,5 μ g/Well A β ₄₂-Wildtyp sowie reines BSA fixiert und über Nacht mit Hybridoma-Überstand inkubiert. Als Negativkontrolle wurde MEM-Medium ohne Zusätze und als Positivkontrolle Mausserum und MEM-Medium versetzt mit Antikörper IC-16 verwendet. Mithilfe einer enzymatischen Farbreaktion wurde die Bindungsaffinität über das Ausmaß der Absorption determiniert (Diagramm 2). Klone mit einem Signal bei A β -S8C oder Wildtyp-A β galten spezifisch für die jeweilige A β -Art. Klone mit hoher Absorption für S8C- und wt-A β galten als nicht-spezifisch. Sie identifizieren A β , aber nicht exklusiv Dimere. Klone mit Reaktion auf BSA wurden nicht gewertet und verworfen.

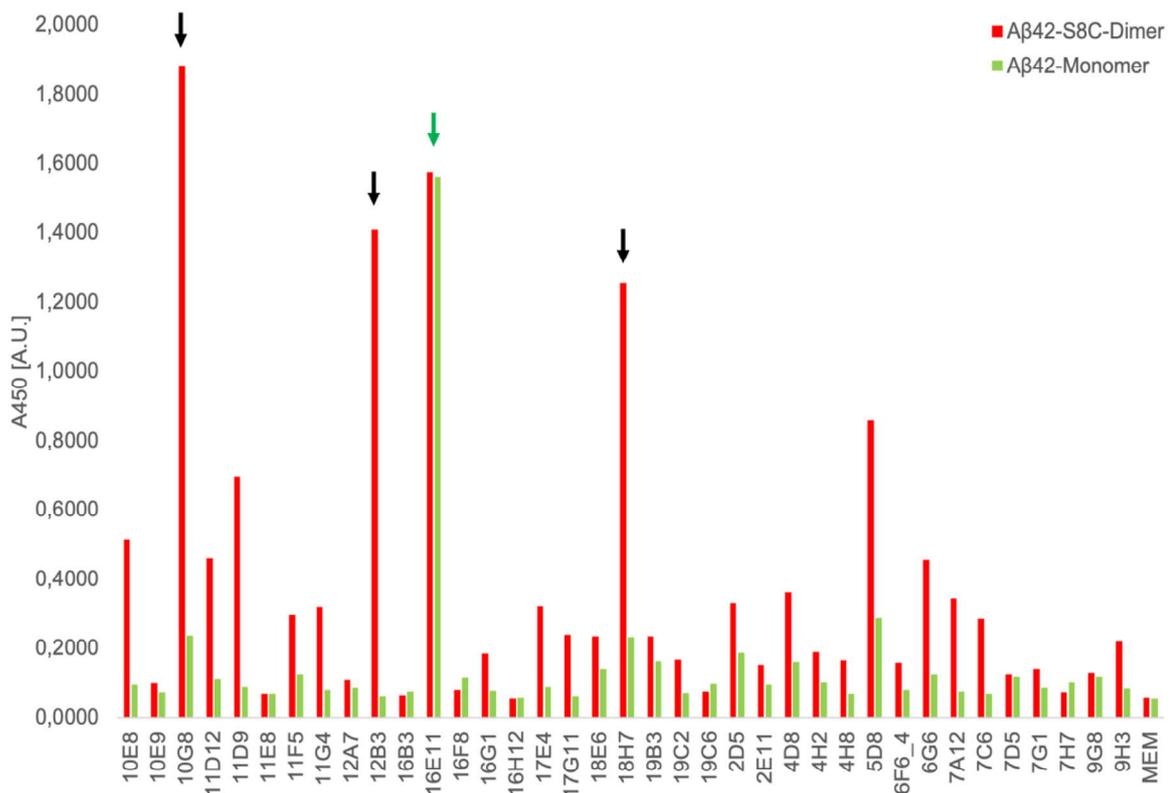


Diagramm 2: Fluoreszenzmessung. Graphisch dargestellt ist die Höhe der Absorption äquivalent zur Stärke der ELISA-Reaktion. Die rote Säule spiegelt die Affinität der Bindung des Antikörper-Klons an A β ₄₂-S8C Dimere, die grüne Säule die an A β ₄₂-Monomere wider. Klone mit hoher Affinität gegenüber A β ₄₂-Dimeren sind mit schwarzen Pfeilen markiert, der Klon mit einer hohen Affinität gegenüber A β ₄₂-Monomeren und Dimeren mit einem grünen Pfeil. Ordinate: A.U., *Absorbance Unit*

Es konnten einige potente Klone mit hoher Spezifität für A β ₄₂-S8C-Dimeren und potente Klone mit Affinität für beide A β -Spezies isoliert werden.

3.4 Selektion der prominentesten Klone

Von den 115 im Primär-ELISA selektierten Klonen wurden nach Differenzierungs-ELISA acht Klone zur weiteren Untersuchung ausgewählt (4H8, 7A12, 12B3, 11F5, 11G4, 10G8, 18H7, 16E11). Unter den erst getesteten Klonen galten nach erster Durchsicht 10G8 und 11F5 als prominenteste. Trotz eines über dem Cut-Off liegenden Wertes in der BSA-Absorption wurde der Klon 10G8 bei hoher Spezifität für S8C-A β zur weiteren Testung verwendet (Tabelle 2). Des Weiteren zeigten sich die Klone 4H8 und 7A12 in einer ersten IP als besonders vielversprechend.

Darüberhinausgehend wurde im Rahmen meiner Arbeit nach Durchsicht noch nicht weiter verfolgter Klone der Arbeitsgruppe Korth 17F4.G9 zur weiteren Untersuchung herangezogen. Dieser Klon entstand aus einer Immunisierung mit A β ₁₋₁₆ in PrnP-*Knock-Out* Mäusen. In zuvor durchgeführten ELISA- und ELIFA (*Enzyme-linked Immuno-Filtration Assay*) -Untersuchungen zeigten sich eine starke Affinität bezüglich A β ₁₋₄₀ und A β ₁₋₄₂.

Tabelle 2: Ausschnitt der ELISA-Ergebnisse der

getesteten Klone. Die Klone wurden im ELISA auf ihre Sensitivität bezüglich dimerem S8C- und monomerem wt-A β gegenüber BSA untersucht. Die Auswertung erfolgte nach Stärke der Absorption. Der Cut-off-Wert wurde auf 0,1 festgelegt. 4H8, 7A12, 12B3, 11F5 und 11G4 zeigten eine

Klon	S8C-A β	wt-A β	BSA
4H8	1,2319	0,0774	0,0986
7A12	0,4016	0,1516	0,0729
12B3	0,3370	0,0627	0,0559
11F5	0,2790	0,1259	0,0775
11G4	0,1963	0,0808	0,0655
10G8	1,1042	0,2371	0,1309
18H7	0,6098	0,2334	0,1280
16E11	1,8315	1,5625	0,0560
17F4.G9	2,5016	2,5125	0,0774
MEM	0,0919	0,0831	0,0724
IC-16	2,0582	2,2541	0,0614
Mausserum	2,2784	1,7642	0,0667

höhere Affinität für S8C-A β . 7A12 reagierte auch zu geringem Maße auch auf wt-A β . 16E11 und 17F4.G9 zeigten sich positiv, aber ohne spezifische Affinität gegenüber einer der A β -Spezies. 10G8 und 18H7 reagierten neben einer höheren Affinität für S8C-A β auch zu geringem Maße auf BSA. Aufgrund der ausgeprägten positiven Reaktion auf S8C-A β wurden sie dennoch zur weiteren Untersuchung verwendet. Die Negativkontrolle mit MEM-Medium zeigte eine negative Reaktion. Die Positivkontrollen mit IC-16 und Mausserum zeigten positive Reaktionen auf S8C- und wt-A β . Eine Reaktion auf BSA viel negativ aus. Absorption: 450 nm. A β , Amyloid- β ; BSA, Bovines Serum Albumin; wt, Wildtyp.

3.5 Immunpräzipitation

Zur weiteren Selektion der Klone wurde die Immunpräzipitation angewandt. Zellulär sekretiertes wt-A β und S8C-A β wurde mit zuvor an Agarose-Beads gekoppelten Antikörper-Überständen über Nacht inkubiert. Als Positivkontrolle wurde IC-16 verwendet. Reines MEM-Medium versetzt mit Agarose-Beads fungierte als Negativkontrolle. Die Auftrennung und Visualisierung der Proteine erfolgte mittels SDS-Page und Western Blot. Als Primärantikörper wurde der Antikörper 4G8 gegen die Mittelregion der A β -Sequenz verwendet. Zur Visualisierung der Ergebnisse wurde ein POD (Peroxidase) α Maus-Antikörper verwendet. Die Klone 4H8, 10E9, 11G4 und 7A12 zeigten deutliche Banden im dimeren Bereich (Abb. 8). Banden im monomeren Bereich zeichneten sich nicht ab. Die Positivkontrolle zeigte Banden im monomeren und dimeren Bereich. Die Negativkontrolle blieb frei von Signalen. Die Expositionszeit betrug 20 Sekunden. Auf wiederholt durchgeführte Immunpräzipitationen der einzelnen Klone wird im Näheren in den dazugehörigen Kapiteln eingegangen.

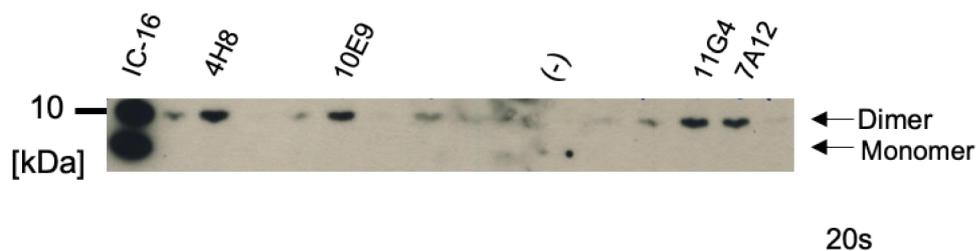


Abb. 8: Visualisierte Ergebnisse der Immunpräzipitation und des Western Blots. Präzipitiert wurden wt-A β und S8C-A β . Die Klone 4H8, 10E9, 11G4 und 7A12 zeigen deutliche Signale im dimeren Bereich. Im monomeren Bereich zeigten sich keine Signale. Die Positivkontrolle mit IC-16 zeigte Banden im monomeren und dimeren Bereich. Die Negativkontrolle mit reinem MEM-Medium blieb frei von Signalen. Zur Übersicht wurden nur die markanten Klone gekennzeichnet. Ordinate: Molekulargewicht in kDa. Expositionszeit: 20

3.6 Direkter Nachweis von synthetischen und zellulären A β -Spezies

Zur Überprüfung des direkten Nachweises von synthetischem A β wurde das *Stripe*-Verfahren angewandt. Synthetisches A β_{42} -S8C Dimer und A β_{42} -Monomer wurden jeweils in einer Bande im SDS-Page aufgetrennt und im Rahmen des Western-Blot-Verfahrens über Nacht mit den Hybridoma-Überständen inkubiert. Zur Darstellung der Ergebnisse wurde ein POD α Maus-Antikörper verwendet. Als Positivkontrolle wurde der Antikörper 4G8 und als Negativkontrolle MEM-Medium ohne Zusätze verwendet.

In einem abgewandelten Versuchsaufbau wurde synthetisches A β durch zellulär sekretiertes A β ersetzt. Dieses wurde zuvor wie oben beschrieben aus CHO-Zellen gewonnen und in einem weiteren Schritt mittels IP mit dem Antikörper IC-16 präzipitiert.

Die Ergebnisse der einzelnen Klone werden in den dazugehörigen Kapiteln genauer erläutert.

3.7 Hirnschnitte

Zu Beginn der Studie zeigte insbesondere Klon 10G8 in den ELISAs eine hohe Spezifität für dimeres S8C-A β . Weiterhin zeigte Klon 11F5 eine höhere Spezifität für dimeres A β gegenüber monomerem A β (s. Tab. 2). Zur ausgedehnteren Testung wurden Hirnschnitte verschiedener Mäuse mit diesen Antikörpern in aufgereinigter Form als Primärantikörper immunhistochemisch gefärbt (Abb. 9). Es wurde getestet, ob die Klone spezifisch S8C-dimeres A β erkennen. Dazu wurden Hirnschnitte der tgDimer-Maus angefertigt. Diese Maus produziert

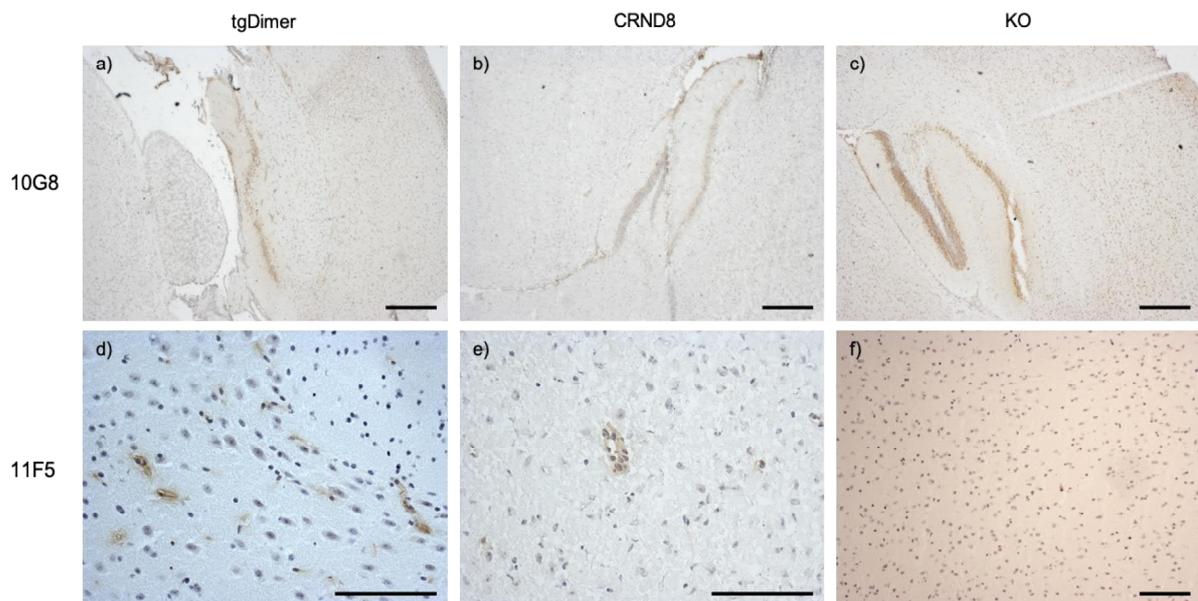


Abb. 9: Immunhistologische Färbung von Hirnschnitten mit 10G8 und 11F5. Zur Testung der Klone wurden Hirnschnitte der tgDimer-Maus angefertigt. Als Positivkontrolle dienten Hirnschnitte einer CRND8-Maus und als Negativkontrolle eine Knock-Out-Maus. Die Klone 10G8 und 11F5 wurden zur immunhistologischen Färbung verwendet. 10G8 zeigte bezogen auf A β keine Färbung (a,b), aber eine dezente Färbung der Hippocampus-Region in den Knock-Out-Schnitten. 11F5 färbte Gewebe im tgDimer- und CRND8-Schnitt um Blutgefäße herum (d, e). Die KO-Kontrolle blieb frei von A β -Anfärbungen (c, f). Messbalken a)-c), f): 200 μ m; d), e): 100 μ m. KO, *Knock-Out*.

lösliche A β -S8C-Dimere ohne Aggregat- oder Plaque-Formationen. Als Positivkontrolle und auch zur Testung einer unspezifischen Bindung an A β wurden Hirnschnitte der CRND8-Maus angefertigt. Diese besitzt eine erhöhte A β -Produktion einhergehend mit einer gesteigerten Plaque-Formation. Als Negativkontrolle wurden Hirnschnitte der KO-Maus ohne Bildung von A β verwendet. Nach immunhistochemischer Färbung mit 10G8 zeigten sich eine dezente Färbung der Hippocampus-Region in allen Schnitten, inklusive KO-Schnitten. 11F5 zeigte Färbungen der Blutgefäße in den Hirnschnitten der tgDimer- und der CRND8-Maus. Die KO-Maus zeigte abgesehen von der Färbung durch 10G8 keine A β -Anfärbungen.

3.8 4H8

3.8.1 Isotypisierung des Antikörpers

Der Antikörper 4H8 entsprach dem Isotyp IgM κ .

3.8.2 Immunpräzipitation

Mittels Immunpräzipitation sollte gezeigt werden, ob eine Spezifität in Bezug auf zelluläres dimeres S8C-A β vorhanden ist. Zur Präzipitation wurden anti- μ Agarose-Beads verwendet. Als Positivkontrolle wurde MEM-Medium versetzt mit A/G-Agarose-Beads und dem Antikörper IC-16 verwendet. Die Negativkontrolle bestand aus reinem MEM-Medium versetzt mit A/G-Agarose-Beads.

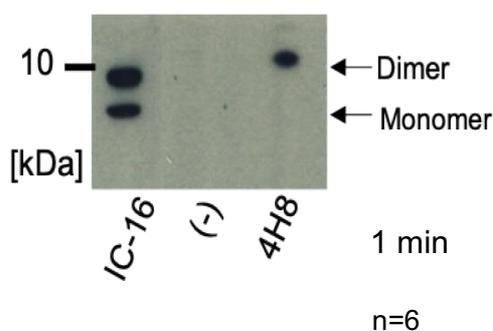


Abb. 10: Immunpräzipitation/Western Blot mit IC-16 und 4H8 Präzipitiert wurde wt-A β und S8C-A β . IC-16 erkennt sowohl monomeres als auch dimeres A β . 4H8 zeigt ein Signal in Höhe der Dimer-Bande. Die Negativkontrolle zeigte kein Signal. Zur Übersicht wurde ein Western Blot exemplarisch dargestellt. Ordinate: Molekulargewicht in kDa. Expositionszeit: 1 Minute. A β , β -Amyloid; n, Anzahl der durchgeführten Versuche; wt, Wildtyp.

4H8 zeigte eine singuläre Bande im Bereich des dimeren A β (Abb. 10). In der Negativkontrolle zeigten sich keine Signale. Die Positivkontrolle zeigte Banden sowohl im Bereich des Dimers als auch des Monomers.

3.8.3 *Stripe*-Verfahren

Im *Stripe*-Verfahren sollte die Funktionalität als Primärantikörper getestet werden. Auch hier wurde unterschieden, ob 4H8 eine Spezifität für dimeres A β , sowohl synthetisch als auch zellulär, aufweist. Zur Positivkontrolle wurde der Antikörper 4G8 eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde MEM-Medium ohne Zusätze verwendet.

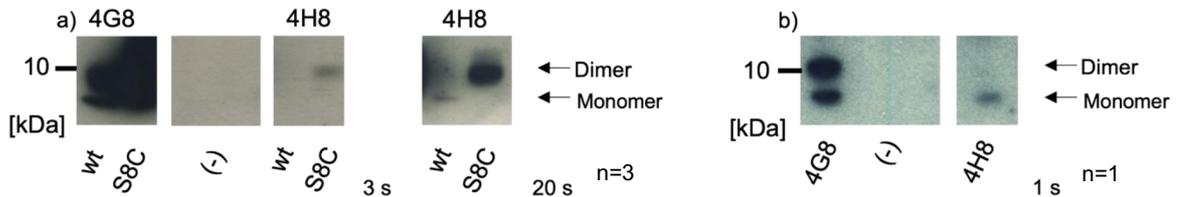


Abb. 11 a) Western Blot mit 4H8 und 4G8 und synthetischem A β . Im SDS-PAGE wurden synthetisches wt-A β und S8C-A β aufgetrennt. 4H8 detektierte nach 3 Sekunden S8C-A β . Die wt-Bande zeigte zu diesem Zeitpunkt kein Signal. Nach 20 Sekunden zeichnete sich ein schwaches Monomer-Signal ab. Die Positivkontrolle mit 4G8 zeigte Signale im Bereich des wt- und des S8C-A β . Die Negativkontrolle blieb frei von Signalen. Ordinate: Molekulargewicht in kDa. **b) Western Blot mit 4H8 und 4G8 und zellulär sekretiertem A β .** Im SDS-PAGE wurden zellulär sekretiertes wt-A β und S8C-A β aufgetrennt. 4H8 detektierte monomeres A β . Die Positivkontrolle mit 4G8 zeigte Banden im monomeren und dimeren Bereich. Die Negativkontrolle zeigte kein Signal. Ordinate: Molekulargewicht in kDa. Expositionszeit: 1 Sekunde. Zur Übersicht wurde ein Western Blot exemplarisch dargestellt. Die nicht diese Arbeit betreffenden Klone wurden herausgeschnitten. Die abgebildeten Ergebnisse stammen vom selben Western Blot. A β , β -Amyloid; n, Anzahl der durchgeführten Versuche; wt, Wildtyp

Im Western Blot mit synthetischem A β (S8C-A β und A β ₁₋₄₂) zeigt 4H8 nach 3 Sekunden Exposition dimeres S8C-A β (Abb. 11a). Nach 20 Sekunden Expositionszeit begann sich eine Bande im A β -Monomer-Bereich abzuzeichnen. Die Negativkontrolle verblieb frei von Signalen. Die Positivkontrolle zeigte Banden im Bereich des monomeren und dimeren A β .

Im Western Blot mit zuvor mit IC-16 präzipitiertem zellulären A β zeigte 4H8 eine Bande im Bereich des monomeren A β (Abb. 11b). In Höhe des dimeren A β zeichnete sich keine Bande

ab. 4G8 wies Monomer- und Dimer-A β nach. Die Negativkontrolle blieb frei von Signalen. Dieser Versuchsaufbau wurde einmalig durchgeführt.

3.9 7A12

3.9.1 Isotypisierung des Antikörpers

7A12 entsprach dem Antikörper-Isotyp IgM κ .

3.9.2 Immunpräzipitation

Wie im Versuch mit 4H8 wurde zelluläres A β aus CHO-Zell-Überstand herauspräzipitiert. Zur Kontrolle wurde wie oben beschrieben eine Positiv- und eine Negativkontrolle angefertigt.

7A12 zeigte eine exklusive Bindung an dimeres S8C-A β (Abb. 12). Eine Bande im Bereich des monomeren Wildtyp-A β zeigte sich nicht. Die Positivkontrolle mit 4G8 wies monomeres und dimeres A β nach. Die Negativkontrolle blieb frei von Signalen.

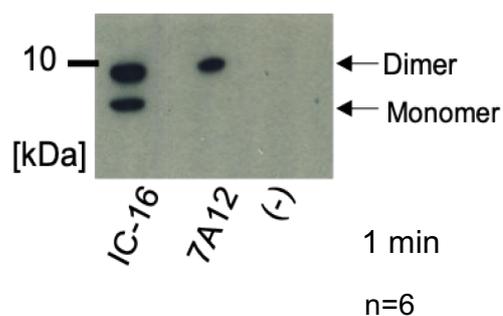


Abb. 12: Immunpräzipitation/Western Blot mit IC-16 und 7A12 Präzipitiert wurde wt-A β und S8C-A β . IC-16 erkennt sowohl monomeres als auch dimeres A β . 7A12 zeigt ein Signal in Höhe der Dimer-Bande. Die Negativkontrolle zeigte kein Signal. Ordinate: Molekulargewicht in kDa. Expositionszeit: 1 Minute. Zur Übersicht wurde ein Western Blot exemplarisch dargestellt. A β , β -Amyloid; n, Anzahl der durchgeführten Versuche; wt, Wildtyp.

3.9.3 Stripe-Verfahren

Im *Stripe*-Verfahren mit synthetischem A β zeigte sich eine ausgeprägte Bande im Wildtyp-Bereich. Eine schwach durchscheinende Bande im dimeren Bereich trat ebenfalls in Erscheinung (Abb. 13a). Mit zellulärem A β zeigte sich eine Bande im Bereich des monomeren Wildtyp-A β (Abb. 13b). Eine Bande im dimeren Bereich zeichnete sich nicht ab. Die Kontrolle mit 4G8 zeigte eine Bande im monomeren und dimeren Bereich. Die Negativkontrolle blieb frei von Signalen. Der Versuchsaufbau mit zellulär sekretiertem A β wurde einmalig durchgeführt.

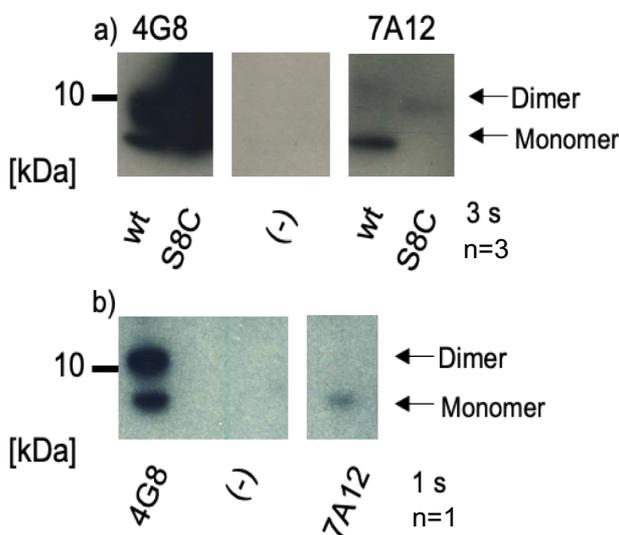


Abb. 13: a) Western Blot mit 7A12 und 4G8 und synthetischem A β . Im SDS-Page wurden synthetisches wt-A β und S8C-A β aufgetrennt.

7A12 detektierte primär wt-A β . Es zeichnete sich eine schwache Bande im Dimer-Bereich ab. Die Positivkontrolle mit 4G8 zeigte Signale im Bereich des wt- und S8C-A β . Die Negativkontrolle blieb frei von Signalen. Ordinate: Molekulargewicht in kDa. Expositionszeit: 3 Sekunden. **b) Western Blot mit 7A12 und 4G8 und zellulär sekretiertem A β .** Im SDS-Page wurden zellulär sekretiertes wt-A β und S8C-A β aufgetrennt. 7A12 detektierte monomeres A β . Im dimeren Bereich zeigte sich kein Signal. Die Positivkontrolle mit

4G8 zeigte Banden im monomeren und dimeren Bereich. Die Negativkontrolle zeigte kein Signal. Ordinate: Molekulargewicht in kDa. Expositionszeit: 1 Sekunde. Zur Übersicht wurde ein Western Blot exemplarisch dargestellt. Die nicht diese Arbeit betreffenden Klone wurden herausgeschnitten. Die abgebildeten Ergebnisse stammen vom selben Western Blot. A β , β -Amyloid; n, Anzahl der durchgeführten Versuche; wt, Wildtyp

3.10 17F4.G9

3.10.1 Isotypisierung

17F4.G9 entsprach dem Isotyp IgG_{b2}.

3.10.2 Immunpräzipitation

In der Immunpräzipitation zeigten sich deutliche Signale nach 2 s Belichtungszeit. Die Banden von monomerem Wildtyp- und dimerem S8C-A β waren gleichermaßen ausgeprägt (Abb. 14). In der Probe mit IC-16 und Protein A/G Agarose zur Kontrolle erschienen erwartungsgemäß zwei Signalbanden. Die Kontrolle mit reinem MEM-Medium und Protein A/G Agarose blieben frei von Signalen.

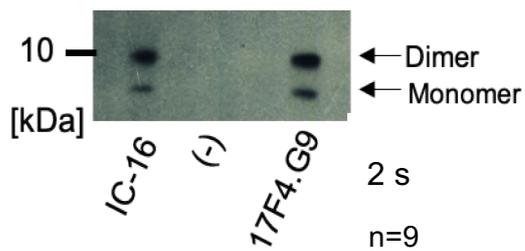


Abb. 14: Immunpräzipitation/Western Blot mit IC-16 und 17F4.G9. Präzipitiert wurde wt-A β und S8C-A β . IC-16 und 17F4.G9 erkennen sowohl monomeres als auch dimeres A β . Die Negativkontrolle zeigte kein Signal. Ordinate: Molekulargewicht in kDa. Expositionszeit: 2 Sekunden. Zur Übersicht wurde ein Western Blot exemplarisch dargestellt. A β , β -Amyloid; n, Anzahl der durchgeführten Versuche; wt, Wildtyp.

3.10.3 Stripe-Verfahren

Im Western Blot mit synthetischem A β zeigten sich Banden im Bereich des monomeren Wildtyp- und dimeren S8C-A β (Abb. 15a). Im Versuch mit zellulär sekretiertem A β trat zusätzlich eine Bande in Höhe von ~6 kD auf (Abb. 15b). Dieser Versuchsaufbau wurde einmalig durchgeführt. Die Signale waren bereits nach sehr kurzer Belichtungszeit (1-3 s) sehr ausgeprägt. Die Kontrolle mit 4G8 zeigte Signale im monomeren und dimeren A β -Bereich. Die Negativkontrolle mit reinem MEM-Medium zeigte keine Signale.

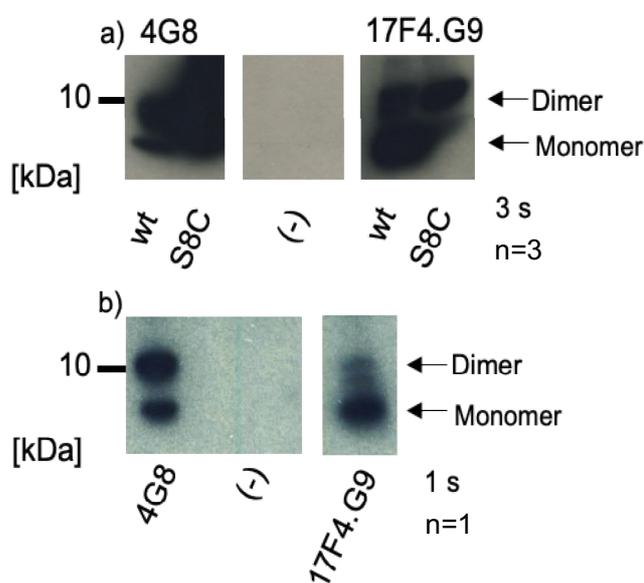


Abb. 15 a) Western Blot mit 17F4.G9 und 4G8 und synthetischem A β . Im SDS-Page wurden synthetisches wt-A β und S8C-A β aufgetrennt. 17F4.G9 detektierte monomeres und dimeres A β . Die Positivkontrolle mit 4G8 zeigte Signale im Bereich des wt- und des S8C-A β . Die Negativkontrolle blieb frei von Signalen. Ordinate: Molekulargewicht in kDa. Expositionszeit: 3 Sekunden. **b) Western Blot mit 7A12 und 4G8 und zellulär sekretiertem A β .** Im SDS-Page wurden zellulär sekretiertes wt-A β und S8C-A β aufgetrennt. 17F4.G9 detektierte monomeres und monomeres A β . Ein weiteres Signal befand sich auf Höhe von

ca. 6 kDa. Die Positivkontrolle mit 4G8 zeigte Banden im monomeren und dimeren Bereich. Die Negativkontrolle zeigte kein Signal. Ordinate: Molekulargewicht in kDa. Expositionszeit: 1 Sekunde. Zur Übersicht wurde ein Western Blot exemplarisch dargestellt. Die nicht diese Arbeit betreffenden Klone wurden herausgeschnitten. Die abgebildeten Ergebnisse stammen vom selben Western Blot. A β , β -Amyloid; n, Anzahl der durchgeführten Versuche; wt, Wildtyp.

4 Diskussion

Zielsetzung dieser Arbeit war die Generierung und Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern gegen A β . Insbesondere lagen konformationsspezifische Antikörper gegen A β -Dimere im Fokus der Suche. Nach Immunisierungen zweier Mäuse und Herstellung von antikörperproduzierenden Hybridom-Zellen mittels Myeloma-Methode wurden 490 auf A β im ELISA positiv reagierende Klone identifiziert. Diese konnten nach Testung mittels Immunpräzipitation und *Stripe*-Verfahren auf zwei Klone reduziert werden. Ein weiterer Klon aus einer zuvor durchgeführten Fusion wurde für diese Arbeit zur Testung hinzugezogen. Die Klone zeigten in den verschiedenen Untersuchungsmethoden zum Teil unterschiedliches Bindungsverhalten gegenüber A β .

4.1 Generierung und Screening von monoklonalen Antikörpern auf der Suche nach A β -Dimer spezifischen Antikörpern

Das ELISA-Verfahren als erste Screening-Methode bietet eine simple Möglichkeit zur simultanen Überprüfung großer Mengen an Klonen auf Reaktivität gegen A β . Eine Unterscheidung, ob die Reaktion aufgrund einer Bindung an ein lineares Epitop oder aufgrund einer konformationsspezifischen Bindung erfolgt, ist damit allerdings nicht möglich. Auch die Unterscheidung, ob es sich um toxische Oligomer-Spezies oder weniger toxische fibrilläre A β -Aggregate handelt, ist nicht möglich.

Seit Anbeginn der Alzheimer-Forschung wurden viele Arbeiten publiziert, in denen Antikörper gegen unterschiedliche A β -Epitope generiert wurden. *Seubert et al.* haben 1992 und *Solomon et al.* 1996 Antikörper gegen lineare Epitope des Amyloid- β Proteins generiert [51, 153]. Hierbei wird innerhalb der Primärstruktur eine bestimmte ununterbrochene Aminosäuresequenz erkannt und gebunden. *Lambert et al.* gelang es 2007 konformationsspezifische monoklonale Antikörper zu generieren, die A β -Oligomere und Fibrillen gegenüber A β -Monomeren unterscheiden konnten [154]. Konformationsspezifische Antikörper erkennen diskontinuierliche Aminosäuresequenzen, die aber eine spezifische räumliche Konstellation aufweisen. Da Amyloid- β mitunter physiologische Aufgaben im menschlichen Gehirn nachkommt, ist es wichtig, diese nicht durch ungerichtete Bindung funktionsunfähig zu machen. Die Diskriminierung zwischen physiologisch wertvollen A β -Spezies und pathophysiologischen A β -Spezies bietet somit einen deutlichen Vorteil in therapeutischer Hinsicht.

Für die Differenzierung der A β -Konformere wurde die Immunpräzipitation angewandt. Die Antikörper werden hierbei mit zellulär sekretiertem, in natürlicher Form vorliegendem monomeren wt-A β oder dimeren S8C-A β inkubiert. Nach Auftrennung mittels SDS-Page ist es möglich zwischen konformationsspezifischen und linearen Antikörper-Bindungen zu unterscheiden. Als weitere Methode wurde der direkte A β -Nachweis mittels *Stripe*-Verfahren mit synthetischem und zellulär sekretiertem A β zu Nutze gemacht. Der Unterschied ist hierbei gegenüber der IP die Denaturierung der A β -Spezies während der Auftrennung. Dies ermöglicht weitere Rückschlüsse auf die Eigenschaften der Antikörper. Zuvor durch ihre Quartärstruktur verdeckte lineare Epitope können exponiert oder im Vergleich mit den Ergebnissen der IP als konformationsspezifisch oder linear bestätigt werden.

4.2 Immunhistologie

Zur weiteren Testung der Klone 10G8 und 11F5 wurden Hirnschnitte von verschiedenen Mäusen angefertigt. 10G8 zeigte eine unspezifische Anfärbung des Hippocampus in allen Schnitten. Dies war überraschend, da sich ebenfalls eine Anfärbung der KO-Maus zeigte, obwohl diese frei von A β war. Anfärbungen von A β -Spezies zeigten sich trotz positiver ELISA-Ergebnisse nicht. 11G5 zeigte ebenfalls trotz positiver ELISA-Ergebnisse keine Anfärbung von A β . Für beide Phänomene kann die Instabilität der an sich malignen Hybridoma-Zellen ursächlich sein. Es besteht die Möglichkeit, dass sich im Rahmen des Anzuchtprozesses und der Subklonierungen von 10G8 ein Antikörper mit unspezifischer Bindung durchgesetzt oder bei 11F5, dass der Klon seine Tätigkeit eingestellt hat. Dies sollte in erneuten ELISA-Testungen und IPs reevaluiert werden.

4.3 4H8 und 7A12

Die Immunisierung mit S8C-A β , gefolgt von weiteren Testungen, erbrachte die zwei vielversprechenden Klone 4H8 und 7A12. 4H8 zeigte im ELISA eine deutliche Spezifität für dimeres A β . 7A12 reagierte sowohl auf wt-A β als auch auf S8C-A β , wobei eine geringe Affinität gegenüber S8C-A β vorlag. In der Immunpräzipitation ließ sich für beide Klone eine Spezifität für dimeres A β nachweisen. Interessanterweise zeigten sowohl 4H8 als auch 7A12 abweichendes Bindungsverhalten beim direkten A β -Nachweis im *Stripe*-Verfahren. Beim Nachweis von synthetischem A β zeigte 4H8 zwar weiterhin eine ausgeprägte Affinität

gegenüber dimerem A β , aber nach längerer Belichtungszeit konnte auch monomeres A β nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass 4H8 zwar spezifischer an S8C-A β bindet, aber auch zum geringen Teil an monomeres A β . Möglich dafür können sich zum Teil überschneidende Epitope mit höherer Konkordanz bei den Dimeren sein. 7A12 zeigte für synthetisches A β eine hohe Affinität für Monomere. Gegenüber zellulär Sekretiertem A β zeigten beide Klone nur noch eine Spezifität für monomeres wt-A β . Für dieses Ergebnis gibt es mehrere Möglichkeiten. Zum einen kann sich durch die zuvor erfolgte Denaturierung der Proteine beim direkten A β -Nachweis die Konformation derart verändert haben, dass bestimmte durch die Quartärstruktur verdeckte Bereiche offen lagen. Je nach Lage der Epitope kann sich die Affinität durch eine bessere oder schlechtere Erreichbarkeit verändert haben. Zum anderen können beim zellulär sekretiertem A β posttranslationale Konformationsänderungen aufgetreten sein, die ebenfalls Auswirkungen auf das Epitop nehmen können. Ferner könnten die Antikörper für ihre Isoform IgM (s.u.) typisches polyreaktives Verhalten zeigen und bei denaturiertem A β auch lineare Epitope erkennen. Im Rückschluss liegt es nahe, dass 4H8 und 7A12 unterschiedliche Epitope erkennen und dass zellulär sekretiertes A β durch die biologische Prozessierung einer höheren Variabilität unterliegt als synthetisch hergestelltes A β . Als weitere Untersuchung zur Validierung der Ergebnisse wäre ein Epitopen-Mapping sinnvoll.

4H8 und 7A12 stellten sich in der Isotypisierung als Antikörper der Klasse IgM heraus. Warum keine IgG-Antikörper generiert werden konnten, bleibt unverstanden. *O'Nuallain et al.* veröffentlichten 2011 eine Studie über drei Antikörper gegen synthetisches A β -Dimer, welche den gleichen Isotyp aufwiesen [155]. IgM-Antikörper besitzen vor allem durch ihre Größe spezielle Eigenschaften. Sie aktivieren das Komplementsystem, wofür mehrere konstante F_c-Regionen in unmittelbarer Nähe benötigt werden. Die Größe ermöglicht Bindungen an Regionen, die weiter auseinander liegen, sodass im Vergleich zu IgG-Antikörpern weitere konformationsspezifische Epitope erkannt werden können. 2007 wurde von *Banks et al.* eine Studie veröffentlicht, in der sie einen IgM-Antikörper gegen A β generieren konnten, der die Blut-Hirn-Schranke der getesteten Mäuse überwand [156]. IgM besitzen eine geringere Affinität gegenüber ihren Zielantigenen, welche aber durch die pentamere Struktur und die damit einhergehende Avidität ausgeglichen wird [157]. Durch die geringe Affinität fallen IgM dennoch häufig polyreaktiv aus, so dass sie im Vergleich mit IgG-Antikörpern generell weniger nützlich im Rahmen von ELISA-Untersuchungen oder Immunpräzipitationen sind. Auch wenn IgM in Hinsicht auf Überwindung der Blut-Hirn-Schranke und zusätzlicher Aktivierung des Komplementsystems einen attraktiven Ansatz für Immuntherapien bieten, sollte weiterhin versucht werden, einen IgG-Antikörper mit gleicher Spezifität wie 4H8 oder 7A12 zu

generieren. IgG-Antikörper besitzen trotz einer geringeren Avidität bei zwei Bindungsstellen gegenüber den zehn des IgM eine höhere Affinität sowohl für ihre Zielstruktur als auch für den passenden F_c-Rezeptor, welcher zu einer Immunreaktion führt. Des Weiteren bieten sie aufgrund ihrer hohen Produktionsrate, einfachen Aufreinigung und gut modifizierbaren Stabilität einen biotechnologischen Benefit. IgG-Antikörper sind insgesamt für diagnostische und therapeutische Ansätze geeigneter.

4.4 17F4.G9

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein weiterer Klon aus einer zuvor durchgeführten Fusion mit Zellen gegen A β ₁₋₁₆ immunisierter Mäuse zu weiteren Untersuchungen herangezogen. Dieser zeigte konstante Ergebnisse in den IPs und im direkten A β -Nachweis. A β -Monomere und Dimere wurden gleichermaßen erkannt. Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass ein lineares Epitop entsprechend dem verwendeten Immunogen vorliegt. Sowohl im natürlichen als auch im denaturierten Zustand wird zellulär sekretiertes A β erkannt.

Im *Stripe*-Verfahren mit präzipitiertem zellulär sekretiertem A β zeigte sich interessanterweise eine Bande auf Höhe von ~6 kDa. Das P3 Peptid zeigt ein Molekulargewicht, welches unter dem des A β -Monomer liegt. Des Weiteren wurde zur Generierung des Antikörpers mit A β ₁₋₁₆-Fragmenten gearbeitet. P3 resultiert aus der Prozessierung von APP durch α - und γ -Sekretase und besitzt den A β -Abschnitt 17-42, was die Detektion mittels 17F4.G9 unwahrscheinlich macht. Neben dem P3 Peptid entsteht während der Spaltung von APP durch γ und ε -Sekretase die APP-intrazelluläre Domäne (AICD, *APP intracellular domain*), welche ein Molekulargewicht von 6 kDa besitzt [158, 159]. Da sich AICD außerhalb der A β -Sequenz befindet, ist die Detektion anhand von 17F4G9 in diesem Fall ebenfalls unwahrscheinlich. Kreuzreaktionen mit den verschiedenen APP-Fragmenten zeigen sich unter den etabliertesten A β -Antikörpern und wären in diesem Fall eine Erklärung [160]. *Welzel et al.* wiesen in ihren Versuchen eine niedermolekulare Spezies im Rahmen des A β -Spaltungsprozesses nach, die N-Terminal verlängerten Peptide (NTE-A β , engl. *N-terminally extended-A β*). Diese zeigten sich im Nachweis mit einem pan-A β -Antikörper, ließen sich aber nicht mit einem Antikörper gegen das exponierte Asp1 am N-Terminus von A β nachweisen [161]. Eine weitere Möglichkeit der Entstehung der Bande ist ein proteolytischer Spaltprozess des APP neben dem amyloidogenen und nicht-amyloidogenen Weg. 2015 beschrieben *Willem et al.* einen alternativen Spaltprozess, die η -Spaltung. APP₆₉₅ wird

zwischen den Aminosäuren 504 und 505 gespalten, wodurch CTF- η entsteht, welches konsekutiv von α - oder β -Sekretase gespalten wird. Hierbei entstehen A η - α und A η - β . Dies sind Peptide, die in *ex* und *in vivo* Experimenten die LTP inhibierten und sich abweichend von N-Terminal verlängerten Peptiden darstellten [162]. Bei der ~ 6 kDa-Bande kann es sich sowohl um ein N-Terminal verlängertes Peptid bzw. ein allgemein verlängertes A β -Peptid oder eine Spezies im Rahmen eines alternativen Spaltprozesses handeln. Unterstützend für diese These ist das alleinige Auftreten der Bande im Versuch mit zellulär sekretiertem A β im Vergleich zum Versuch mit synthetisch hergestelltem A β , in dem diese Bande nicht auftritt. Insgesamt bleibt der Ursprung dieser Bande dennoch unverstanden. Dieser Versuch wurde einmalig durchgeführt. Zur genaueren Untersuchung sollte dieser erneut durchgeführt werden.

4.5 Instabilität bei Fusion und Subklonierungen

Zur Generierung der Antikörper wurde die Hybridoma-Methode nach Köhler *et al.* [118] verwendet. Splenozyten von zuvor immunisierten Mäusen werden mit malignen Myelomzellen fusioniert, wodurch immortale und konstant Antikörper produzierende Hybridom-Zellen entstehen. Auch wenn sich aufgrund des biologischen Entwicklungsprozesses eine schlechte Voraussagbarkeit der Epitope ergibt, bietet diese Methode eine große Variabilität und Chance, Antikörper gegen diverse und vor allem unbekannte Epitope zu generieren. Des Weiteren erlaubt der *in vivo* Entstehungsprozess eine optimale Zusammensetzung der leichten und schweren Ketten, so dass die sekretierten Antikörper eine hohe Affinität gegenüber dem Zielantigen aufweisen. Auf der anderen Seite gehen in der Arbeit mit lebenden malignen Zellen potenzielle Verluste einher. Ca. 90% der ursprünglichen Zellen und damit der eventuellen Antikörper gehen im Rahmen des Fusions-Prozesses zu Grunde. Außerdem führt die Fusion zweier Zellen zu einem vergrößerten Chromosomensatz, einhergehend mit genetischer Instabilität. Diese ist bereits mit Verwendung von malignen Zellen gegeben, da diese *per se* eine hohe Instabilität aufweisen. Genetische Instabilität führt dazu, dass manche vielversprechenden Klone ihre Antikörper-Produktion einstellen. Dessen ungeachtet präsentierten sich einige Klone erfolgsversprechend.

Durch Subklonierung sollen Klone, die Antikörper gegen das Zielantigen produzieren, herausgelesen und in hoher Reinheit angereichert werden. Hierbei entsteht sowohl ein hoher Reinheitsgrad der Antikörper als auch eine hohe Stabilität der Antikörper produzierenden Zellen. Dennoch kommt es auch zu hohen Verlusten, da die Subklonierung auf Verdünnung

des Antikörper beinhaltenden Überstandes beruht. Es besteht eine Wahrscheinlichkeit, keinen Klon oder einen gegen ein anderes Antigen gerichteten Antikörper zu subklonieren.

Die Problematik der Instabilität tritt weiterhin beim Aliquotieren und der Lagerung der Klone auf, was mit einem Risiko der fehlenden Reproduzierbarkeit in Folgeexperimenten einhergeht.

4.6 Fazit

Trotz des großen Interesses an Morbus Alzheimer und des stetigen Wissenszuwachs erwies sich die Klärung der molekularen Prozesse als komplex und wurde bis *dato* nicht zur Gänze verstanden. Vor allem der Wunsch nach einem Mittel zur Heilung oder *ante mortem* Diagnostik erbrachte viele monoklonale Antikörper gegen β -Amyloid. Aktuelle klinische Studien sind aufgrund von fehlendem Benefit oder unerwünschten Nebenwirkungen gescheitert. Die in dieser Arbeit generierten monoklonalen Antikörper bieten einen neuen Ansatz, die Rolle von Amyloid- β im Rahmen der Morbus Alzheimer Erkrankung zu untersuchen. Die generierten Antikörper wurden in verschiedenen immunochemischen Verfahren (ELISA, IP, direkter A β -Nachweis) validiert. Als nächster Schritt sollten die Epitope der Antikörper charakterisiert werden. Außerdem sollte die immunhistochemische Färbung an Maushirnen mit den Antikörpern 4H8, 7A12 und 17F4.G9 wiederholt werden, so dass im Folgeschritt an humanen Hirnen oder Hirnhomogenaten getestet werden kann.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit grundlegend erfüllt wurde. Es wurden drei neue monoklonale Antikörper zur Erforschung und Charakterisierung von Amyloid- β identifiziert und in verschiedenen immunochemischen Verfahren untersucht. 17F4.G9 identifiziert A β -Monomere und Dimere gleichermaßen. 4H8 und 7A12 identifizierten in der Immunpräzipitation einzig A β -Dimere, im direkten Nachweis von synthetischem und zellulär sekretiertem A β zeigten sie allerdings ein abweichendes Verhalten, welches genauere Untersuchungen nach sich ziehen muss. Hierbei sind diese allerdings von potenziell fehlender Reproduzierbarkeit nach Subklonierung limitiert.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Association, A.P., *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*. Fifth edition ed. 2013: Am Psychiatric Assoc.
2. *2020 Alzheimer's disease facts and figures*. Alzheimers Dement, 2020.
3. Reitz, C. and R. Mayeux, *Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers*. Biochem Pharmacol, 2014. **88**(4): p. 640-51.
4. Scheltens, P., et al., *Alzheimer's disease*. Lancet, 2016. **388**(10043): p. 505-17.
5. Wimo, A., et al., *The worldwide costs of dementia 2015 and comparisons with 2010*. Alzheimers Dement, 2017. **13**(1): p. 1-7.
6. Alzheimer, A., *Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters*. Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie, 1911. **4**(1): p. 356.
7. Kosik, K.S., C.L. Joachim, and D.J. Selkoe, *Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(11): p. 4044-8.
8. De Leon, M.J., et al., *Frequency of hippocampal formation atrophy in normal aging and Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging, 1997. **18**(1): p. 1-11.
9. Hyman, B.T., et al., *National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease*. Alzheimers Dement, 2012. **8**(1): p. 1-13.
10. Montine, T.J., et al., *National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease: a practical approach*. Acta Neuropathol, 2012. **123**(1): p. 1-11.
11. Thal, D.R., et al., *Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD*. Neurology, 2002. **58**(12): p. 1791-800.
12. Braak, H. and E. Braak, *Neuropathological staging of Alzheimer-related changes*. Acta Neuropathol, 1991. **82**(4): p. 239-59.
13. Dickson, D.W., et al., *Correlations of synaptic and pathological markers with cognition of the elderly*. Neurobiol Aging, 1995. **16**(3): p. 285-98; discussion 298-304.
14. Alzheimer's, A., *2010 Alzheimer's disease facts and figures*. Alzheimers Dement, 2010. **6**(2): p. 158-94.
15. Goate, A., et al., *Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease*. Nature, 1991. **349**(6311): p. 704-6.
16. Levy-Lahad, E., et al., *Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus*. Science, 1995. **269**(5226): p. 973-7.

17. Sherrington, R., et al., *Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease*. Nature, 1995. **375**(6534): p. 754-60.
18. Citron, M., et al., *Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production*. Nature, 1992. **360**(6405): p. 672-4.
19. Brookmeyer, R., et al., *Forecasting the global burden of Alzheimer's disease*. Alzheimers Dement, 2007. **3**(3): p. 186-91.
20. Kukull, W.A., et al., *Dementia and Alzheimer disease incidence: a prospective cohort study*. Arch Neurol, 2002. **59**(11): p. 1737-46.
21. Plassman, B.L., et al., *Prevalence of dementia in the United States: the aging, demographics, and memory study*. Neuroepidemiology, 2007. **29**(1-2): p. 125-32.
22. Qiu, C., M. Kivipelto, and E. von Strauss, *Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention*. Dialogues Clin Neurosci, 2009. **11**(2): p. 111-28.
23. Verghese, P.B., J.M. Castellano, and D.M. Holtzman, *Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders*. Lancet Neurol, 2011. **10**(3): p. 241-52.
24. Corder, E.H., et al., *Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families*. Science, 1993. **261**(5123): p. 921-3.
25. Loy, C.T., et al., *Genetics of dementia*. Lancet, 2014. **383**(9919): p. 828-40.
26. Raber, J., Y. Huang, and J.W. Ashford, *ApoE genotype accounts for the vast majority of AD risk and AD pathology*. Neurobiol Aging, 2004. **25**(5): p. 641-50.
27. Castellano, J.M., et al., *Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid-beta peptide clearance*. Sci Transl Med, 2011. **3**(89): p. 89ra57.
28. Mahley, R.W. and Y. Huang, *Apolipoprotein e sets the stage: response to injury triggers neuropathology*. Neuron, 2012. **76**(5): p. 871-85.
29. Bell, R.D., et al., *Apolipoprotein E controls cerebrovascular integrity via cyclophilin A*. Nature, 2012. **485**(7399): p. 512-6.
30. Sastre, M., et al., *Inflammatory risk factors and pathologies associated with Alzheimer's disease*. Curr Alzheimer Res, 2011. **8**(2): p. 132-41.
31. Heneka, M.T., et al., *Focal glial activation coincides with increased BACE1 activation and precedes amyloid plaque deposition in APP[V717I] transgenic mice*. J Neuroinflammation, 2005. **2**: p. 22.
32. Li, J., et al., *Vascular risk factors promote conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer disease*. Neurology, 2011. **76**(17): p. 1485-91.
33. Ronnema, E., et al., *Impaired insulin secretion increases the risk of Alzheimer disease*. Neurology, 2008. **71**(14): p. 1065-71.

34. Anstey, K.J., et al., *Smoking as a risk factor for dementia and cognitive decline: a meta-analysis of prospective studies*. Am J Epidemiol, 2007. **166**(4): p. 367-78.
35. Jellinger, K.A., *Head injury and dementia*. Curr Opin Neurol, 2004. **17**(6): p. 719-23.
36. Ogino, E., et al., *Current and past leisure time physical activity in relation to risk of Alzheimer's disease in older adults*. Alzheimers Dement, 2019. **15**(12): p. 1603-1611.
37. Yates, L.A., et al., *Cognitive leisure activities and future risk of cognitive impairment and dementia: systematic review and meta-analysis*. Int Psychogeriatr, 2016. **28**(11): p. 1791-1806.
38. Lourida, I., et al., *Mediterranean diet, cognitive function, and dementia: a systematic review*. Epidemiology, 2013. **24**(4): p. 479-89.
39. Stern, Y., *Cognitive reserve in ageing and Alzheimer's disease*. Lancet Neurol, 2012. **11**(11): p. 1006-12.
40. Bennett, D.A., et al., *The effect of social networks on the relation between Alzheimer's disease pathology and level of cognitive function in old people: a longitudinal cohort study*. Lancet Neurol, 2006. **5**(5): p. 406-12.
41. Müller-Hill, B. and K. Beyreuther, *MOLECULAR BIOLOGY OF ALZHEIMER'S DISEASE*. Annual Review of Biochemistry, 1989. **58**(1): p. 287-307.
42. Wisniewski, H.M., et al., *Spectrum of morphological appearance of amyloid deposits in Alzheimer's disease*. Acta Neuropathol, 1989. **78**(4): p. 337-47.
43. Dickson, D.W., *The pathogenesis of senile plaques*. J Neuropathol Exp Neurol, 1997. **56**(4): p. 321-39.
44. Muller-Hill, B. and K. Beyreuther, *Molecular biology of Alzheimer's disease*. Annu Rev Biochem, 1989. **58**: p. 287-307.
45. Wong, C.W., V. Quaranta, and G.G. Glenner, *Neuritic plaques and cerebrovascular amyloid in Alzheimer disease are antigenically related*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(24): p. 8729-32.
46. Glenner, G.G. and C.W. Wong, *Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein*. Biochem Biophys Res Commun, 1984. **120**(3): p. 885-90.
47. Glenner, G.G. and C.W. Wong, *Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein*. Biochem Biophys Res Commun, 1984. **122**(3): p. 1131-5.
48. Kang, J., et al., *The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor*. Nature, 1987. **325**(6106): p. 733-6.
49. Haass, C., et al., *Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism*. Nature, 1992. **359**(6393): p. 322-5.

50. Shoji, M., et al., *Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing*. Science, 1992. **258**(5079): p. 126-9.
51. Seubert, P., et al., *Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids*. Nature, 1992. **359**(6393): p. 325-7.
52. Plant, L.D., et al., *The production of amyloid beta peptide is a critical requirement for the viability of central neurons*. J Neurosci, 2003. **23**(13): p. 5531-5.
53. Morley, J.E., et al., *A physiological role for amyloid-beta protein: enhancement of learning and memory*. J Alzheimers Dis, 2010. **19**(2): p. 441-9.
54. Soscia, S.J., et al., *The Alzheimer's disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide*. PLoS One, 2010. **5**(3): p. e9505.
55. Turner, A.J., L. Fisk, and N.N. Nalivaeva, *Targeting amyloid-degrading enzymes as therapeutic strategies in neurodegeneration*. Ann N Y Acad Sci, 2004. **1035**: p. 1-20.
56. Shibata, M., et al., *Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier*. J Clin Invest, 2000. **106**(12): p. 1489-99.
57. Hone, E., et al., *Apolipoprotein E influences amyloid-beta clearance from the murine periphery*. J Alzheimers Dis, 2003. **5**(1): p. 1-8.
58. Chen, G.F., et al., *Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development*. Acta Pharmacol Sin, 2017. **38**(9): p. 1205-1235.
59. Robakis, N.K., et al., *Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the cerebrovascular and the neuritic plaque amyloid peptides*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(12): p. 4190-4.
60. Tanzi, R.E., et al., *Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease*. Nature, 1988. **331**(6156): p. 528-30.
61. Ponte, P., et al., *A new A4 amyloid mRNA contains a domain homologous to serine proteinase inhibitors*. Nature, 1988. **331**(6156): p. 525-7.
62. Kitaguchi, N., et al., *Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity*. Nature, 1988. **331**(6156): p. 530-2.
63. Priller, C., et al., *Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein*. J Neurosci, 2006. **26**(27): p. 7212-21.
64. Olson, M.I. and C.M. Shaw, *Presenile dementia and Alzheimer's disease in mongolism*. Brain, 1969. **92**(1): p. 147-56.
65. Lichtenthaler, S.F., *alpha-secretase in Alzheimer's disease: molecular identity, regulation and therapeutic potential*. J Neurochem, 2011. **116**(1): p. 10-21.
66. Vassar, R., et al., *Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE*. Science, 1999. **286**(5440): p. 735-41.

67. Fortini, M.E., *Gamma-secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(9): p. 673-84.
68. Leissring, M.A., et al., *A physiologic signaling role for the gamma -secretase-derived intracellular fragment of APP*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(7): p. 4697-702.
69. Jarrett, J.T., E.P. Berger, and P.T. Lansbury, Jr., *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, 1993. **32**(18): p. 4693-7.
70. Suzuki, N., et al., *An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants*. Science, 1994. **264**(5163): p. 1336-40.
71. Snyder, S.W., et al., *Amyloid-beta aggregation: selective inhibition of aggregation in mixtures of amyloid with different chain lengths*. Biophys J, 1994. **67**(3): p. 1216-28.
72. Roher, A.E., et al., *Structural alterations in the peptide backbone of beta-amyloid core protein may account for its deposition and stability in Alzheimer's disease*. J Biol Chem, 1993. **268**(5): p. 3072-83.
73. Iwatsubo, T., et al., *Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43)*. Neuron, 1994. **13**(1): p. 45-53.
74. Lorenzo, A. and B.A. Yankner, *Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(25): p. 12243-7.
75. Pike, C.J., et al., *Aggregation-related toxicity of synthetic beta-amyloid protein in hippocampal cultures*. Eur J Pharmacol, 1991. **207**(4): p. 367-8.
76. Bennett, D.A., et al., *Pathological changes in frontal cortex from biopsy to autopsy in Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging, 1993. **14**(6): p. 589-96.
77. Terry, R.D., et al., *Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment*. Ann Neurol, 1991. **30**(4): p. 572-80.
78. Dickson, D.W., et al., *Identification of normal and pathological aging in prospectively studied nondemented elderly humans*. Neurobiol Aging, 1992. **13**(1): p. 179-89.
79. Lue, L.F., et al., *Inflammation, A beta deposition, and neurofibrillary tangle formation as correlates of Alzheimer's disease neurodegeneration*. J Neuropathol Exp Neurol, 1996. **55**(10): p. 1083-8.
80. Westerman, M.A., et al., *The relationship between Abeta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease*. J Neurosci, 2002. **22**(5): p. 1858-67.
81. Billings, L.M., et al., *Intraneuronal Abeta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice*. Neuron, 2005. **45**(5): p. 675-88.

82. Mucke, L., et al., *High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation.* J Neurosci, 2000. **20**(11): p. 4050-8.
83. Tamagno, E., et al., *The Unexpected Role of Abeta1-42 Monomers in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease.* J Alzheimers Dis, 2018. **62**(3): p. 1241-1245.
84. Walsh, D.M. and D.J. Selkoe, *Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease.* Neuron, 2004. **44**(1): p. 181-93.
85. McLean, C.A., et al., *Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease.* Ann Neurol, 1999. **46**(6): p. 860-6.
86. Lue, L.F., et al., *Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease.* Am J Pathol, 1999. **155**(3): p. 853-62.
87. Wang, J., et al., *The levels of soluble versus insoluble brain Abeta distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging.* Exp Neurol, 1999. **158**(2): p. 328-37.
88. Walsh, D.M., et al., *Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate.* J Biol Chem, 1997. **272**(35): p. 22364-72.
89. Harper, J.D., et al., *Observation of metastable Abeta amyloid protofibrils by atomic force microscopy.* Chem Biol, 1997. **4**(2): p. 119-25.
90. Walsh, D.M., et al., *Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates.* J Biol Chem, 1999. **274**(36): p. 25945-52.
91. Hartley, D.M., et al., *Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons.* J Neurosci, 1999. **19**(20): p. 8876-84.
92. Lambert, M.P., et al., *Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(11): p. 6448-53.
93. Wang, H.W., et al., *Soluble oligomers of beta amyloid (1-42) inhibit long-term potentiation but not long-term depression in rat dentate gyrus.* Brain Res, 2002. **924**(2): p. 133-40.
94. Bitan, G., et al., *Amyloid beta -protein (Abeta) assembly: Abeta 40 and Abeta 42 oligomerize through distinct pathways.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(1): p. 330-5.
95. Lesne, S., et al., *A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory.* Nature, 2006. **440**(7082): p. 352-7.
96. Hsiao, K., et al., *Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice.* Science, 1996. **274**(5284): p. 99-102.

97. Podlisny, M.B., et al., *Aggregation of secreted amyloid beta-protein into sodium dodecyl sulfate-stable oligomers in cell culture*. J Biol Chem, 1995. **270**(16): p. 9564-70.
98. Roher, A.E., et al., *Morphology and toxicity of A β -(1-42) dimer derived from neuritic and vascular amyloid deposits of Alzheimer's disease*. J Biol Chem, 1996. **271**(34): p. 20631-5.
99. Walsh, D.M., et al., *Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo*. Nature, 2002. **416**(6880): p. 535-9.
100. Shankar, G.M., et al., *Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory*. Nat Med, 2008. **14**(8): p. 837-42.
101. Kawarabayashi, T., et al., *Dimeric amyloid beta protein rapidly accumulates in lipid rafts followed by apolipoprotein E and phosphorylated tau accumulation in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease*. J Neurosci, 2004. **24**(15): p. 3801-9.
102. McDonald, K.L., et al., *Presence of alternative lengthening of telomeres mechanism in patients with glioblastoma identifies a less aggressive tumor type with longer survival*. J Neuropathol Exp Neurol, 2010. **69**(7): p. 729-36.
103. Wang, Q., et al., *Block of long-term potentiation by naturally secreted and synthetic amyloid beta-peptide in hippocampal slices is mediated via activation of the kinases c-Jun N-terminal kinase, cyclin-dependent kinase 5, and p38 mitogen-activated protein kinase as well as metabotropic glutamate receptor type 5*. J Neurosci, 2004. **24**(13): p. 3370-8.
104. Petkova, A.T., et al., *Self-propagating, molecular-level polymorphism in Alzheimer's beta-amyloid fibrils*. Science, 2005. **307**(5707): p. 262-5.
105. Muller-Schiffmann, A., et al., *Amyloid-beta dimers in the absence of plaque pathology impair learning and synaptic plasticity*. Brain, 2016. **139**(Pt 2): p. 509-25.
106. O'Nuallain, B., et al., *Amyloid beta-protein dimers rapidly form stable synaptotoxic protofibrils*. J Neurosci, 2010. **30**(43): p. 14411-9.
107. Muller-Schiffmann, A., et al., *Molecular engineering of a secreted, highly homogeneous, and neurotoxic abeta dimer*. ACS Chem Neurosci, 2011. **2**(5): p. 242-8.
108. Jarrett, J.T. and P.T. Lansbury, Jr., *Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie?* Cell, 1993. **73**(6): p. 1055-8.
109. van Gerresheim, E.F., et al., *The interaction of insoluble Amyloid-beta with soluble Amyloid-beta dimers decreases Amyloid-beta plaque numbers*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2020.
110. Hardy, J. and D. Allsop, *Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease*. Trends Pharmacol Sci, 1991. **12**(10): p. 383-8.
111. Hardy, J. and D.J. Selkoe, *The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics*. Science, 2002. **297**(5580): p. 353-6.

112. Stockmann, J., et al., *Amyloid-beta misfolding as a plasma biomarker indicates risk for future clinical Alzheimer's disease in individuals with subjective cognitive decline*. *Alzheimers Res Ther*, 2020. **12**(1): p. 169.
113. Selkoe, D.J. and J. Hardy, *The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years*. *EMBO Mol Med*, 2016. **8**(6): p. 595-608.
114. Selkoe, D.J., *Resolving controversies on the path to Alzheimer's therapeutics*. *Nat Med*, 2011. **17**(9): p. 1060-5.
115. Schroeder, H.W., Jr. and L. Cavacini, *Structure and function of immunoglobulins*. *J Allergy Clin Immunol*, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S41-52.
116. Boes, M., *Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses*. *Mol Immunol*, 2000. **37**(18): p. 1141-9.
117. Vidarsson, G., G. Dekkers, and T. Rispen, *IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions*. *Front Immunol*, 2014. **5**: p. 520.
118. Kohler, G. and C. Milstein, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. *Nature*, 1975. **256**(5517): p. 495-7.
119. Prusiner, S.B., *Shattuck lecture--neurodegenerative diseases and prions*. *N Engl J Med*, 2001. **344**(20): p. 1516-26.
120. Li, Q., Y. Liu, and M. Sun, *Autophagy and Alzheimer's Disease*. *Cell Mol Neurobiol*, 2017. **37**(3): p. 377-388.
121. Murphy, M.P. and H. LeVine, 3rd, *Alzheimer's disease and the amyloid-beta peptide*. *J Alzheimers Dis*, 2010. **19**(1): p. 311-23.
122. Leliveld, S.R. and C. Korth, *The use of conformation-specific ligands and assays to dissect the molecular mechanisms of neurodegenerative diseases*. *J Neurosci Res*, 2007. **85**(11): p. 2285-97.
123. Ida, N., et al., *Analysis of heterogeneous A4 peptides in human cerebrospinal fluid and blood by a newly developed sensitive Western blot assay*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(37): p. 22908-14.
124. Tomaselli, S., et al., *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*, 2006. **7**(2): p. 257-67.
125. Nordberg, A. and B. Winblad, *Reduced number of [3H]nicotine and [3H]acetylcholine binding sites in the frontal cortex of Alzheimer brains*. *Neurosci Lett*, 1986. **72**(1): p. 115-9.
126. Wonnacott, S., *Presynaptic nicotinic ACh receptors*. *Trends Neurosci*, 1997. **20**(2): p. 92-8.
127. Maragos, W.F., et al., *Glutamate dysfunction in Alzheimer's disease: an hypothesis*. *Trends in Neurosciences*, 1987. **10**(2): p. 65-68.

128. Wang, R. and P.H. Reddy, *Role of Glutamate and NMDA Receptors in Alzheimer's Disease*. J Alzheimers Dis, 2017. **57**(4): p. 1041-1048.
129. Danysz, W., et al., *Neuroprotective and symptomatological action of memantine relevant for Alzheimer's disease--a unified glutamatergic hypothesis on the mechanism of action*. Neurotox Res, 2000. **2**(2-3): p. 85-97.
130. Choi, D.W., *Ionic dependence of glutamate neurotoxicity*. J Neurosci, 1987. **7**(2): p. 369-79.
131. Danysz, W. and C.G. Parsons, *The NMDA receptor antagonist memantine as a symptomatological and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease: preclinical evidence*. Int J Geriatr Psychiatry, 2003. **18**(Suppl 1): p. S23-32.
132. Cummings, J.L., T. Morstorf, and K. Zhong, *Alzheimer's disease drug-development pipeline: few candidates, frequent failures*. Alzheimers Res Ther, 2014. **6**(4): p. 37.
133. Salloway, S., et al., *Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease*. N Engl J Med, 2014. **370**(4): p. 322-33.
134. Doody, R.S., et al., *Phase 3 trials of solanezumab for mild-to-moderate Alzheimer's disease*. N Engl J Med, 2014. **370**(4): p. 311-21.
135. Arndt, J.W., et al., *Structural and kinetic basis for the selectivity of aducanumab for aggregated forms of amyloid-beta*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 6412.
136. Sevigny, J., et al., *The antibody aducanumab reduces Abeta plaques in Alzheimer's disease*. Nature, 2016. **537**(7618): p. 50-6.
137. Schneider, L., *A resurrection of aducanumab for Alzheimer's disease*. Lancet Neurol, 2020. **19**(2): p. 111-112.
138. Ostrowitzki, S., et al., *A phase III randomized trial of gantenerumab in prodromal Alzheimer's disease*. Alzheimers Res Ther, 2017. **9**(1): p. 95.
139. Lannfelt, L., et al., *Perspectives on future Alzheimer therapies: amyloid-beta protofibrils - a new target for immunotherapy with BAN2401 in Alzheimer's disease*. Alzheimers Res Ther, 2014. **6**(2): p. 16.
140. Bard, F., et al., *Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease*. Nat Med, 2000. **6**(8): p. 916-9.
141. Janus, C., et al., *A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease*. Nature, 2000. **408**(6815): p. 979-82.
142. Morgan, D., et al., *A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease*. Nature, 2000. **408**(6815): p. 982-5.
143. Orgogozo, J.M., et al., *Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization*. Neurology, 2003. **61**(1): p. 46-54.

144. Egan, M.F., et al., *Randomized Trial of Verubecestat for Prodromal Alzheimer's Disease*. N Engl J Med, 2019. **380**(15): p. 1408-1420.
145. Egan, M.F., et al., *Randomized Trial of Verubecestat for Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease*. N Engl J Med, 2018. **378**(18): p. 1691-1703.
146. Mullard, A., *Alzheimer prevention failure rattles field, anew*. Nat Rev Drug Discov, 2019. **18**(9): p. 656.
147. Doody, R.S., et al., *A phase 3 trial of semagacestat for treatment of Alzheimer's disease*. N Engl J Med, 2013. **369**(4): p. 341-50.
148. Hung, S.Y. and W.M. Fu, *Drug candidates in clinical trials for Alzheimer's disease*. J Biomed Sci, 2017. **24**(1): p. 47.
149. Xia, W., et al., *Enhanced production and oligomerization of the 42-residue amyloid beta-protein by Chinese hamster ovary cells stably expressing mutant presenilins*. J Biol Chem, 1997. **272**(12): p. 7977-82.
150. Swerdlow, P.S., D. Finley, and A. Varshavsky, *Enhancement of immunoblot sensitivity by heating of hydrated filters*. Anal Biochem, 1986. **156**(1): p. 147-53.
151. Chishti, M.A., et al., *Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695*. J Biol Chem, 2001. **276**(24): p. 21562-70.
152. Bueler, H., et al., *Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein*. Nature, 1992. **356**(6370): p. 577-82.
153. Solomon, B., et al., *Monoclonal antibodies inhibit in vitro fibrillar aggregation of the Alzheimer beta-amyloid peptide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(1): p. 452-5.
154. Lambert, M.P., et al., *Monoclonal antibodies that target pathological assemblies of Abeta*. J Neurochem, 2007. **100**(1): p. 23-35.
155. O'Nuallain, B., et al., *A monoclonal antibody against synthetic Abeta dimer assemblies neutralizes brain-derived synaptic plasticity-disrupting Abeta*. J Neurochem, 2011. **119**(1): p. 189-201.
156. Banks, W.A., et al., *Anti-amyloid beta protein antibody passage across the blood-brain barrier in the SAMP8 mouse model of Alzheimer's disease: an age-related selective uptake with reversal of learning impairment*. Exp Neurol, 2007. **206**(2): p. 248-56.
157. Samsudin, F., et al., *Not all therapeutic antibody isotypes are equal: the case of IgM versus IgG in Pertuzumab and Trastuzumab*. Chemical Science, 2020. **11**(10): p. 2843-2854.
158. Weidemann, A., et al., *A novel epsilon-cleavage within the transmembrane domain of the Alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with Notch processing*. Biochemistry, 2002. **41**(8): p. 2825-35.

159. Chen, F., et al., *Presenilin 1 mutations activate gamma 42-secretase but reciprocally inhibit epsilon-secretase cleavage of amyloid precursor protein (APP) and S3-cleavage of notch*. J Biol Chem, 2002. **277**(39): p. 36521-6.
160. Hunter, S. and C. Brayne, *Do anti-amyloid beta protein antibody cross reactivities confound Alzheimer disease research?* J Negat Results Biomed, 2017. **16**(1): p. 1.
161. Welzel, A.T., et al., *Secreted amyloid beta-proteins in a cell culture model include N-terminally extended peptides that impair synaptic plasticity*. Biochemistry, 2014. **53**(24): p. 3908-21.
162. Willem, M., et al., *eta-Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus*. Nature, 2015. **526**(7573): p. 443-7.

6 Anhang

Gesamtübersicht – Anzahl der durchgeführten Versuche:

Generierte Klone: 490
Durchgeführte ELISAs: 22; 490 getestete Klone
Immunpräzipitationen: 31; 259 getestete Klone
Stripe-Verfahren: 14; 74 getestete Klone
Angefertigte Hirnschnitte: 8; getestete Klone 2

Übersicht – mehrfach getestete Kone:

Klon	ELISA _{Det}	ELISA _{S8C}	ELISA _{wt}	IP	WB _{synth}	WB _{zel}	Hirnschnitte
17F4.G9	++++	++++	++++	wt,S8C	wt,S8C	wt,S8C	/
7A12	++	+++	+	S8C	S8C>wt	wt	/
4H8	+	++++	++	S8C	wt>S8C	S8C	/
10G8	++++	++++	+	S8C	-	/	-
11F5	++	++	-	-	-	-	Unspezifische Bindung
12B3	++++	+++	-	-	-	/	/
19B3	++	++	-	-	-	/	/
5D8	+++	+++	+	-	-	/	/
4D8	++	++	-	-	-	/	/
18H7	++++	++++	+	-	-	/	/
11G4	++	++	-	-	-	/	/
16E11	++++	++++	++++	-	-	/	/
17B8	++++	+	+	-	-	/	/
18H7	+++	+++	+	-	-	/	/
19B3	+	+++	+	-	-	/	/
12B3	+	+	+	-	-	/	/
21E12	+	+	+	-	/	/	/
2D5	+	+	+	-	-	/	/
11F5	+	+	+	-	-	/	/
2C3	+	+	+	-	-	/	/
11G4	+	+	+	-	-	/	/
1H2	+	+	+	-	-	/	/
13H6	+	+	+	-	-	/	/
19C6	+	+	-	-	/	/	/
10E9	+	+	+	S8C	S8C>wt	/	
2F6	+	+	-	-	-	/	/
11D12	+	+	+	-	-	/	/
6E9	+	+	+	-	-	/	/
2A6	+	+	-	-	-	/	/
10E8	+	+	-	-	-	/	/
12G4	+	+	-	-	-	/	/
21E2	+	+	-	-	-	/	/
11G4	+	+	+	S8C	S8C	/	/
12D4	-	/	/	-	-	-	/
14D5	+++	/	/	-	-	-	/
13B9	-	/	/	S8C	-	-	/
17B8	++++	/	/	-	-	-	/
2A1	+	-	-	-	-	-	/

+: positiver ELISA; -: negativer ELISA; S8C: S8C-Dimer wird präzipitiert; wt: Wildtyp wird präzipitiert.
 ELISA_{Det.}, Detektions-ELISA; IP, Immunpräzipitation; S8C, S8C-Dimer-A β ; WB_{synth}, Stripes mit synthetischem A β ; WB_{zel}, Stripes mit zelluläre sekretiertem A β ; wt, Wildtyp;

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schematische Darstellung des amyloidogenen und nicht-amyloidogenen Wegs der APP-Spaltung
Abb. 2	Schematische Darstellung des A β -Aggregationsprozesses und der A β -Spezies
Abb. 3	Schematischer Ablauf der Amyloid-Kaskaden-Hypothese
Abb. 4a	Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers
Abb. 4b	Schematische Darstellung eines IgM-Antikörpers
Abb. 5	Ansatzpunkte der krankheitsmodifizierenden Medikamente im Plaquebildungsprozess
Abb. 6	Schematische Darstellung des Fusions-Prozesses
Abb. 7	Schematische Darstellung des Ablaufs einer Immunpräzipitation
Abb. 8	Visualisierte Ergebnisse der Immunpräzipitation und des Western Blots
Abb. 9	Immunhistologische Färbung von Hirnschnitten mit 10G8 und 11F5
Abb. 10	Immunpräzipitation/Western Blot mit IC-16 und 4H8
Abb. 11a	Western Blot mit 4H8 und 4G8 und synthetischem A β
Abb. 11b	Western Blot mit 4H8 und 4G8 und zellulär sekretiertem A β
Abb. 12	Immunpräzipitation/Western Blot mit IC-16 und 7A1
Abb. 13a	Western Blot mit 7A12 und 4G8 und synthetischem A β
Abb. 13b	Western Blot mit 7A12 und 4G8 und zellulär sekretiertem A β
Abb. 14	Immunpräzipitation/Western Blot mit IC-16 und 17F4.G9
Abb. 15a	Western Blot mit 17F4.G9 und 4G8 und synthetischem A β
Abb. 15b	Western Blot mit 17F4.G9 und 4G8 und zellulär sekretiertem A β

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Carsten Korth für das Überlassen des Themas dieser Arbeit und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie Herrn Dr. Andreas Müller-Schiffmann für die gute Betreuung mit immerwährenden Ratschlägen und allzeit gegebener Unterstützung.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Ingrid Prikulis und Frau Dr. Sandra Gunne für die Durchführung der Tierversuche in Vorbereitung auf die Arbeit und den unentwegten Beistand, insbesondere mit der Pflege der Zellklone.

Ich danke dem gesamten Team der Arbeitsgruppe „Neurodegeneration“ des Instituts für Neuropathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf für die freundliche Aufnahme und entspannte Arbeitsatmosphäre über die ganzen Jahre.

Ich danke meinen Eltern Gabriele Zittlau und Ghafar Zafari, welche mir mein Studium und diese Promotion sorgenfrei ermöglicht haben. Außerdem danke ich meinen Freunden, die in jeder Situation und Gemütslage ein offenes Ohr für mich hatten.