



seit 1558

Friedrich-Schiller-Universität Jena

BIOLOGISCH-PHARMAZEUTISCHE FAKULTÄT

Charakterisierung der amyloid- spezifischen Antikörperdomäne B10

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

Vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der

Friedrich-Schiller-Universität Jena

Von Diplom-Biologe Christian Haupt

Geboren am 30.05.1978 in Erfurt

November 2010

1. Gutachter: Prof. Dr. Stephan Diekmann, FLI Jena

2. Gutachter: PD Dr. Marcus Fändrich, Max-Planck Forschungsstelle für Enzymologie
der Proteinfaltung, Halle (Saale)

3. Gutachter: Prof. Dr. Daniel Huster, Universität Leipzig

Disputation am: 04.04.2011

Vorwort

Diese Dissertation wurde unter der Leitung von PD Dr. **Marcus Fändrich** am FLI (Jena) und der Max Planck Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung (Halle (Saale)), sowie in enger Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. **Uwe Horn** am HKI (Jena) angefertigt. Darum gilt mein Dank zu allererst meinem Betreuer M. Fändrich für die Bereitstellung dieses überaus spannenden und fruchtbaren Themas, sowie seiner intensiven Betreuung. Des Weiteren möchte ich U. Horn für die herzliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe und die Möglichkeit der Nutzung der gesamten Ausstattung danken.

Ich danke Prof. Dr. **Stefan Diekmann** (FLI, Jena), der die vorliegende Arbeit an der Friedrich-Schiller-Universität vertritt.

Des Weiteren möchte ich verschiedenen Kollegen danken, welche meine Arbeit unterstützten und mit Diskussionen und Ideen bereicherten.

Mein besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Fändrich für die schöne und erfolgreiche Zusammenarbeit und die vielen lustigen Stunden des Miteinanders. Insbesondere möchte ich **Jessica Meinhardt** und **Jessica Wacker** für ihre kritischen Kommentare und Anmerkungen zu meiner Arbeit danken.

Am HKI in Jena danke ich besonders Dr. **Peter Hortschansky** und **Magdalena Bereza** für die intensive Zusammenarbeit. Des Weiteren danke ich **Gernot Habicht** und **Gisela Sudermann** für die Einführung in die Arbeit mit *E.coli* und B10. **Uwe Knüpfer** gilt mein Dank für die vielen gemeinsamen Fermentationen. Darüber hinaus möchte ich mich bei allen nicht spezifisch genannten Mitarbeitern des Naturstofftechnikums für die Kollegialität bedanken.

In Halle (Saale) danke ich allen Kollegen der Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung und der Martin-Luther-Universität für eine unkomplizierte experimentelle Zusammenarbeit.

Darüber hinaus möchte ich Prof. Dr. **Christoph Röcken**, PD. Dr. **Elisabeth Schwarz**, PD Dr. **Günter Fritz**, Prof. Dr. **Jeff Kelly**, Prof. Dr. **Roland Riek** und Prof. Dr. **Robert Seckler** für die Bereitstellung von Untersuchungsmaterial danken.

Mein besonderer Dank gilt meinem Freund **Roy** für die Unterstützung und die vielen gemeinsamen Stunden des geselligen Miteinanders.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie, insbesondere meiner Freundin **Jana** und unserem Sohn **Finn** für das Vertrauen, die Unterstützung, die Geduld und die viele Freude miteinander.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Amyloidosen zählen zu den Protein-Konformationskrankheiten	1
1.2.	Definitionen von Amyloidfibrillen	3
1.3.	Die Bildung von Amyloidfibrillen als generelle Eigenschaft von Polypeptidketten	4
1.4.	Die gemeinsamen Eigenschaften von Amyloidfibrillen	5
1.4.1.	Die fibrilläre Gesamtstruktur von Amyloidfibrillen	5
1.4.2.	Die gekreuzte β -Faltblatt-Struktur	7
1.4.3.	Amyloidfibrillen interagieren mit spezifischen heteroaromatischen Farbstoffen	8
1.4.4.	Amyloidfibrillen zeigen ein typisches Infrarot-Absorptionsverhalten	9
1.5.	Der strukturelle Aufbau von Amyloidfibrillen	10
1.5.1.	Strukturen und Strukturmodelle von Amyloidfibrillen	11
1.5.2.	Der strukturelle Polymorphismus von Amyloidfibrillen	15
1.6.	Die Mechanismen der Bildung von Amyloidfibrillen	17
1.6.1.	Die Aggregation ist eine nukleationsabhängige Polymerisationsreaktion	17
1.6.2.	Vor der Bildung von Amyloidfibrillen treten kurzlebige Intermediate auf	19
1.7.	Die Rolle verschiedener Aggregate in der Pathogenese von Amyloidosen	20
1.8.	Konformationssensitive Bindemoleküle ermöglichen die spezifische Bindung von Amyloidfibrillen	22
1.8.1.	Kongorot	23
1.8.2.	Thioflavin T	24
1.8.3.	Serum Amyloid P	25

1.8.4.	Der Rezeptor für Endprodukte fortgeschrittener Glykosilierung	26
1.8.5.	Die kollagenähnliche Alzheimer amyloide Plaque-Komponente	28
1.8.6.	Konformationssensitive Antikörper	29
1.9.	Die strukturellen Besonderheiten von kameliden Antikörpern	30
1.10.	Die kamelide VHH-Domäne B10	32
1.10.1.	Die Selektion von B10	32
1.10.2.	B10 unterscheidet A β (1-40)-Fibrillen von disaggregiertem A β (1-40)-Peptid	34
1.10.3.	Das B10-Epitop ist gleichmäßig und seitlich der A β (1-40)-Fibrille lokalisiert	38
1.10.4.	B10 bindet A β (1-40)-Fibrillen mit einer molaren Stöchiometrie von 1:10	40
1.11.	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	42
2.	Material und Methoden	43
2.1.	Materialien und Geräte	43
2.1.1.	Chemikalien	43
2.1.2.	Kits, Standards und gebrauchsfertige Lösungen	45
2.1.3.	Chromatographiemedien	45
2.1.4.	Sonstige Materialien	46
2.1.5.	Geräte	47
2.1.6.	Programme	48
2.1.7.	Plasmide	49
2.1.8.	Primer	49
2.1.9.	Restriktionsenzyme	51
2.1.10.	<i>E. coli</i> -Stämme	51
2.1.11.	Kulturmedien	52
2.1.12.	Native globulär gefaltete Polypeptidketten	53
2.1.13.	Intrinsisch ungefaltete Polypeptidketten	54
2.1.14.	<i>Ex vivo</i> -Amyloidfibrillen	54
2.1.15.	<i>In vitro</i> -Amyloidfibrillen	55

2.1.16.	Antikörper	55
2.1.17.	Weitere Proteine	55
2.2.	Methoden	56
2.2.1.	Proteinexpression in <i>E.coli</i>	56
2.2.2.	Aufreinigung von A β (1-40)	56
2.2.3.	Aufreinigung von B10	57
2.2.4.	Expression und Aufreinigung von B10AP	58
2.2.5.	Expression und Aufreinigung von Pel-15 und Varianten	59
2.2.6.	Eindimensionale Protonen-NMR-Spektroskopie	62
2.2.7.	Pel-15-Aktivitätstest	62
2.2.8.	Herstellung und Transformation chemisch kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen	63
2.2.9.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	63
2.2.10.	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	64
2.2.11.	Disaggregation von A β (1-40)	65
2.2.12.	Präparation löslicher A β (1-40)-Oligomere	65
2.2.13.	Präparation von <i>in vitro</i> -Amyloidfibrillen	65
2.2.14.	Ortsspezifische Mutagenese	66
2.2.15.	Disaggregation von A β (1-40)-Fibrillen durch B10	66
2.2.16.	Degradation mit Proteinase K	66
2.2.17.	Spot-Blot-Analyse	67
2.2.18.	Heparin-Sepharose-Chromatographie	68
2.2.19.	DNS-Bandenverschiebung	68
2.2.20.	B10AP-RAGE-Kompetition	68
2.2.21.	Kongorot-Absorptions-Spektroskopie	69
2.2.22.	Kongorot-grüne Doppelbrechung	69
2.2.23.	FTIR-Spektroskopie	70
2.2.24.	Thioflavin T-Fluoreszenzspektroskopie	70
2.2.25.	Thioflavin T-Aggregationskinetik	70
2.2.26.	Röntgenbeugung	71
2.2.27.	Transmissions-Elektronenmikroskopie	71
2.2.28.	Isothermale Titrationskalorimetrie	72
2.2.29.	Darstellung der Proteinstrukturen	73

3.	Ergebnisse	75
3.1.	Untersuchungen zur Bindungsspezifität von B10	75
3.1.1.	B10 unterscheidet A β (1-40)-Fibrillen von anderen A β (1-40)-Konformeren	75
3.1.2.	B10 interagiert nicht mit intrinsisch ungefalteten oder globulär gefalteten Polypeptidketten	77
3.2.	Untersuchungen zur Charakterisierung des B10-Epitops	80
3.2.1.	Die antigenbindende Region von B10 ist mit positiv geladenen Aminosäuren angereichert	80
3.2.2.	B10 erkennt Liganden aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen	82
3.2.3.	Die Mutagenese von A β (1-40) führt zur Veränderung der Fibrillenstruktur	87
3.2.4.	Das B10-Epitop ist bei Amyloidfibrillen weit verbreitet, jedoch nicht generisch	91
3.2.5.	Das B10-Epitop stellt eine hoch regelmäßige und anionische Oberflächenstruktur dar	97
3.2.6.	B10 zeigt signifikante Übereinstimmungen zu einem Mustererkennungsrezeptor	100
3.2.7.	Versuch der Rekonstitution eines B10-Epitops	101
3.3.	Funktionelle Untersuchungen zu B10	109
3.3.1.	Das B10-Epitop entsteht bevor sich ThT-positive A β (1-40)-Fibrillen bilden	109
3.3.2.	B10 inhibiert die Bildung von A β (1-40)-Amyloidfibrillen	111
3.3.3.	B10AP-stabilisierte Aggregate weisen die Charakteristika von Protofibrillen auf	113
3.3.4.	B10 bindet A β (1-40)-Fibrillen an einer anderen Stelle als KR oder ThT	115
3.3.5.	B10 führt nicht zur Auflösung von bereits gebildeten A β (1-40)-Fibrillen	117

4.	Diskussion	119
4.1.	Die konformationelle Spezifität von B10	119
4.1.1.	Protofibrillen und Amyloidfibrillen weisen eine ähnliche Oberflächenstruktur auf	119
4.1.2.	<i>In vitro</i> und <i>in vivo</i> gebildete Amyloidfibrillen besitzen den gleichen strukturellen Aufbau	120
4.2.	Die molekulare Grundlage der Bindung von B10	121
4.2.1.	B10 erkennt keine generische Struktur des Polypeptid-Rückgrates in Amyloidfibrillen	121
4.2.2.	B10 erkennt Liganden durch elektrostatische Interaktionen	122
4.2.3.	B10 bindet Liganden aufgrund von Mustererkennung	124
4.2.4.	Strukturelle Grundlagen für die Präsentation spezifischer Oberflächenmuster in Amyloidfibrillen	126
4.2.5.	Strukturelle Studien zur Charakterisierung des B10-Epitops	131
4.3.	Die funktionelle Aktivität von B10	133
4.3.1.	Der Mechanismus der Aggregation	133
4.3.2.	Strukturelle Studien zu B10AP-stabilisierten Protofibrillen	135
4.3.3.	Studien zur funktionellen Aktivität von B10	136
5.	Zusammenfassung	141
6.	Abstract	143
7.	Referenzen	145
8.	Anhang	159
8.1.	Analyse der aufgereinigten B10-Varianten	159
8.2.	<i>In vitro</i> -Amyloidfibrillen	160
9.	Eigenständigkeitserklärung	179
10.	Publikationen, Vorträge und Poster	181
11.	Abkürzungen	183
12.	Tabellen und Abbildungen	185

12.1. Abbildungsverzeichnis	185
12.2 Tabellenverzeichnis	188

1. Einleitung

1.1. Amyloidosen zählen zu den Protein-Konformationskrankheiten

Durch den Prozess der Proteinfaltung erhalten Polypeptidketten ihre native, dreidimensionale und funktionelle Struktur. Aufgrund fehlerhafter Faltungsreaktionen oder den Verlust der nativen Struktur können jedoch fehlgefaltete Polypeptidketten entstehen, die ihre Funktion nicht mehr ausüben. Dadurch können sogenannte Protein-Konformationskrankheiten hervorgerufen werden, wie Amyloidosen¹⁻³. Bei diesen Krankheiten bilden die fehlgefalteten Polypeptidketten fibrilläre Aggregate, die als Amyloidfibrillen bezeichnet werden^{1,4}.

Der Begriff Amyloid (= stärkeähnlich) leitet sich von dem griechischen Wort *amylon* (= Stärke) ab und wurde ursprünglich in einem botanischen Kontext benutzt⁵. Im Jahr 1854 übernahm Rudolf Virchow den Begriff in die medizinische Terminologie⁶. Virchow beschrieb damit pathogene Ablagerungen im menschlichen Gehirn⁷ und anderen Organen⁸, die eine stärkeähnliche oder zelluloseartige Reaktion mit Jod und Schwefelsäure zeigten. Spätere Untersuchungen ergaben jedoch, dass diese Ablagerungen primär nicht aus Polysacchariden bestehen, sondern proteinösen Ursprungs sind⁹.

Amyloidfibrillen sind schätzungsweise mit über 100 verschiedenen Krankheiten assoziiert, so zum Beispiel mit der Alzheimer-Krankheit, Diabetes mellitus Typ II oder Arteriosklerose (Tab. 1.1)^{3,4,10}. Bei der Alzheimer-Krankheit werden Amyloidfibrillen aus dem A β -Peptid oder dem Tau-Protein gebildet³, bei anderen Krankheiten beispielsweise aus Transthyretin (TTR)¹¹ oder dem Serum Amyloid A (SAA)-Protein¹². Amyloidablagerungen können grundsätzlich bei Frauen und Männern jeden Alters und in allen Geweben auftreten. Jedoch kommen sie sehr selten bei Kindern und jungen Erwachsenen vor und sind häufiger bei Männern als bei Frauen zu beobachten¹³⁻¹⁶. Amyloidablagerungen sind ab einem gewissen Alter, als Folge des Alterungsprozesses, im Körper eines jeden Menschen nachweisbar^{14,17}. Bei einigen Amyloidosen kann die massive Ablagerung von Fibrillen (bis zu mehreren Kilogramm) zu einem Verlust der Elastizität von Geweben und mechanischer Zerstörung führen, wodurch es zu einer funktionellen Beeinträchtigung kommt^{16,18,19}. In anderen Fällen, vor allem bei zerebralen Amyloidosen, wird primär eine durch Amyloidfibrillen²⁰⁻²² oder intermediäre Aggregate²³⁻²⁵ induzierte

Zytotoxizität diskutiert, beispielsweise durch eine Perforation von Membranen durch Porenbildung²⁶ oder eine mechanische Penetration²².

Neben den proteinösen Amyloidfibrillen bestehen extrazelluläre Amyloidablagerungen aus sekundären Komponenten. Diese können andere Proteine (z. B. Serum Amyloid P (SAP), Kollagen oder Apolipoprotein E), Proteoglykane (z. B. Heparansulfat oder Dermatansulfat) oder Lipide (z. B. Cholesterol oder Sphingomyelin) sein^{4,14,27}. Zum Teil binden die sekundären Komponenten mit hoher Affinität an die Amyloidfibrillen und beeinflussen vermutlich deren Bildung, Stabilität und Pathogenität^{14,28,29}.

Tabelle 1.1. Auswahl an Polypeptidketten, die mit Amyloidosen assoziiert sind^{4,16}.

Vorläufer-Polypeptid	Amyloid-Klassifikation	Krankheit
Aβ-Peptid	Aβ	Alzheimer-Krankheit
Immunglobulin leichte Kette	AL	Systemische AL-Amyloidose
β ₂ -Mikroglobulin	Aβ ₂ M	Dialyse-assoziierte Amyloidose
Transthyretin	ATTR	Senile kardiovaskuläre Amyloidose
Serum Amyloid A Protein	AA	Rheumatoide Arthritis
Apolipoprotein AI	AApoAI	Arteriosklerose
Lysozym	ALys	Familiäre viszerale Amyloidose
Prion Protein	APrP	Spongiforme Enzephalopathien
Prolaktin	APro	Prolaktinome
Insulin	AIns	Iatrogene Insulin-Amyloidose
Amylin (IAPP)	AIAPP	Diabetes mellitus Typ II
Tau	ATau	Alzheimer-Krankheit
Medin	AMed	Amyloid der Aortenmedia
Lactoferrin	ALac	Amyloid der Kornea
Semenogilin I	ASemI	Amyloid der Samenblase
Cystatin C	ACys	Familiäre Amyloidose (Isländischer Typ)
Calcitonin	ACal	Medulläres Schilddrüsenkarzinom

1.2. Definitionen von Amyloidfibrillen

Für den Begriff Amyloidfibrille existieren in verschiedenen wissenschaftlichen Fachgebieten unterschiedliche Definitionen^{4,30-32}. Im pathologischen Sinne werden Amyloidfibrillen nach den Kriterien des *Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis* definiert⁴. Danach sind Amyloidfibrillen *in vivo*-Ablagerungen, die eine charakteristische fadenförmige Erscheinung im Elektronenmikroskop (EM) und ein typisches Röntgenbeugungsmuster aufweisen. Des Weiteren zeichnen sich Amyloidfibrillen durch eine Affinität für amyloidspezifische Farbstoffe, wie Kongorot (KR) mit gleichzeitiger charakteristischer rot-grüner Doppelbrechung, aus⁴. Im Unterschied dazu wurde vorgeschlagen, für alle nicht *in vivo* gebildeten Fibrillen, welche die übrigen Kriterien für Amyloidfibrillen erfüllen, den Begriff amyloidähnliche Fibrillen zu verwenden⁴.

Strukturbiologisch gesehen sind Amyloidfibrillen fadenförmige Polypeptid-Aggregate mit einer gekreuzten β -Faltblatt (*cross- β*)-Struktur^{30,31}. Bei dieser Definition spielen die Bedingungen der Fibrillenbildung eine untergeordnete Rolle, da aus struktureller Sicht keine fundamentalen Unterschiede zwischen *in vitro* und *in vivo* gebildeten Fibrillen existieren^{30,32}. Ferner wird die Interaktion mit amyloidspezifischen Farbstoffen nicht berücksichtigt, da die charakteristischen optischen Eigenschaften von KR oder Thioflavin-T (ThT) und deren spezifische Bindung sehr von den Lösungs- und Färbungsbedingungen abhängen^{16,30,33,34}. Zusätzlich sind für diese Farbstoffe eine ganze Reihe von Kreuzreaktionen mit nicht-fibrillären Aggregaten, globulär gefalteten Polypeptidketten oder nicht-proteinösen Molekülen dokumentiert^{30,35-38}.

In Anlehnung an die strukturbiologische Definition werden alle Fibrillen in dieser Arbeit, ohne Berücksichtigung ihres Bildungsortes, als Amyloidfibrillen bezeichnet.

1.3. Die Bildung von Amyloidfibrillen als generische Eigenschaft von Polypeptidketten

Es ist eine steigende Anzahl von Polypeptidketten bekannt, die *in vitro* Fibrillen bilden, jedoch bisher nicht mit Amyloidosen in Verbindung gebracht wurden. In ihren strukturellen Eigenschaften unterscheiden sich diese Fibrillen nicht von *in vivo* abgelagerten Fibrillen. Dazu gehören intrinsisch ungefaltete Homopolymere, wie Poly-L-Lysin und Poly-L-Threonin³⁹, oder die globulär gefaltete, vollständig α -helikale Polypeptidkette Myoglobin⁴⁰. Daraus resultierend wurde das Konzept formuliert, dass die Bildung von Amyloidfibrillen eine generische Eigenschaft von Polypeptidketten darstellt^{32,39,41}. Demzufolge existiert neben der Proteinfaltung ein separater Weg, um eine geordnete Struktur zu bilden. Daher können globulär gefaltete Polypeptidketten zwei geordnete konformationelle Zustände einnehmen: auf der einen Seite die native, globuläre Struktur und auf der anderen Seite eine aggregierte, amyloide Struktur (Abb. 1.1). Diesbezüglich ist auch der kürzlich eingeführte Begriff des „Amyloms“ zu nennen⁴². Das Amylom bezeichnet die Gesamtheit aller Polypeptidketten, die in der Lage sind Amyloidfibrillen zu bilden⁴². Demzufolge sind in beinahe jeder komplexen Polypeptidkette kurze Aminosäuresequenzen vorhanden, die zur Amyloidbildung neigen⁴²⁻⁴⁵.

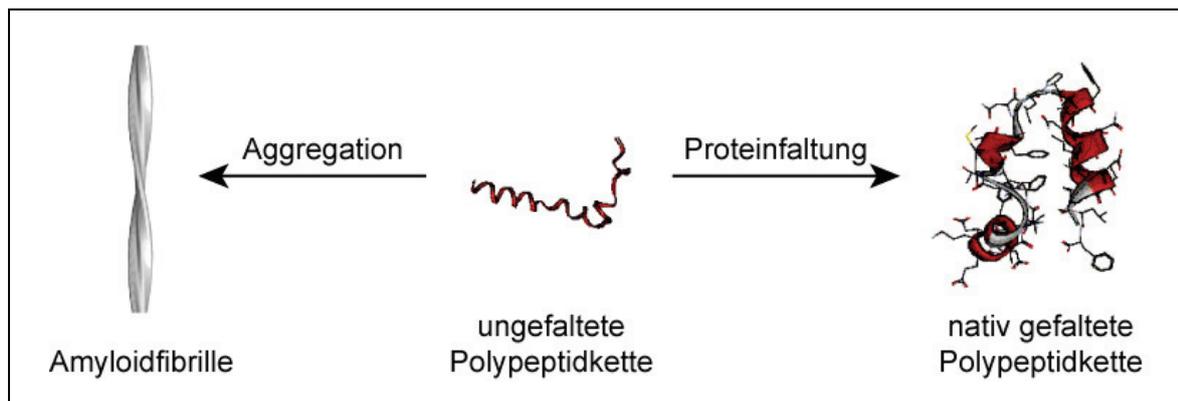


Abbildung 1.1. Konzept der Bildung von Amyloidfibrillen als generische Eigenschaft von Polypeptidketten.

Neben der Proteinfaltungsreaktion, die zur nativen, globulären Struktur von Polypeptidketten führt, tritt die Aggregation auf, die in der Bildung einer strukturell hoch geordneten Amyloidfibrille resultiert. Bildquellen: Sachse et al. (2008)⁴⁶, www.icrm.cnr.it/COLOMBO/colombo_home.html.

Aus der rekombinanten Proteinexpression ist die Bildung von sogenannten Einschlusskörpern (*inclusion bodies*) bekannt. Neuere strukturelle Untersuchungen zu Einschlusskörpern deuten darauf hin, dass diese eine amyloidähnliche Struktur aufweisen können^{47,48}. Als molekulare Ursache für deren Bildung wird unter anderem ein Mangel an molekularen Chaperonen diskutiert⁴⁹. Aufgrund dieses Zusammenhangs wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Aggregation möglicherweise der „primitive“ und „standardmäßige“ Strukturierungsweg für Polypeptidketten ist, sofern diese nicht durch spezifische schützende Mechanismen, wie molekulare Chaperone, verhindert wird^{42,47,50}.

Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass lebende Organismen Amyloidfibrillen für funktionelle Zwecke nutzen^{3,51,52}. So wird eine Amyloidstruktur bei mehreren humanen Proteinhormonen (z. B. Somatostatin oder Oxytocin) als natürliche Speicherform in sekretorischen Granula vermutet⁵². Zudem wird für Amyloidfibrillen des HET-s-Proteins eine Beteiligung am programmierten Zelltod des Pilzes *Podospora anserina* diskutiert⁵³. Ein weiteres Beispiel ist die Amyloidstruktur des Proteins Curlin, welches *E.coli* vermutlich zur Adhäsion an Oberflächen und für die Bindung von Wirtsproteinen dient⁵⁴. Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass allein das Vorhandensein einer Amyloidstruktur nicht schädlich ist³⁰.

1.4. Die gemeinsamen Eigenschaften von Amyloidfibrillen

Die verschiedenen Polypeptidketten, die mit Amyloidosen assoziiert sind, weisen keine offensichtlichen Homologien in Bezug auf Sequenz, Struktur oder Funktion auf³. Ungeachtet dessen, zeigen jedoch alle Amyloidfibrillen folgende gemeinsame Charakteristika^{30,55}: eine fibrilläre Gesamtstruktur, die Anordnung der Polypeptidketten in einer gekreuzten β -Faltblatt-Struktur, die Interaktion mit spezifischen heteroaromatischen Farbstoffen und ein typisches Infrarot-Absorptionsverhalten.

1.4.1. Die fibrilläre Gesamtstruktur von Amyloidfibrillen

Amyloidfibrillen zeichnen sich durch eine langgestreckte, unverzweigte und fibrilläre Gesamtstruktur aus (Abb. 1.2)⁵⁶⁻⁵⁸. Sie können bis zu einigen Mikrometern lang sein und weisen typischerweise eine Dicke zwischen 5 nm bis 25 nm auf^{3,30}. Amyloidfibrillen sind aus einer oder mehreren filamentösen Grundeinheiten, sogenannten Protofilamenten, aufgebaut (Abb. 1.2b)⁵⁹⁻⁶³. Der Begriff Protofilament bezeichnet eine

lineare Abfolge von Proteinmolekülen. Mehrere Protofilamente interagieren über laterale Kontaktflächen miteinander und lagern sich so zu einer Amyloidfibrille zusammen (Abb. 1.2b).

Amyloidfibrillen sind oft helikal gewunden. Diese Helizität äußert sich durch das periodische Auftreten von scheinbaren Verjüngungen der Fibrillendicke, sogenannten Überkreuzungspunkten (*cross-over*) (Abb. 1.2a). Die meisten Amyloidfibrillen sind linksdrehend gewunden (Abb. 1.2b)^{46,60,63-66}. In diesem Kontext wird die intrinsische Linksdrehung natürlich vorkommender β -Faltblätter aus L-Aminosäuren als vermutliche molekulare Ursache diskutiert^{60,67}. In Übereinstimmung damit können rechtsdrehend gewundene Amyloidfibrillen durch die entsprechenden Polypeptidketten aus D-Aminosäuren gebildet werden^{68,69}. Allerdings widersprechen neuere Daten dieser Hypothese, da auch rechtsdrehend gewundene Amyloidfibrillen aus L-Aminosäure Polypeptidketten gebildet werden können^{70,71}. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen für diese Unterschiede sind bisher nicht geklärt.

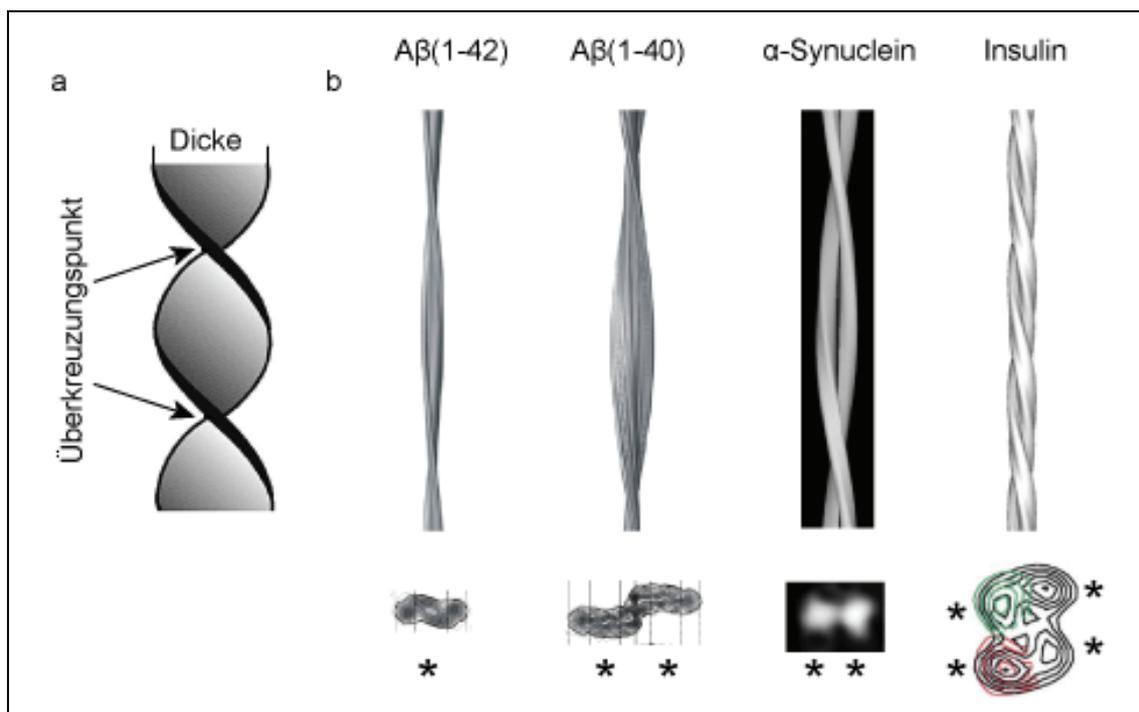


Abbildung 1.2. Die fibrilläre Gesamtstruktur von Amyloidfibrillen.

(a) Definition der Begriffe Dicke und Überkreuzungspunkt anhand einer schematischen Amyloidfibrille. (b) Seitenansicht (oben) und Aufsicht (unten) der dreidimensionalen Rekonstruktion einer A β (1-42)⁶³-, A β (1-40)⁶²-, α -Synuclein⁷² und Insulin-Fibrille⁶⁰. Die Protofilamente der Amyloidfibrillen werden durch „*“ gekennzeichnet. Bildquellen: Fändrich (2009)⁷³, Schmidt et al. (2009)⁶³, Jimenez et al. (2002)⁶⁰, Vilar et al. (2008)⁷².

1.4.2. Die gekreuzte β -Faltblatt-Struktur

Alle Amyloidfibrillen erzeugen im Röntgen- oder Elektronenbeugungsexperiment ein charakteristisches Reflexionsmuster⁷⁴⁻⁷⁶. Dieses Muster besteht bei der Röntgenbeugung aus einer intensiven meridionalen Reflexion bei 4,6 Å bis 4,8 Å und einer schwächeren äquatorialen Reflexion bei 5 Å bis 12 Å (Abb. 1.3a)^{39,74}. Sowohl die Orientierung der Reflexionen als auch deren molekulare Abstände werden als sogenannte gekreuzte β -Faltblatt-Struktur interpretiert^{30,44,74,77}. Diese spezifische Konformation bildet das zentrale strukturelle Rückgrat von Amyloidfibrillen.

Das wesentliche Merkmal der gekreuzten β -Faltblatt-Struktur ist ein intermolekulares β -Faltblatt, welches entlang der Fibrillenlängsachse verläuft (Abb. 1.3b). Demzufolge sind die β -Stränge der einzelnen Polypeptidketten senkrecht zur Fibrillenlängsachse und die intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen des β -Faltblattes parallel zur Fibrillenlängsachse angeordnet (Abb. 1.3b). Als weitere Konsequenz erstrecken sich die Seitenketten der Aminosäuren senkrecht zur β -Faltblattebene (Abb. 1.3c). Die meridionale Reflexion, der sogenannte Hauptkettenabstand, wird durch den Molekülabstand zwischen benachbarten β -Strängen eines β -Faltblattes verursacht und entspricht damit dem Standardabstand der Wasserstoffbrückenbindung. Folglich ist diese Reflexion unabhängig von der Aminosäuresequenz bei etwa 4,7 Å fixiert (Abb. 1.3b). Die äquatoriale Reflexion, der sogenannte Seitenkettenabstand, gibt die Distanz zwischen benachbarten β -Faltblättern wieder und wird somit durch die Länge der

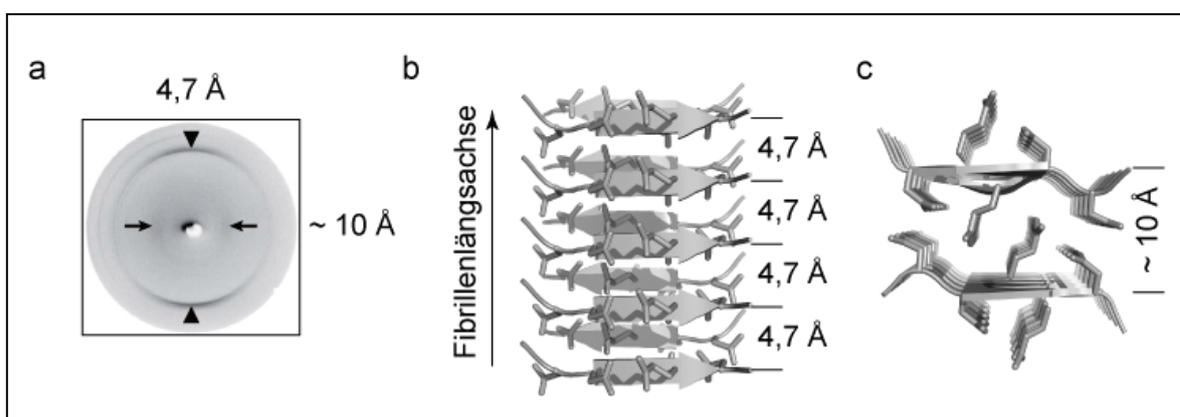


Abbildung 1.3. Die gekreuzte β -Faltblatt-Struktur von Amyloidfibrillen.

(a) Röntgenbeugungsmuster einer $A\beta(1-40)$ -Amyloidfibrille. Eine intensive meridionale Reflexion erscheint bei 4,7 Å; während eine diffuse äquatoriale Reflexion bei etwa 10 Å erscheint⁴⁶. Seitenansicht (b) und Aufsicht (c) einer gekreuzten β -Faltblatt-Struktur eines Mikrokristalls des Sup35(7-13)-Fragments eines Hefeproteins (2OMM.PDB)⁴⁴. Bildquelle: Sachse et al. (2006)⁴⁶.

Seitenketten bestimmt (Abb. 1.3c). Demzufolge ist diese Reflexion von der Aminosäuresequenz abhängig und zeigt eine größere Variabilität zwischen verschiedenen Amyloidfibrillen.

1.4.3. Amyloidfibrillen interagieren mit spezifischen heteroaromatischen Farbstoffen

Amyloidfibrillen besitzen generell ein starke Affinität für heteroaromatische Farbstoffe, wie KR oder ThT, und induzieren charakteristische Veränderungen in deren optischen Verhalten^{34,78}. Dieser Zusammenhang ermöglicht den Nachweis von Amyloidfibrillen mit Hilfe von histologischen und spektroskopischen Methoden.

Die Bindung des Farbstoffes KR an Amyloidfibrillen kann einerseits durch Lichtmikroskopie, nach histologischer Färbung^{34,79}, und andererseits durch Absorptionsspektroskopie⁸⁰ nachgewiesen werden (Abb. 1.4). Die histologische Färbung mit KR ist bis heute die übliche Methode für den Nachweis von Amyloidfibrillen¹⁶. Diesbezüglich ist eine charakteristische rot-grüne Doppelbrechung im kreuzpolarisierten Licht zu beobachten (Abb. 1.4a). Absorptionsspektroskopisch kann die Bindung von KR an Amyloidfibrillen durch eine Verschiebung des Absorptionsmaximums zu höheren Wellenlängen nachgewiesen werden (Abb. 1.4b). Gleichzeitig erhöht sich die Absorptionsintensität im Maximum und eine zusätzliche Absorptionsschulter tritt bei etwa 540 nm auf (Abb. 1.4b).

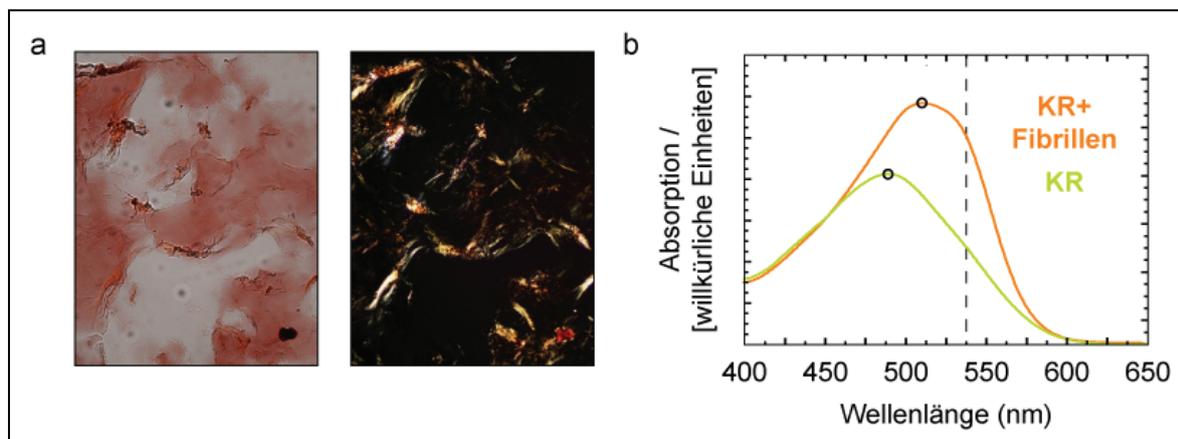


Abbildung 1.4. Die Interaktion von KR mit Amyloidfibrillen.

(a) Lichtmikroskopische Aufnahme von Amyloidfibrillen nach KR-Färbung ohne (links) und mit (rechts) kreuzpolarisiertem Licht. Die Färbung wechselt dabei von rot (links) zu gelb-grün (rechts). (b) Absorptionsspektrum von KR in An- und Abwesenheit von Amyloidfibrillen. Diese induzieren eine deutliche Erhöhung der Absorption und eine Verschiebung des Maximums zu höheren Wellenlängen (Kreis). Zusätzlich entsteht eine Schulter bei ungefähr 540 nm (gestrichelte Linie).

Ein weiterer, oft verwendeter Indikator für die Bildung und Anwesenheit von Amyloidfibrillen ist der Farbstoff ThT^{81,82}. Dessen Bindung an Amyloidfibrillen kann durch Fluoreszenzspektroskopie verfolgt werden, da die Interaktion mit Amyloidfibrillen zu einer deutlichen Erhöhung der ThT-Fluoreszenz führt (Abb. 1.5).

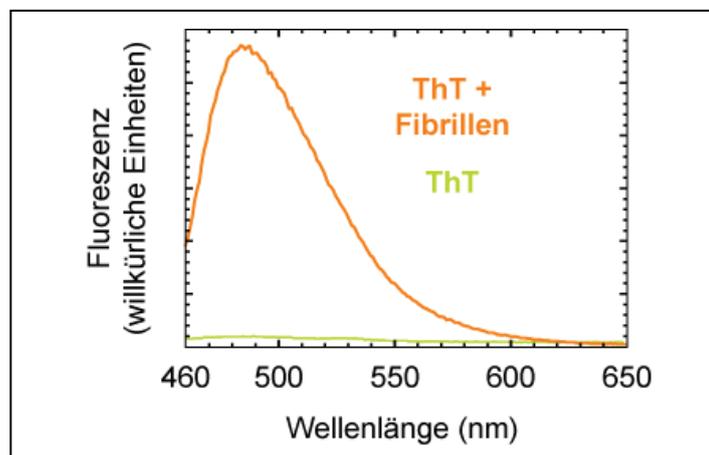


Abbildung 1.5. Die Interaktion von ThT mit Amyloidfibrillen.

(a) Darstellung eines Fluoreszenzspektrums von ThT in An- und Abwesenheit von Amyloidfibrillen. Die Amyloidfibrillen erzeugen eine deutliche Erhöhung der Fluoreszenzintensität von ThT.

1.4.4. Amyloidfibrillen zeigen ein typisches Infrarot-Absorptionsverhalten

Fourier-Transform-Infrarot (FTIR)-Spektroskopie ermöglicht die Unterscheidung von nativen, globulär gefalteten Polypeptidketten und Amyloidfibrillen im Wellenzahlbereich zwischen 1600 cm^{-1} und 1700 cm^{-1} (Abb. 1.6)⁸³⁻⁸⁵. Dieser Bereich, als sogenannte Amid-I-Region (in H_2O) oder Amid-I'-Region (in D_2O) bezeichnet, gibt Auskunft über den konformationellen Kontext des Polypeptidrückgrates und damit über die Sekundärstruktur⁸⁶.

Amyloidfibrillen weisen ein Amid-I- oder Amid-I'-Maximum in der Region von 1611 cm^{-1} bis 1630 cm^{-1} auf, während globuläre β -Faltblatt-Proteine ein Maximum zwischen 1630 cm^{-1} bis 1643 cm^{-1} aufweisen (Abb. 1.6)⁸⁴. Dieser Unterschied wird mit einer größeren Anzahl an β -Strängen und einer geringeren Verdrehung der β -Faltblätter in Amyloidfibrillen erklärt^{60,84}. Daneben wird ein zusätzliches Maximum in der Region von 1675 cm^{-1} bis 1690 cm^{-1} als ein Indiz für das Vorhandensein von antiparallelen β -Faltblättern gewertet⁸⁶⁻⁸⁸. Jedoch gibt es Hinweise, dass ein solches Maximum keine generelle Unterscheidung von parallelen und antiparallelen β -Faltblättern ermöglicht⁸⁹⁻⁹¹ und mit der Anwesenheit von nicht fibrillären Aggregaten assoziiert ist⁹².

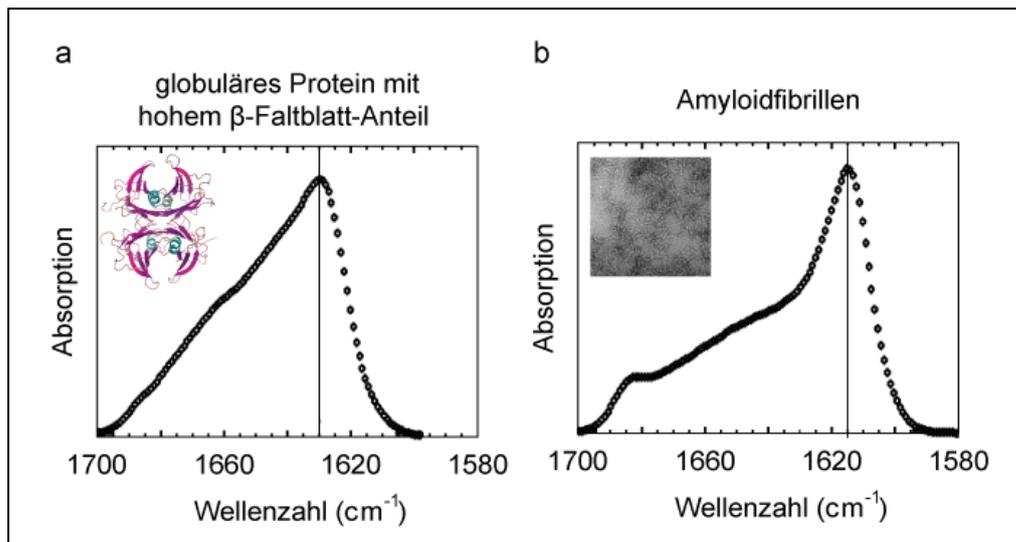


Abbildung 1.6. FTIR-Spektren der globulär gefalteten Polypeptidkette TTR oder TTR-Fibrillen.

Das Amid-I'-Maximum von nativem TTR bei etwa 1630 cm^{-1} (a) unterscheidet sich deutlich von dem Amid-I'-Maximum von TTR-Fibrillen bei etwa 1615 cm^{-1} (b). Die eingefügten Abbildungen zeigen eine Bänderdarstellung von nativem TTR (a, 1RLB.PDB)⁹³ und eine elektronenmikroskopische-Aufnahme von TTR-Fibrillen (b). Bildquelle: Fändrich (2007)³⁰.

1.5. Der strukturelle Aufbau von Amyloidfibrillen

Die Strukturaufklärung von Amyloidfibrillen mittels etablierter Techniken, wie Röntgenkristallographie oder Standard-Flüssigphasen-Kernspinresonanz (*nuclear magnetic resonance*, NMR)-Spektroskopie, wird durch einige Eigenschaften von Amyloidfibrillen beträchtlich erschwert. Dazu gehören das hohe Molekulargewicht, die unlösliche, nicht-kristallisierbare Beschaffenheit und eine große strukturelle Heterogenität. Daher stammen wesentliche strukturelle Informationen über Amyloidfibrillen von verschiedenen biophysikalischen Techniken^{85,94-97}, wie Röntgenbeugung^{43,44,74}, Festkörper-NMR-Spektroskopie⁹⁸⁻¹⁰¹, Flüssigphasen-NMR-Spektroskopie kombiniert mit Wasserstoffaustausch^{53,102-104}, Elektronenmikroskopie^{59,60,62,63}, Zirkulardichroismus-Spektroskopie⁸³ oder FTIR-Spektroskopie^{83,84}. Ergänzende Informationen über die Struktur von Amyloidfibrillen wurden beispielsweise durch limitierte Proteolyse¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ oder systematische Mutagenese-Studien¹⁰⁸⁻¹¹¹ erhalten.

Allerdings ist es bisher nur in Einzelfällen gelungen eine atomare Struktur von Fibrillen, wie beispielsweise für HET-s(218-289)-Fibrillen (pH 7,5)¹¹², aufzuklären. Somit existieren für die meisten Amyloidfibrillen bislang keine atomaren Strukturen, jedoch eine

Vielzahl an strukturell unterschiedlichen Modellen, zum Beispiel für $A\beta(1-40)$ -¹⁰⁰, $A\beta(1-42)$ -¹⁰⁴ oder Amylin(20-29)-Fibrillen¹¹³.

Zusätzlich dienen sogenannte Mikrokristalle als wichtige Modellsysteme für das Verständnis der Struktur von Amyloidfibrillen^{43,44}. Mikrokristalle können aus kurzen Fragmenten verschiedener Polypeptidketten gebildet werden. Sie weisen die typischen Charakteristika von Amyloidfibrillen auf, können im Gegensatz zu diesen jedoch mit Röntgenkristallographie strukturell analysiert werden^{43,44}. Dadurch ermöglichen Mikrokristalle einen Einblick in die vermutliche Struktur von Amyloidfibrillen.

Im Folgenden wird an einigen Beispielen ein Überblick des aktuell diskutierten strukturellen Aufbaus von Amyloidfibrillen und Mikrokristallen verschiedener Polypeptidketten gegeben. Neben den strukturellen Unterschieden zwischen Amyloidfibrillen verschiedener Polypeptidketten treten auch strukturelle Unterschiede zwischen Amyloidfibrillen auf, die aus einer Polypeptidkette entstehen können. Dieser sogenannte Polymorphismus von Amyloidfibrillen wird in einem weiteren Abschnitt beleuchtet.

1.5.1. Strukturen und Strukturmodelle von Amyloidfibrillen

Für längere Peptidfragmente oder Vollängen-Polypeptidketten, wie beispielsweise HET-s(218-289)¹¹², $A\beta(1-40)$ ¹⁰⁰ oder $A\beta(1-42)$ ¹⁰⁴, wird aufgrund von Festkörper-NMR-Daten eine sogenannte β -arch-Struktur in Amyloidfibrillen diskutiert. Ein β -arch wird durch zwei β -Stränge gebildet, die in verschiedenen β -Faltblättern lokalisiert sind und über eine Schleife, einen sogenannten β -arc, verbunden sind (Abb. 1.8b, 1.9)^{114,115}. Als Konsequenz interagieren die beiden β -Stränge über ihre Seitenketten miteinander und nicht über Wasserstoffbrücken, wie es in einer β -Haarnadel-Struktur der Fall ist.

Die Grundstruktur von HET-s(218-289)-Amyloidfibrillen (pH 7,5) ist eine links gewundene β -Helix, deren zentraler Kern aus drei gekreuzten β -Faltblättern besteht (Abb. 1.8)¹¹². Jeweils ein HET-s(218-289)-Molekül bildet zwei Windungen der β -Helix und ist somit an der Bildung von zwei β -Strängen eines jeden gekreuzten β -Faltblattes beteiligt (Abb. 1.8a). Die β -Faltblätter werden aus deckungsgleichen und parallel angeordneten β -Strängen gebildet, wobei deckungsgleich bedeutet, dass alle β -Stränge entlang eines β -Faltblattes in einer Linie ausgerichtet sind (Abb. 1.8). In ihrer Grundstruktur und Geometrie erinnert die HET-s(218-289)-Fibrille (pH 7,5) an globuläre

β -Helix-Proteine^{116,117}, wie zum Beispiel das P22 Tailspike-Protein¹¹⁸ oder die Pektat-Lyase Pel-15¹¹⁹.

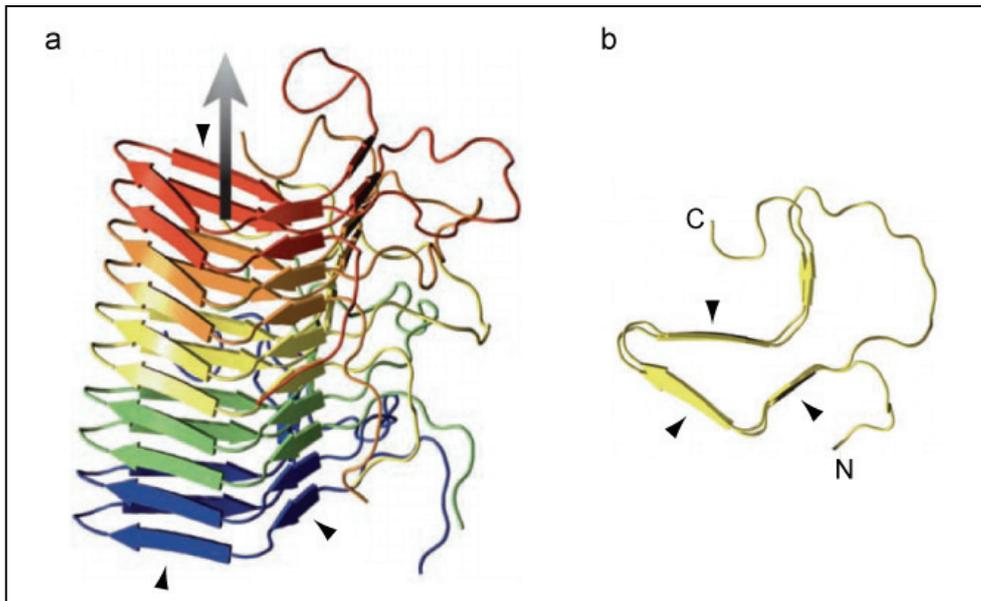


Abbildung 1.8. Struktur einer HET-s(218-289)-Amyloidfibrille (pH 7,5).

Seitenansicht (a) und Aufsicht (b) der Struktur einer HET-s(218-289)-Fibrille (pH 7,5)¹¹². In der Seitenansicht sind fünf HET-s(218-289)-Moleküle farblich kodiert dargestellt. In der Aufsicht ist das zentrale HET-s(218-289)-Molekül aus (a) zu sehen. Die Pfeile zeigen die drei gekreuzten β -Faltblätter, die den zentralen Kern der Amyloidfibrille bilden. Bildquelle: Wasmer et al. (2008)¹¹².

Frühere Modelle von A β (1-40)- und A β (1-42)-Amyloidfibrillen basieren im Wesentlichen auf Festkörper-NMR-Daten^{100,104,120}. Der strukturelle Kern der Protofilamente besteht aus vier (A β (1-40)-Fibrillen)¹⁰⁰ oder zwei (A β (1-42)-Fibrillen)¹⁰⁴ gekreuzten β -Faltblättern (Abb. 1.9). Diese sind aus deckungsgleichen und parallel angeordneten β -Strängen aufgebaut. Die Aufsicht der Protofilamente zeigt, dass jeweils ein A β -Molekül an der Bildung von zwei β -Faltblättern beteiligt ist, wodurch die Polypeptidketten in einer *β -arch*-Struktur vorliegen (Abb. 1.9). In diesem Kontext werden die externen β -Faltblätter des A β (1-40)-Protofilaments durch N-terminale Bereiche der Polypeptidketten (Abb. 1.9a, rot) und die internen β -Faltblätter durch C-terminale Bereiche der Polypeptidketten gebildet (Abb. 1.9a, blau). Der N-Terminus der Polypeptidketten liegt in beiden Fibrillen vermutlich ungeordnet vor und fehlt daher in den Festkörper-NMR-Strukturmodellen^{100,104}.

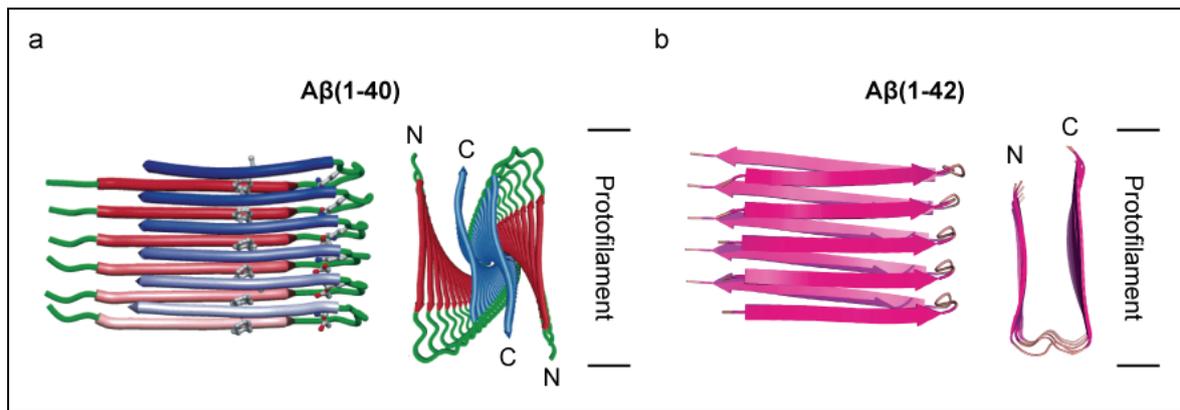


Abbildung 1.9. Strukturmodelle von Aβ(1-40)- oder Aβ(1-42)-Amyloidfibrillen, abgeleitet von Festkörper-NMR.

Seitenansicht (links) und Aufsicht (rechts) der aus Festkörper-NMR abgeleiteten Strukturmodelle von Aβ(1-40)-Fibrillen¹²⁰ (a) oder Aβ(1-42)-Fibrillen¹⁰⁴ (b). Die Seitenansicht der β-Faltblätter zeigt die parallele und deckungsgleiche Orientierung der β-Stränge. Ferner lässt sich in der Aufsicht die *β-arch*-Struktur der Polypeptidketten erkennen. Die Strukturmodelle sind ohne den flexiblen N-Terminus dargestellt. PDB-Zugangscode: Aβ(1-42): 2BEG.PDB¹⁰⁴. Bildquelle: Petkova et al. (2006)¹²⁰.

Dagegen schlagen neuere Studien alternative Strukturen für die Polypeptidketten in Aβ(1-40)- und Aβ(1-42)-Fibrillen vor. Diese wurden aus Kryo-EM-Rekonstruktionen mit einer Auflösung von 8 Å (Aβ(1-40)-Fibrille)⁶² und 15 Å (Aβ(1-42)-Fibrille)⁶³ abgeleitet (Abb. 1.10). Im Gegensatz zu den Festkörper-NMR-Modellen wird für beide Fibrillen eine ähnliche Protofilamentstruktur vorgeschlagen. Der zentrale Kern der Protofilamente besteht aus zwei miteinander gepaarten β-Faltblättern (Abb. 1.10). Im Unterschied zu den Festkörper-NMR-Modellen ist ein Aβ-Molekül an der Bildung von nur einem zentralen β-Faltblatt beteiligt (Abb. 1.10). Diese werden aus C-terminalen Bereichen der Polypeptidketten gebildet (Abb. 1.10). Damit ähnelt diese Struktur den beiden internen β-Faltblättern des Festkörper-NMR-Strukturmodells von Aβ(1-40)-Fibrillen (Abb. 1.9a) und erinnert ferner an die Anordnung des sogenannten Reißverschluss-Motivs (*steric zipper*), welches in Mikrokristallen vorkommt (siehe unten)⁶³. Ein weiterer Unterschied zu den Festkörper-NMR-Strukturmodellen ist die Anordnung der N-Termini der Polypeptidketten. Diese liegen in der Peripherie des Protofilamentes und sind nicht an der Bildung der zentralen β-Faltblatt-Struktur beteiligt (Abb. 1.10). Um jedoch detailliertere strukturelle Aussagen treffen zu können sind weitere Untersuchungen mit höherer Auflösung notwendig.

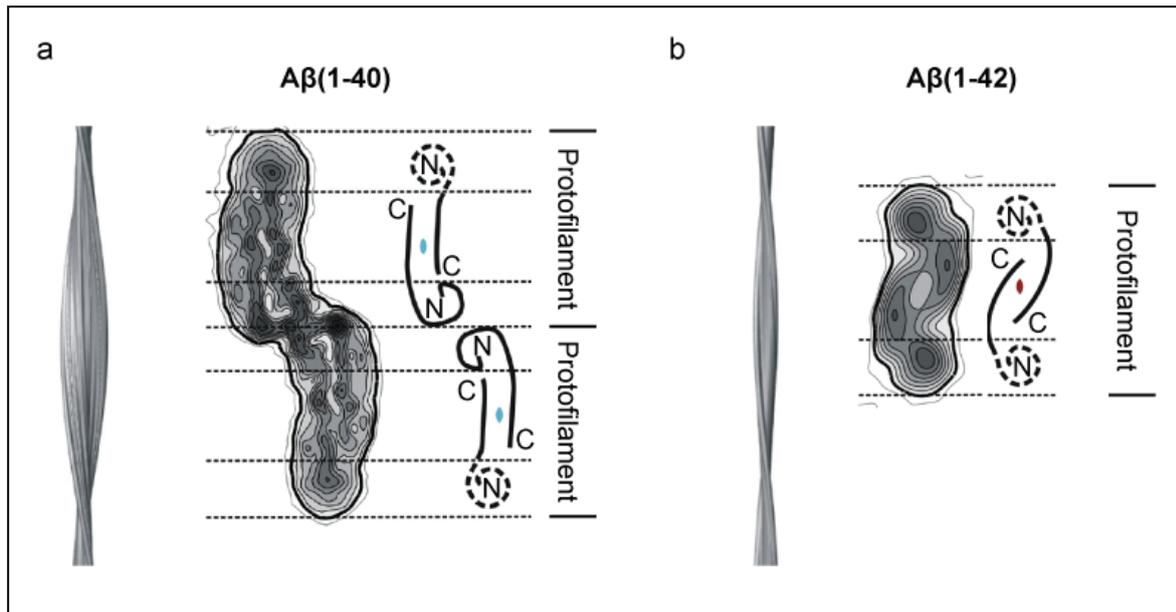


Abbildung 1.10. Strukturmodelle von A β (1-40)- oder A β (1-42)-Amyloidfibrillen, abgeleitet von Kryo-EM.

Seitenansicht (links) und Aufsicht (Mitte) der Kryo-EM-Rekonstruktion, sowie den daraus abgeleiteten Strukturmodellen (rechts) von A β (1-40)-Fibrillen⁶² (a) oder A β (1-42)-Fibrillen⁶³ (b). Die durchgezogenen Linien im Strukturmodell zeigen β -Stränge an, die gestrichelten Linien ungeordnete Bereiche. Bildquelle: Schmidt et al. (2009)⁶³.

Röntgenkristallographische Untersuchungen an Mikrokristallen zeigten, dass deren struktureller Kern aus zwei miteinander gepaarten gekreuzten β -Faltblättern aufgebaut ist (Abb. 1.11)^{43,44}. Das besondere an dieser Anordnung ist die Bildung eines sogenannten Reißverschluss-Motivs⁴⁴. Das Reißverschluss-Motiv entsteht durch das komplementäre und reißverschlussartige Ineinandergreifen der Seitenketten der beiden β -Faltblätter, wodurch eine dicht gepackte Struktur entsteht (Abb. 1.11b). Die gekreuzten β -Faltblätter von Mikrokristallen können einerseits aus deckungsgleichen und parallel angeordneten β -Strängen aufgebaut sein, wie beispielsweise bei Sup35(7-13)-Mikrokristallen, oder andererseits aus deckungsgleichen und antiparallel angeordneten β -Strängen, wie bei Mikrokristallen von Insulin- oder A β -Peptidfragmenten (Abb. 1.11a)⁴⁴. Darüber hinaus wird eine antiparallele β -Faltblatt-Organisation ebenfalls für Amyloidfibrillen von kurzen Peptidfragmenten, wie Amylin(20-29)¹¹³, A β (16-22)¹²¹ oder A β (11-25)⁹⁸, diskutiert (Abb. 1.11).

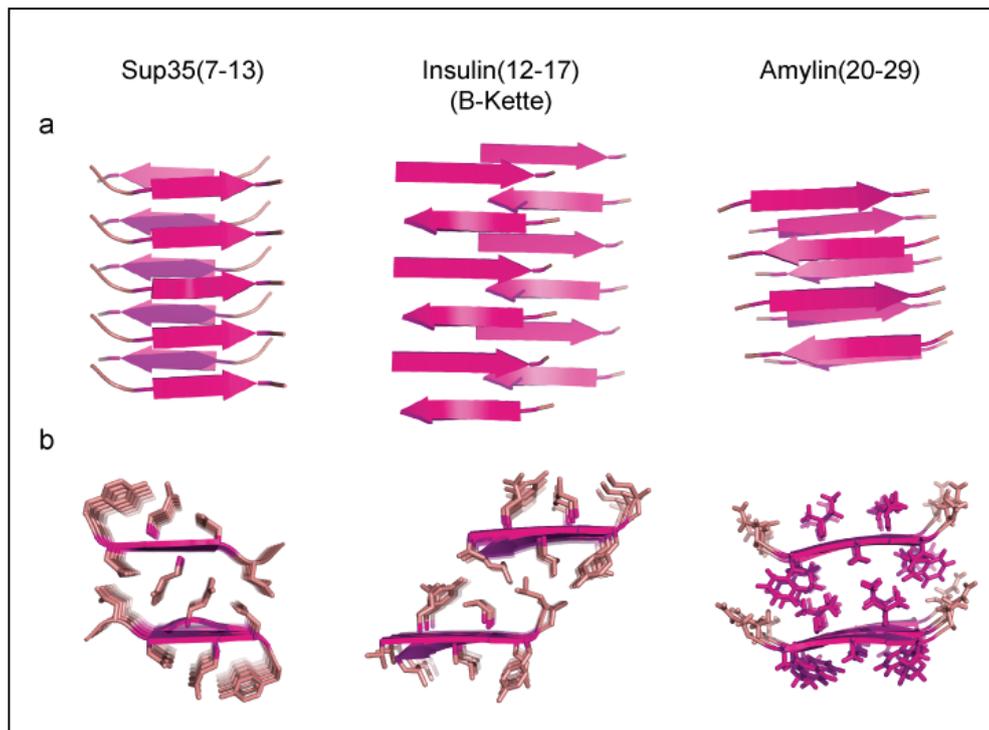


Abbildung 1.11. Strukturen und Strukturmodelle von Mikrokristallen und Amyloidfibrillen.

Seitenansicht (a) und Aufsicht (b) der Mikrokristall-Struktur des Sup35(7-13)-Fragments und Insulin(12-17)-Fragments der B-Kette, sowie des Strukturmodelles einer Amylin(20-29)-Fibrille. PDB-Zugangscode: Sup35(7-13): 2OMM.PDB⁴⁴, Insulin(12-17): 2OMQ.PDB⁴⁴, Amylin(20-29): 2KIB.PDB¹¹³.

1.5.2. Der strukturelle Polymorphismus von Amyloidfibrillen

Das zentrale strukturelle Rückgrat aller Amyloidfibrillen ist die gekreuzte β -Faltblatt-Struktur. Trotzdem kommen Amyloidfibrillen, die aus der gleichen Polypeptidkette gebildet werden, in strukturell verschiedenen Morphologien vor^{3,73,122}. Diese strukturelle Heterogenität, der sogenannte Polymorphismus, tritt sowohl unter verschiedenen, als auch unter identischen Fibrillierungsbedingungen auf^{59,60,64,65,68,83,123-131}. Elektronenmikroskopisch äußert sich der strukturelle Polymorphismus in unterschiedlichen Fibrillendicken und Abständen der Überkreuzungspunkte. Aber auch andere Eigenschaften, wie die Interaktion mit amyloidspezifischen Farbstoffen oder die thermische Stabilität, differieren zwischen verschiedenen Fibrillenmorphologien^{132,133}. Polymorphismen können durch unterschiedliche Anzahlen an Protofilamenten, verschiedene relative Orientierungen der Protofilamente zueinander, sowie unterschiedliche Strukturen der Protofilamente auftreten (Abb. 1.12)⁷³. Daher beeinflusst die Konformation der zugrunde liegenden Polypeptidkette die Struktur der Amyloidfibrille^{73,123,130,134}. Des Weiteren sind, in Übereinstimmung zu Amyloidfibrillen,

auch bei Mikrokristallen strukturelle Polymorphismen zu beobachten^{44,135}. Diese können durch Unterschiede in der Konformation der Polypeptidketten oder der relativen Orientierung der gekreuzten β -Faltblätter zueinander entstehen^{44,135}

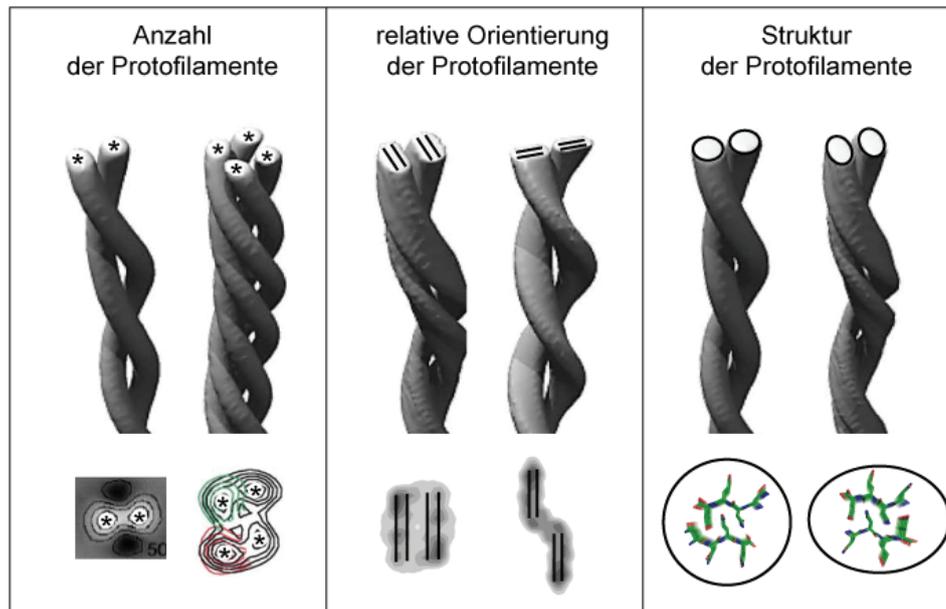


Abbildung 1.12. Polymorphismen von Amyloidfibrillen.

Schematische Darstellung der Seitenansicht (oben) und Aufsicht (unten) verschiedener Fibrillenmorphologien und der zugrunde liegenden strukturellen Polymorphismen. Die strukturellen Unterschiede von Fibrillen können durch verschiedene Anzahlen (links), verschiedene relative Orientierungen (Mitte) oder verschiedene Strukturen der Protofilamente (rechts) entstehen. Einzelne Protofilamente werden durch „*“ gekennzeichnet (links). Die Striche deuten schematisch ein β -Faltblatt an (Mitte). Die abgebildeten Peptid-Konformationen stammen von Mikrokristallen des Sup35(8-11)-Peptidfragmentes⁴⁴ (rechts). Bildquellen: Fändrich (2009)⁷³, Jimenez et al. (2002)⁶⁰, Meinhardt et al.(2009)¹²⁵.

Der strukturelle Polymorphismus von Amyloidfibrillen spiegelt einen grundlegenden Unterschied zur Struktur nativ gefalteter Polypeptidketten wider. Entsprechend der Theorie der Proteinfaltung ist die native Konformation durch die Abfolge der Aminosäure-Seitenketten kodiert^{1,136,137}. Demzufolge faltet sich eine Polypeptidkette immer in die gleiche native Konformation, die auf der Ausbildung von stets identischen molekularen Kontakten beruht¹³⁸. Dagegen führt die Bildung von Amyloidfibrillen zu mehreren stabilen Polypeptid-Konformationen, die sich in ihren molekularen Kontakten unterscheiden. Somit kann aus einer Polypeptidkette ein ganzes Spektrum an strukturell verschiedenen Amyloidfibrillen entstehen^{44,73,135}. In diesem Kontext wird vermutet, dass unterschiedliche Toxizitäten von Amyloidfibrillen auf deren strukturellen Polymorphismus beruhen^{123,139}. Darüber hinaus kann die spezifische Struktur unterschiedlicher Fibrillenmorphologien an sogenannte „Tochterfibrillen“ weitergegeben

werden^{123,140-142}. Dieser Mechanismus der Selbstverbreitung einer spezifischen Struktur wird als Grundlage der Existenz von verschiedenen Prion-Stämmen diskutiert¹⁴³⁻¹⁴⁶.

1.6. Die Mechanismen der Bildung von Amyloidfibrillen

Obwohl bekannt ist, dass Amyloidfibrillen toxische Eigenschaften aufweisen, wird ihre Rolle für die Pathogenese von Amyloidosen kontrovers diskutiert^{3,14,23,147,148}. Eine zunehmende Anzahl an Untersuchungen deutet darauf hin, dass während der Aggregation gebildete Intermediate toxischer sind als die Amyloidfibrillen selbst^{24,147-152}. Daher sind die Kenntnisse über Struktur und Entstehung von intermediären Aggregaten wichtig für das Verständnis der Bildung von Amyloidfibrillen und der Pathogenese von Amyloidosen. Deswegen werden im Folgenden Mechanismen der Aggregationsreaktion dargestellt und eine Zusammenfassung über die in der Literatur diskutierten Intermediate gegeben.

1.6.1. Die Aggregation ist eine nukleationsabhängige Polymerisationsreaktion

Die Bildung von Amyloidfibrillen wird gewöhnlich durch eine nukleationsabhängige Polymerisationsreaktion erklärt^{3,153,154}. Dabei wird die Bildung von Aggregationskeimen (*nuclei*), die sogenannte Nukleation, als der kritische Schritt der Reaktion angesehen (Abb. 1.13a)^{3,153,155}. Im zeitlichen Verlauf treten zwei deutlich voneinander unterscheidbare Phasen auf: eine anfängliche *Lag*-Phase und eine darauffolgende exponentielle Wachstumsphase (Abb. 1.13a)^{3,153,155}. Während der *Lag*-Phase lagern sich Monomere in einem stochastischen Prozess zu Aggregationskeimen zusammen (Abb. 1.13a)^{3,155}. Diesbezüglich wird angenommen, dass die gebildeten Aggregationskeime strukturell sehr verschieden sind¹⁵⁵. Anschließend erfolgt in der Wachstumsphase in einem exponentiell verlaufenden Prozess die Polymerisation der Aggregationskeime zu Amyloidfibrillen (Abb. 1.13a). Es wird vermutet, dass sich anlagernde Polypeptidketten die in den Aggregationskeimen vorliegende spezifische Struktur der Polypeptidketten annehmen¹⁵⁶. Dementsprechend liefert dieses Szenario eine mögliche Erklärung für den zu beobachtenden Polymorphismus von Amyloidfibrillen (Kap. 1.5.2). Des Weiteren tritt während der Wachstumsphase eine Fragmentierung von bereits gebildeten Fibrillen auf³¹. In Folge dessen entstehen zusätzliche freie Enden, an denen wiederum eine Polymerisation stattfinden kann. Dieser Vorgang beschleunigt die

Aggregationsreaktion und führt vermutlich zur exponentiellen Kinetik der Wachstumsphase³¹.

Neben der stochastischen Eigenschaft der Keimbildung wird die Aggregationsreaktion von weiteren Faktoren beeinflusst. So hängen die Neigung zur Aggregation und deren Kinetik zum einen von Parametern ab, die durch die Aminosäuresequenz der Polypeptidkette bestimmt werden, wie die Hydrophobizität oder Ladung, und zum anderen von physikochemischen Parametern, wie pH-Wert oder Temperatur^{155,157-159}. Eine weitere typische Eigenschaft von nukleationsabhängigen Polymerisationsreaktionen ist die Abhängigkeit der *Lag*-Phase von der Proteinkonzentration oder von der Gegenwart von Aggregationskeimen. So führen eine Erhöhung der Proteinkonzentration oder die Zugabe von bereits gebildeten Aggregationskeimen (*Seeding*) zu einer Verkürzung der *Lag*-Phase (Abb. 1.13b)^{153,160,161}. Ferner kann bei entsprechend hohen Proteinkonzentrationen die *Lag*-Phase so weit verkürzt sein, dass diese scheinbar nicht mehr auftritt (Abb. 1.13b). Diesbezüglich wird vermutet, dass die Bildung von Aggregationskeimen unter diesen Bedingungen nicht mehr der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion ist³.

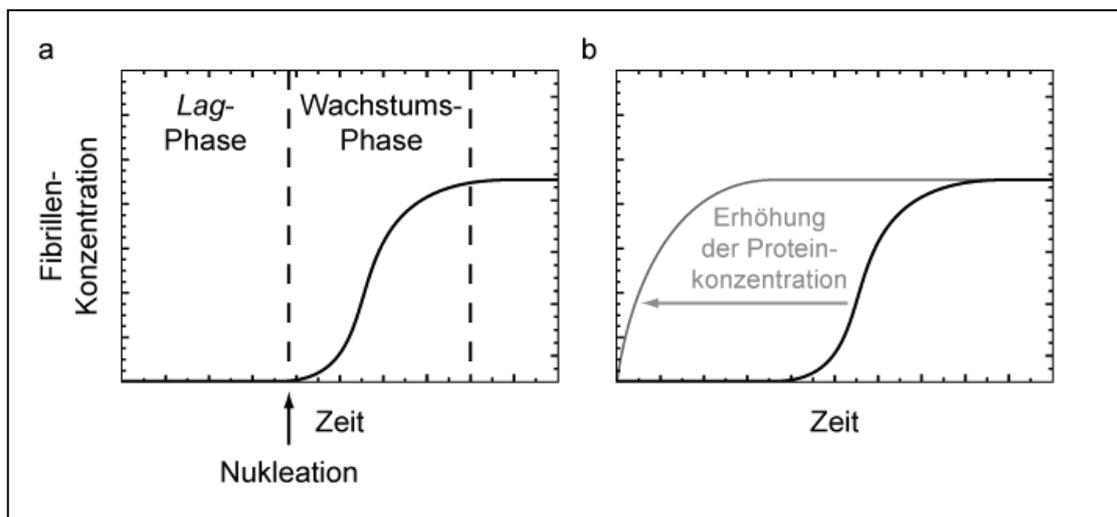


Abbildung 1.13. Eigenschaften einer nukleationsabhängigen Aggregation.

(a) Die nukleationsabhängige Aggregation ist in zwei Phasen unterteilt, die anfängliche *Lag*-Phase und die darauffolgende Wachstumsphase. Die *Lag*-Phase wird durch die stochastische Bildung von Aggregationskeimen (Nukleation) dominiert. Nach der Nukleation findet in der exponentiellen Wachstumsphase eine Polymerisationsreaktion statt, die in der Bildung von Amyloidfibrillen resultiert. (b) Durch Erhöhung der Proteinkonzentration oder Zugabe von Aggregationskeimen kann die *Lag*-Phase verkürzt werden. Bildquelle: Harper & Lansbury (1997)¹⁵³.

1.6.2. Vor der Bildung von Amyloidfibrillen treten kurzlebige Intermediate auf

Im zeitlichen Verlauf der Aggregation lassen sich drei Aggregationspezies klassifizieren, die sich in ihrer Gesamtstruktur deutlich voneinander unterscheiden^{61,150,162-165}. Zu Beginn der Reaktion bilden sich aus den monomeren Polypeptidketten meist runde, nicht-fibrilläre Intermediate, die als Oligomere bezeichnet werden (Abb. 1.14)^{23,150,154}. Im weiteren Verlauf treten intermediär kurze, unregelmäßige, fibrilläre Strukturen auf, die ursprünglich als Protofibrillen definiert wurden (Abb. 1.14)^{166,167}. Als Endprodukte der Aggregation entstehen schließlich Amyloidfibrillen, die sich durch eine lange und geradlinige Struktur auszeichnen (Abb. 1.14). Im Gegensatz dazu weisen Protofibrillen eine gebogene, fibrilläre Struktur auf und sind wesentlich kürzer und schmaler^{166,167}. Der Begriff Protofibrille wird in der Literatur für eine ganze Reihe weiterer Aggregate verwendet, die eine runde, perlenkettenartige, oder ringförmige Struktur aufweisen^{3,24,168}. Im Zusammenhang mit dieser Arbeit bezieht sich der Begriff Protofibrille auf die ursprüngliche Definition^{166,167}. Darüber hinaus werden die Begriffe Protofibrille und Protofilament in der Literatur zum Teil miteinander wechselseitig oder synonym verwendet. Während Protofilamente die filamentösen Grundstrukturen von Fibrillen darstellen (Kap. 1.4.1.), sind Protofibrillen korrekterweise als kurzlebige Intermediate der Aggregation definiert^{166,167}.

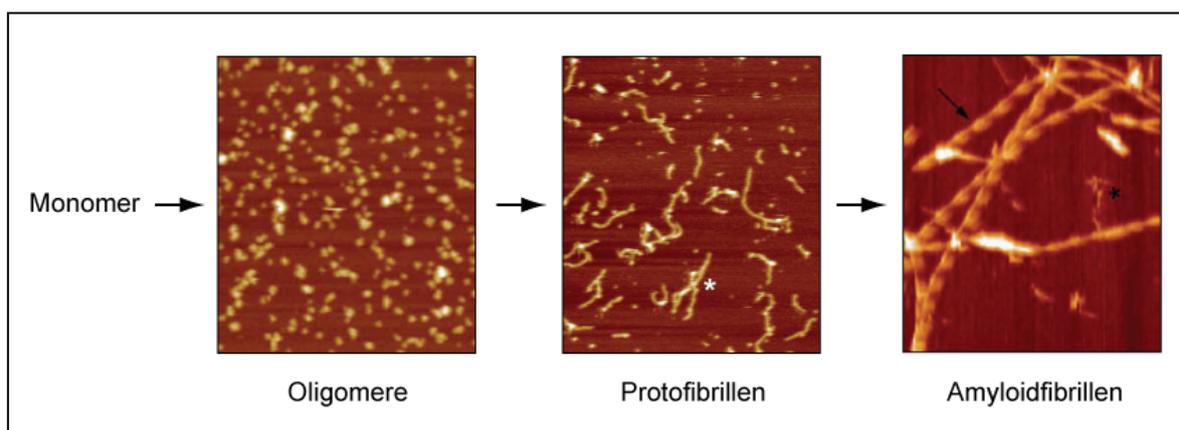


Abbildung 1.14. Auftreten verschiedener Aggregate im zeitlichen Verlauf der Aggregationsreaktion.

Im zeitlichen Verlauf der Aggregation entstehen aus anfänglich monomeren Polypeptidketten nicht-fibrilläre Aggregate, sogenannte Oligomere, denen kurze, fibrilläre Aggregate, sogenannte Protofibrillen, folgen. Abschließend bilden sich mit den reifen Amyloidfibrillen die Endprodukte der Aggregation. Bildquelle: Goldsbury et al. (2005)⁶¹.

Darüber hinaus wurde eine ganze Reihe an vermutlichen Aggregations-Intermediaten, mit fibrillärer und nicht-fibrillärer Struktur beschrieben. Diese wurden aus Gehirnen extrahiert^{169,170}, wie beispielsweise A β *56¹⁶⁹, oder *in vitro* nach spezifischen Protokollen gebildet, wie Paranuclei¹⁷¹, lösliche Oligomere¹⁴⁹, A β -*derived diffusible ligands*¹⁷², Globulomere¹⁷³ oder ringförmige Protofibrillen²⁶. Deren Nomenklatur erfolgt oftmals nach ihrem Verhalten bei Zentrifugation oder ihrer strukturellen Erscheinung^{23,169,173}. Für die meisten Aggregate ist weder deren Beziehung zueinander, noch deren Rolle bei der Aggregation geklärt^{147,174}. Ferner ist es aufgrund der variierenden experimentellen Bedingungen und der strukturellen Heterogenität möglich, dass verschiedene Begriffe gleiche Strukturen beschreiben oder umgekehrt verschiedene Strukturen durch einen Begriff beschrieben werden. In diesem Zusammenhang wurde bereits über die Notwendigkeit von alternativen Kriterien für die Klassifizierung und Definition von Aggregaten diskutiert^{31,174}.

Aufgrund der Heterogenität und Instabilität von intermediären Aggregaten sind diese strukturell kaum charakterisiert. In wenigen Fällen konnten strukturelle Untersuchungen bei spezifischen Präparationen¹⁷⁵⁻¹⁷⁸ oder durch den Einsatz von stabilisierenden Molekülen durchgeführt werden^{179,180}. In diesem Zusammenhang zeigte sich, dass einige intermediäre Aggregate eine β -Faltblatt-reiche Struktur aufweisen^{173,181-184}. Dennoch unterscheiden sie sich von Amyloidfibrillen durch eine flexiblere und weniger kompakte Struktur^{175,177,179,184,185}. In Übereinstimmung damit weisen Oligomere und Protofibrillen generell eine relativ schwache Interaktion mit amyloidspezifischen Farbstoffen, wie KR oder THT, auf^{124,149,179,186}.

1.7. Die Rolle verschiedener Aggregate in der Pathogenese von Amyloidosen

Die Pathogenität von Oligomeren, Protofibrillen und Amyloidfibrillen ist noch nicht vollständig geklärt und wird intensiv diskutiert^{3,14,23,147,148}. Ursprünglich wurde mit der Entdeckung von Amyloidfibrillen im pathologischen Gewebe die Hypothese aufgestellt, dass diese ursächlich für die Auslösung von Amyloidosen verantwortlich sind. Diese Annahme wird vor allem bei neurodegenerativen Erkrankungen dadurch unterstützt, dass Fibrillen eine zytotoxische Wirkung aufweisen und zur Aktivierung von Mikroglia führen^{20,21,187-191}. Jedoch korreliert die Akkumulation von Amyloidablagerungen nicht

direkt mit den Symptomen und der Ausprägung von Erkrankungen, weder beim Menschen noch in Maus-Modellen^{3,23,147,192}. Darüber hinaus mehren sich in letzter Zeit die Hinweise, dass primär die intermediären Aggregate, wie Oligomere oder Protofibrillen, für die Auslösung von Amyloidosen verantwortlich sind^{24,147-152}. In diesem Kontext zeigen auch Intermediate von Polypeptidketten, die nicht in Zusammenhang mit Amyloidosen stehen eine zytotoxische Wirkung^{3,164,193}. Ergebnisse neuerer Studien lassen gar vermuten, dass Amyloidfibrillen in einigen Fällen eine protektive, detoxifizierende Rolle einnehmen, da sie intermediäre Aggregate binden und dadurch die Menge an toxischen Spezies reduzieren können^{23,24,194}. Möglicherweise ist auch die Pathogenese von Amyloidosen nicht generell mit einer Spezies von Aggregaten verbunden und differiert von Fall zu Fall^{23,123,147,189,193}. Darüber hinaus kann vermutlich das Zusammenspiel mehrerer pathologischer Ereignisse, die gleichzeitig durch verschiedene Aggregate hervorgerufen werden, die Ursache für die massiven zellulären Fehlfunktionen sein^{147,190,195}.

Allgemein wird als pathogener Mechanismus eine Interaktion von Aggregaten mit Membranen diskutiert. Diesbezüglich wird für Amyloidfibrillen sowohl eine mechanische Penetration (Abb. 1.15b)²², als auch eine lokale Destabilisierung der Zellmembran, durch die Integration von Lipiden in auswachsende Fibrillen an der Membran (Abb. 1.15a)^{196,197}, vorgeschlagen. Intermediäre Aggregate verursachen vermutlich eine Penetration oder Permeabilisierung von Membranen (Abb. 1.15c)^{24,25,164,168,198}. In diesem Kontext werden sowohl die Exposition hydrophober Aminosäuren auf der Oberfläche, als auch die strukturelle Flexibilität von Intermediaten als entscheidende Ursache für deren pathogene Wirkung angesehen^{41,193}. In Folge der Interaktion von Amyloidfibrillen oder Intermediaten mit Membranen können verschiedene Störungen der zellulären Homöostase auftreten^{25,41,199}, wie beispielsweise der Zusammenbruch des Calcium-Spiegels^{193,200}, Fehlfunktionen von Mitochondrien^{201,202} oder eine Fragmentierung des Golgi-Apparates²⁰³. Als weiterer pathogener Mechanismus, vor allem bei zerebralen Amyloidosen, wird die Interaktion von Aggregaten mit Membranproteinen diskutiert²⁰⁴⁻²⁰⁶. Neben verschiedenen Rezeptoren für intermediäre Aggregate²⁰⁷⁻²¹⁰ sind wahrscheinlich Mustererkennungs-Rezeptoren^{211,212} entscheidende Interaktionspartner für Amyloidfibrillen. Diese Rezeptoren stellen eine ursprüngliche Gruppe von spezialisierten Zelloberflächen-Rezeptoren des angeborenen Immunsystems dar²¹¹. Zu den Mustererkennungsrezeptoren gehören zum Beispiel der Rezeptor für Endprodukte fortgeschrittener Glykosilierung (*receptor for advanced glycation end products*, RAGE)²¹³ oder die Gruppe der Scavenger-Rezeptoren²¹⁴. Im Zusammenhang mit Amyloidosen wird für diese Rezeptoren eine

Aktivierung von Mikroglia, Neuronen oder Makrophagen diskutiert, wodurch vermutlich Entzündungsreaktionen und zelluläre Fehlfunktionen induziert werden^{210,213-215}.

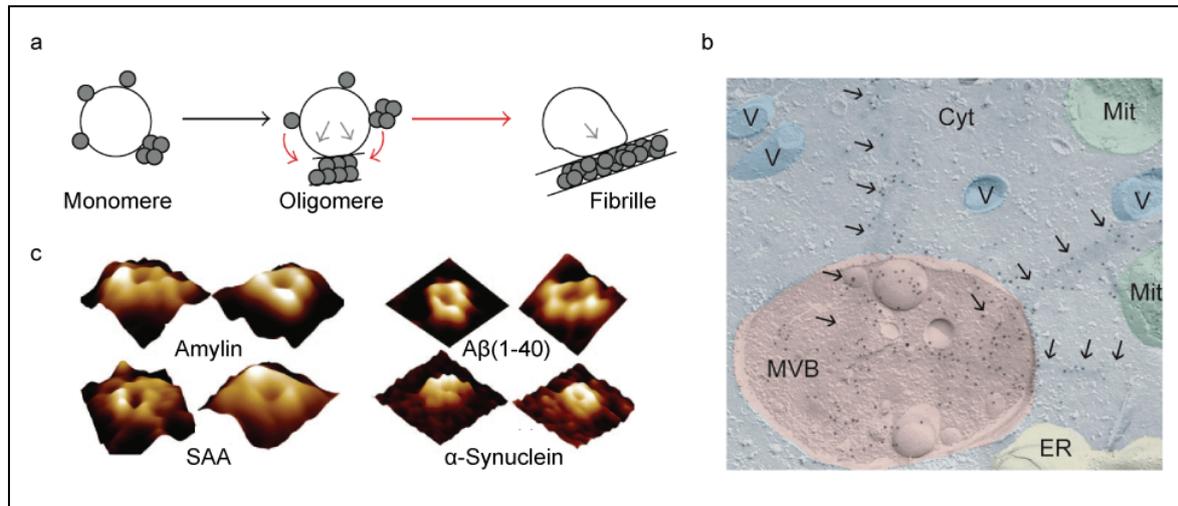


Abbildung 1.15. Aggregations-Spezies und ihr pathogener Mechanismus.

(a) Durch die Bildung von Amyloidfibrillen an Membranen werden Protein-Lipid-Komplexe in die Fibrille integriert und dadurch die Membran destabilisiert. (b) Amyloidfibrillen (schwarze Pfeile) penetrieren die Membran von multivesikulären Körpern (*multivesicular bodies*, MVB). (c) Intermediäre Aggregate verschiedener Polypeptidketten bilden Poren in Membranen. Bildquellen: Quist et al. (2005)¹⁹⁸, Khemtourian et al. (2008)²¹⁶, Friedrich et al. (2010)²².

1.8. Konformationssensitive Bindemoleküle ermöglichen die spezifische Erkennung von Amyloidfibrillen

Aufgrund der konformationellen Unterschiede zwischen der nativen Struktur einer Polypeptidkette und deren Struktur in Amyloidfibrillen ist es möglich, diese Zustände durch konformationssensitive Bindemoleküle zu unterscheiden. Diese Art der spezifischen Erkennung ist potentiell interessant für die klinische Diagnostik und Therapie von Amyloidosen. In diesem Zusammenhang werden im Folgenden einige konformationssensitive Bindemoleküle und ihre Eigenschaften vorgestellt.

1.8.1. Kongorot

Die Erkennung von Amyloidfibrillen durch KR ist seit mehr als 80 Jahren bekannt und ist bis heute die übliche Methode für die histologische Diagnostik von Amyloidosen (Kap. 1.4.3)^{16,37}. KR ist eine aromatische Diazo-Verbindung, die hydrophobe Bereiche mit aromatischen Ringen und geladene, hydrophile Bereiche mit Säure- und Aminogruppen aufweist (Abb. 1.16a)^{37,217}. Die molekularen Grundlagen der Bindung von KR an Amyloidfibrillen sind nicht vollständig geklärt. Es wird angenommen, dass KR mit den regelmäßig angeordneten Polypeptidketten in Amyloidfibrillen interagiert^{80,218}. In diesem Zusammenhang wurde eine parallele oder senkrechte Ausrichtung von KR zur Fibrillenlängsachse vorgeschlagen (Abb. 1.16b)^{80,219-221}. Des Weiteren wird vermutet, dass die Bindung von KR auf ionischen und/oder hydrophoben Interaktionen basiert^{35,37,80,221}.

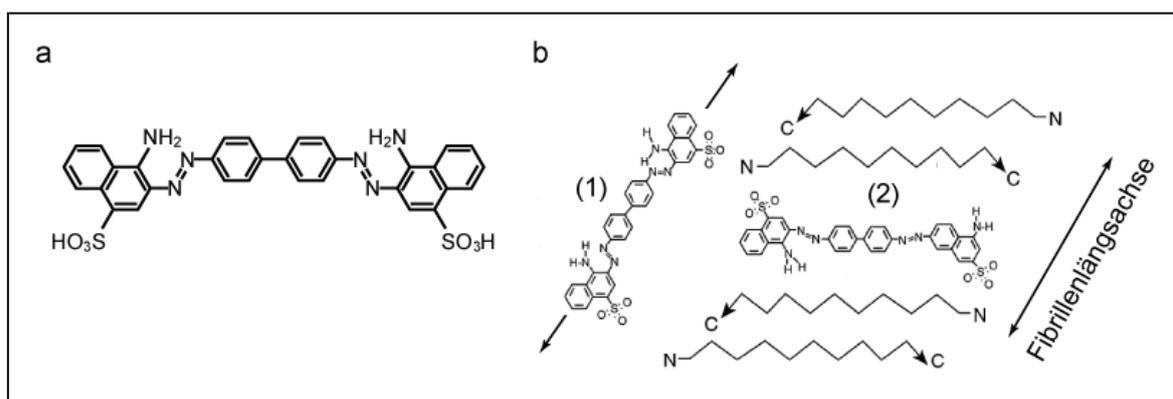


Abbildung 1.16. Der Mechanismus der Erkennung von Amyloidfibrillen durch KR.

(a) Strukturformel von KR (b) Alternative Hypothesen der Orientierung von KR nach Bindung an Amyloidfibrillen. Demzufolge ist KR entweder parallel (1) oder senkrecht (2) zur Fibrillenlängsachse ausgerichtet. Bildquelle: Carter & Chou (1998)²²⁰.

Das diagnostische und therapeutische Potential von KR oder dessen Analoga, wie Chrysamine-G oder Methoxy-X04, wird vor allem bei zerebralen Amyloidosen diskutiert^{222,223}. In diesem Zusammenhang wird deren Potential für die diagnostische Anwendung mittels nicht-invasiver Verfahren aufgrund von *in vitro*- und Tiermodell-Versuchen als vielversprechend bewertet²²³⁻²²⁷. Allerdings ist deren zerebrale Aufnahme aufgrund einer begrenzten Permeabilität durch die Blut-Hirn-Schranke eingeschränkt und bislang nicht ausreichend, um eine Anwendung in klinischen Studien zu rechtfertigen^{217,222,228,229}. Im Zusammenhang mit einigen neurodegenerativen Erkrankungen zeigen KR oder dessen Analoga *in vitro* einen inhibitorischen Effekt auf die

Bildung von Fibrillen^{21,230,231}. Allerdings sind in diesem Fall weitere Arbeiten notwendig, um das therapeutische Potential dieser Moleküle aufzuklären.

1.8.2. Thioflavin T

Häufig wird der Farbstoff ThT als ein Indikator für Amyloidfibrillen genutzt (Kap. 1.4.3)^{81,82}. ThT ist eine Benzothiazol-Verbindung und weist hydrophobe Bereiche aus aromatischen Ringen und einer Dimethylaminogruppe und einen zentralen positiv geladenen Bereich auf (Abb. 1.17a)^{36,81}. Der Mechanismus der Bindung von ThT an Amyloidfibrillen ist bisher nicht geklärt. Es wird angenommen, dass ThT parallel zur Fibrillenlängsachse zwischen den exponierten Aminosäure-Seitenketten interkaliert (Abb. 1.17b)^{38,232,233}. Diesbezüglich wird eine Interaktion mit aromatischen und aliphatischen Seitenketten vermutet³⁸.

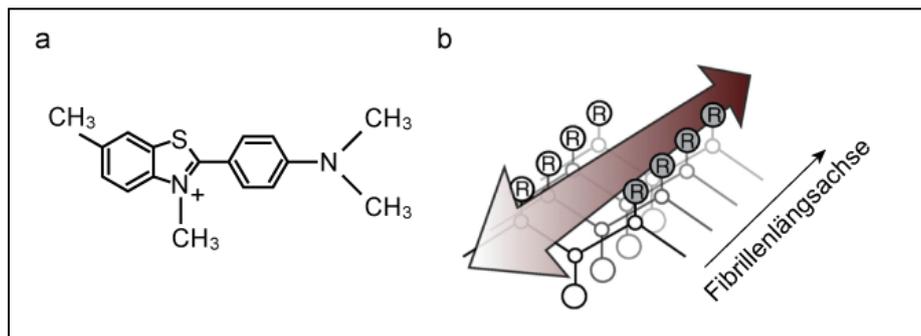


Abbildung 1.17. Der Mechanismus der Erkennung von Amyloidfibrillen durch ThT.

(a) Struktur von ThT. (b) ThT interkaliert parallel zur Fibrillenlängsachse in den Zwischenraum, der von den Aminosäure-Seitenketten begrenzt wird. Bildquelle: Biancalana & Koide (2010)³⁸.

Für ThT wird analog zu KR ein Ansatz für die nicht-invasive Diagnostik von zerebralen Amyloidosen verfolgt. Aufgrund der vermutlich eingeschränkten zerebralen Gängigkeit des geladenen ThT (Abb. 1.17a) existieren eine ganze Reihe von ungeladenen Analoga, wie zum Beispiel Pittsburgh Compound-B^{229,234,235}. Dieses wurde erfolgreich an Tier-Modellen und in klinischen Studien an Patienten der Alzheimer-Krankheit getestet^{229,236}. Weitere Studien deuten darauf hin, dass Pittsburgh Compound-B quantitative Informationen über Amyloidablagerungen im Gehirn liefern kann, sowie bei der Frühdiagnostik der Alzheimer-Erkrankung und deren Unterscheidung von anderen neurodegenerativen Erkrankungen helfen kann^{237,238}.

1.8.3. Serum Amyloid P

SAP ist ein globuläres Plasmaprotein und tritt als sekundäre Komponente von Amyloidablagerungen auf^{14,239}, wobei es in Abhängigkeit von Calcium an Amyloidfibrillen bindet²⁴⁰. SAP zählt zur Familie der Pentraxine, welche als lösliche Bindemoleküle eine Komponente des angeborenen Immunsystems darstellen und verschiedene Liganden durch Mustererkennung binden²⁴¹. Diesbezüglich erkennt SAP nicht nur Amyloidfibrillen, sondern eine ganze Reihe weiterer Liganden, wie zum Beispiel die polyanionischen Moleküle DNS, Heparin, Heparansulfat oder Dermatansulfat²⁴¹⁻²⁴³.

Die molekulare Struktur von SAP ist im Detail bekannt^{242,244,245}. Es kommt in Abhängigkeit der Calciumkonzentration entweder als Pentamer (Abb. 1.18) oder Dekamer vor^{242,244,245}. Jedes Monomer besitzt zwei potentielle Calcium-Bindungsstellen (Abb. 1.18a) und weist in deren Umgebung mehrere positiv geladene Oberflächen auf (Abb. 1.18b)^{242,244,245}. Allerdings sind die molekularen Grundlagen der Bindung von SAP an Amyloidfibrillen bisher nicht abschließend geklärt. Es wird angenommen, dass die Bindung von Amyloidfibrillen, sowie von DNS und Polysacchariden, hauptsächlich auf elektrostatischen Interaktionen mit den komplexierten Calciumionen beruht (Abb. 1.18)^{242,245}. In diesem Zusammenhang wurde eine Bindung von negativ geladenen Aminosäuren in Amyloidfibrillen durch SAP vorgeschlagen²⁴⁵. Des Weiteren sind vermutlich einige stark positiv geladene Oberflächenbereiche von SAP an der

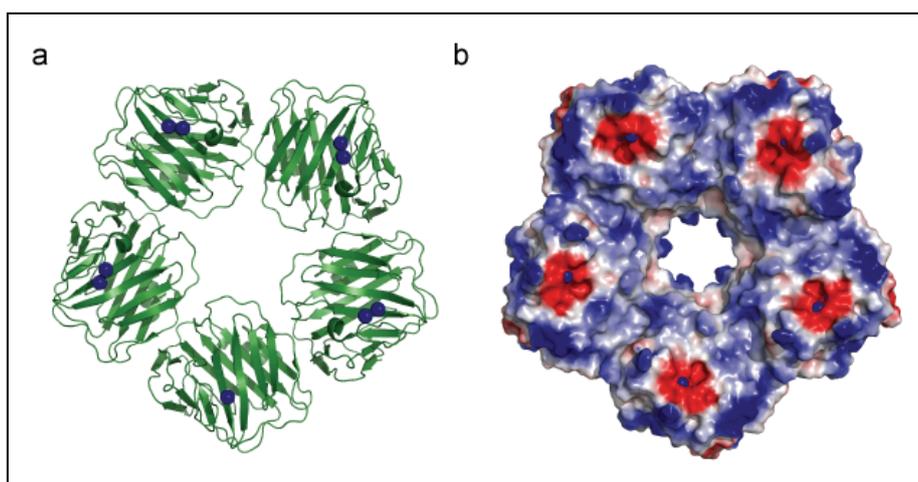


Abbildung 1.18. Der strukturelle Aufbau von SAP.

Darstellung der Struktur eines SAP-Pentamers als Bändermodell (a) oder als elektrostatische Oberfläche (b). Die komplexierten Calciumionen sind in (a) blau dargestellt. Die elektrostatische Oberfläche von SAP zeigt eine auffällende und regelmäßige Anreicherung an positiven Ladungen um die Calcium-Bindestellen (zentrale rote Bereiche). PDB-Zugangscod: 1GYK.PDB²⁴⁵.

Erkennung von Amyloidfibrillen, DNS und Polysacchariden beteiligt, wobei möglicherweise auch mehrere Monomere gleichzeitig an einen Liganden binden (Abb. 1.18b)^{242,246}.

SAP wird aktuell bei der nicht-invasiven Diagnostik von einigen systemischen Amyloidosen angewendet, um die Quantität von Amyloidablagerungen und den Verlauf von Therapien verfolgen zu können^{14,247}. Allerdings wird diese Methode bisher nur lokal in Großbritannien angewendet^{14,247}. Durch die Bindung an Amyloidfibrillen verhindert SAP vermutlich deren Phagozytose und enzymatischen Abbau^{248,249}. Als therapeutischer Ansatz wird deshalb die Inhibition der Bindung von SAP an Fibrillen durch kleine Moleküle verfolgt^{244,245,248}. Der Inhibitor (R)-1-[6-[(R)-2-Carboxy-pyrrolidin-1-yl]-6-oxo-hexanoyl]pyrrolidin-2-carbonsäure konnte in Tier-Modellen und in klinischen Studien systemischer und zerebraler Amyloidosen erfolgreich die Interaktion von SAP mit Amyloidfibrillen unterbinden^{244,248}. Ferner wurde eine deutliche Reduktion von Amyloidablagerungen im Tier-Modell beobachtet²⁴⁸. Ob diese Wirkung allerdings auch im Menschen auftritt muss in Folgestudien noch untersucht werden.

1.8.4. Der Rezeptor für Endprodukte fortgeschrittener Glykosilierung

RAGE ist ein membranständiger Mustererkennungsrezeptor und besteht aus einer extrazellulären Liganden-Bindedomäne (sRAGE), einer Transmembrandomäne und einem zytosolischen Anteil (Abb. 1.19a)²¹³. Die Liganden-Bindedomäne sRAGE ist aus drei Immunglobulin-ähnlichen Domänen (V, C1, C2) aufgebaut (Abb. 1.19a)²¹³ und kann durch die Proteolyse von RAGE als lösliches Bindemolekül freigesetzt werden²⁵⁰. Die strukturelle Einheit aus V- und C1-Domäne (VC1) ist hauptsächlich für die Ligandenbindung verantwortlich. Die beiden Domänen weisen unterschiedliche Ligandenspezifitäten auf, wobei die V-Domäne die Mehrzahl der Liganden bindet^{250,251}. RAGE erkennt verschiedene Amyloidfibrillen und ist wahrscheinlich in die Pathogenese einiger Amyloidosen involviert^{204,205}. Neben Amyloidfibrillen erkennt RAGE auch eine ganze Reihe glykosilierter Liganden, sogenannte Endprodukte fortgeschrittener Glykosilierung, und die polyanionischen Moleküle Heparin und DNS²⁵²⁻²⁵⁵. Die molekularen Grundlagen der Bindung von RAGE an Amyloidfibrillen sind bisher nicht geklärt. VC1 weist eine signifikante Anreicherung an positiv geladenen Aminosäuren auf, die besonders wichtig für die Interaktion mit seinen Liganden sind (Abb. 1.19b)^{256,257}. Diesbezüglich wird

vermutet, dass die positiv geladenen Bereiche von VC1 eine Interaktionsfläche für die spezifische Bindung der meist negativ geladenen Liganden bietet^{256,257}.

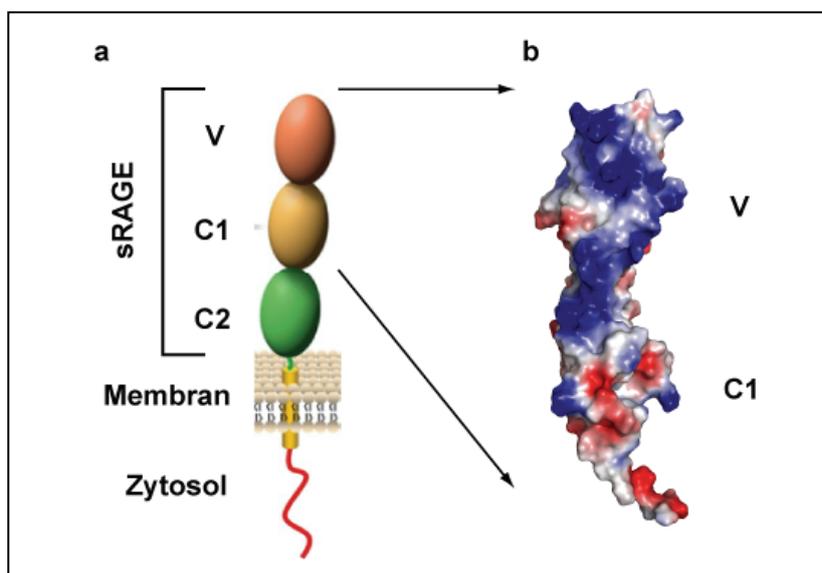


Abbildung 1.19. Der strukturelle Aufbau von RAGE.

(a) Schema des strukturellen Aufbaus von RAGE. Die extrazelluläre Liganden-Bindedomäne sRAGE besteht aus den drei Domänen V, C1 und C2. (b) Die elektrostatische Oberfläche der Röntgenkristallstruktur der beiden Domänen V und C1 (VC1) zeigt eine signifikante Anreicherung an positiv geladenen Aminosäuren (blau), die besonders wichtig für die Bindung von Liganden sind. Bildquelle: Leclerc et al. (2009)²⁵⁰. PDB-Zugangscode der VC1-Struktur: 3CJJ.PDB²⁵⁷.

Aufgrund der vermutlichen Beteiligung an der Pathogenese verschiedener Amyloidosen ist RAGE ein potentielles Ziel für therapeutische Anwendungen. RAGE ist in Phagozyten, Neuronen und Endothel-Zellen bei Patienten mit Alzheimer-Krankheit und einigen systemischen Amyloidosen überexprimiert^{254,255,258,259}. In diesem Kontext induziert RAGE vermutlich oxidativen Stress²⁵⁴ oder aktiviert NF- κ B²⁵⁴ und die Expression des Makrophagen-Kolonie-Stimulationsfaktors²⁶⁰. Dies führt unter anderem zur Aktivierung von Makrophagen oder zur Induktion von Apoptose in Neuronen^{255,261}. Als therapeutischer Ansatz wird deshalb die Inhibition von RAGE durch sRAGE als Kompetitor diskutiert. Die Zugabe von sRAGE verhinderte in Zellkultur und einem Maus-Modell für systemische Amyloidosen die Aktivierung von RAGE und die Bindung von Fibrillen an RAGE²¹³. Des Weiteren wurde eine Reduktion von Amyloidablagerungen beobachtet²¹³. Allerdings sind weitere Untersuchungen nötig, um das Potential von sRAGE bewerten zu können. Ein anderer Inhibitor von RAGE, PF-04494700, wird aktuell in einer klinischen Phase-II-Studie zur Behandlung der Alzheimer-Krankheit getestet (www.alzforum.org).

1.8.5. Die kollagenähnliche Alzheimer amyloide Plaque-Komponente

Die kollagenähnliche Alzheimer amyloide Plaque-Komponente (*collagen-like Alzheimer amyloid plaque component*, CLAC) bildet die extrazelluläre Liganden-Bindedomäne des spezifisch in Neuronen exprimierten Transmembranproteins *CLAC-P/collagen type XXV* (CLAC-P/Col XXV) (Abb. 1.20)²⁶². Durch enzymatische Spaltung kann CLAC als lösliches Bindemolekül freigesetzt werden und bildet vermutlich Trimere, die aus einer kollagenähnlichen Tripel-Helix bestehen^{262,263}. CLAC kommt als sekundäre Komponente von Amyloidablagerungen im Gehirn von Alzheimer-Erkrankten vor²⁶². Daneben belegen *in vitro*-Untersuchungen, dass CLAC verschiedene Amyloidfibrillen erkennt²⁶²⁻²⁶⁴. Darüber hinaus bindet CLAC an Heparin, welches mit A β -Amyloidfibrillen um die Bindung von CLAC kompetitiert^{263,265}. Da diese Bindung empfindlich gegenüber NaCl ist, wird angenommen, dass CLAC seine Liganden über ionische Interaktionen erkennt^{263,265}. Bei der Bindung von Amyloidfibrillen spielen vermutlich Bereiche mit mehreren positiv geladenen Aminosäuren in der K1- und NK2-Domäne eine entscheidende Rolle (Abb. 1.20)^{263,265}. In diesen Bereichen ist ebenfalls ein typisches Sequenzmotiv heparinbindender Proteine enthalten²⁶⁵. Daher wird angenommen, dass diese positiv geladenen Regionen von CLAC mit negativ geladenen Bereichen in Amyloidfibrillen und Heparin interagieren^{263,265}.

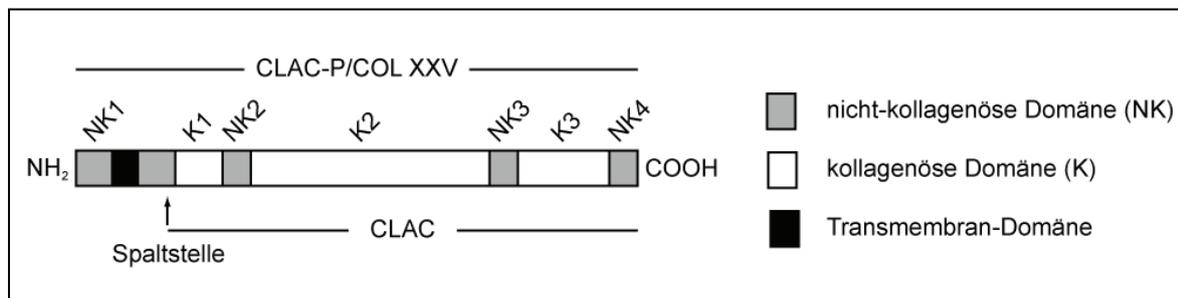


Abbildung 1.20. Der schematische Aufbau von CLAC.

CLAC bildet die extrazelluläre Liganden-Bindedomäne des Transmembran-Proteins CLAC-P/COL XXV. Es besteht aus mehreren kollagenösen (K) und nicht-kollagenösen (NK) Domänen. Bildquelle: Osada et al. (2005)²⁶⁵.

Die Rolle von CLAC in der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit ist bisher kaum verstanden. *In vitro* stabilisiert CLAC A β -Amyloidfibrillen gegenüber proteolytischen Verdau²⁶⁴. Ob diese Wirkung eine therapeutische Relevanz besitzt konnte bisher allerdings nicht geklärt werden.

1.8.6. Konformationssensitive Antikörper

Eine Reihe von Antikörpern ist in der Lage, bevorzugt eine spezifische Konformation statt der Sequenz einer Polypeptidkette zu erkennen. Diese sogenannten konformationssensitiven Antikörper unterscheiden somit verschiedene konformationelle Zustände einer Polypeptidkette. Einige dieser Antikörper binden spezifisch an Amyloidablagerungen oder Amyloidfibrillen²⁶⁶⁻²⁶⁹, während andere lösliche Oligomere erkennen können¹⁴⁹. Bei einigen der Antikörper wurde beobachtet, dass diese Fibrillen oder Oligomere unabhängig von der Sequenz der zugrunde liegenden Polypeptidkette erkennen, wie WO1 (Abb. 1.21a) und WO2²⁶⁶, LOC und OC²⁶⁸, 11-1F4²⁶⁹ oder A11¹⁴⁹. Aufgrund dessen wurde die Hypothese aufgestellt, dass Amyloidfibrillen und lösliche Oligomere eine generische Struktur aufweisen^{266,270}. Des Weiteren wird angenommen, dass diese Antikörper eine generische Konformation des Polypeptid-Rückgrates erkennen, die ausschließlich bei Amyloidfibrillen oder Oligomeren und nicht bei globulär gefalteten oder denaturierten Polypeptidketten vorkommt (Abb. 1.21b)^{148,266,271}. Allerdings sind bisher die molekularen Grundlagen der konformationssensitiven Bindung an Amyloidfibrillen oder Oligomere kaum verstanden und nur unzureichend untersucht.

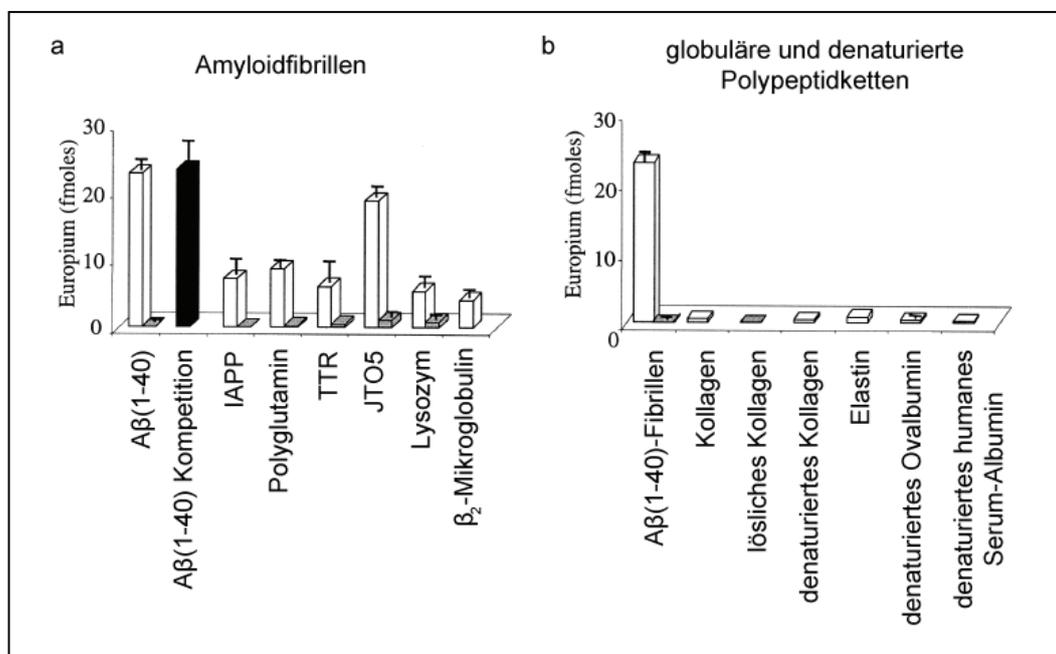


Abbildung 1.21. Die Bindungseigenschaften des fibrillenspezifischen Antikörpers WO1.

(a) Der konformationssensitive Antikörper WO1 erkennt Amyloidfibrillen (weiß) unabhängig von der Sequenz der zugrunde liegenden Polypeptidkette und kompetitiert nicht mit den monomeren Polypeptidketten (schwarz). Des Weiteren zeigt WO1 keine signifikante Interaktion mit den monomeren Polypeptidketten (grau). (b) WO1 interagiert nicht mit globulär gefalteten oder denaturierten Polypeptidketten. Bildquelle: O'Nuallain & Wetzel (2002)²⁶⁶.

Aufgrund ihrer Bindungsspezifität sind konformationssensitive Antikörper potentielle Kandidaten für die Diagnose und Therapie von Amyloidosen. Fibrillenspezifische Antikörper, wie 11-1F4 oder OC, induzierten in Maus-Modellen verschiedener Amyloidosen eine Auflösung existierender Amyloidablagerungen oder eine Stimulation von Phagozyten^{269,272,273}. Des Weiteren zeigt 11-1F4 Potential für eine Anwendung in der nicht-invasiven Diagnostik von Amyloidosen²⁷⁴. Aktuell wird dieser Antikörper in einer klinischen Versuchsreihe an Patienten mit AL-Amyloidose getestet (www.clinicaltrials.gov), wobei erste Ergebnisse als vielversprechend bewertet wurden²⁷⁵. Der oligomerspezifische Antikörper A11 inhibierte in Zellkultur die zytotoxische Wirkung von Oligomeren¹⁴⁹ und führte in Maus-Modellen verschiedener Amyloidosen zu einer Reduktion von Amyloidablagerungen^{273,276,277}. Ob diese Effekte auch im Menschen auftreten, ist jedoch bislang nicht bekannt.

1.9. Die strukturellen Besonderheiten von kameliden Antikörpern

Klassische Antikörper von Säugetieren bestehen aus jeweils zwei identischen schweren und leichten Polypeptidketten (Abb. 1.22)^{278,279}. Dadurch weisen sie divalente Bindungseigenschaften auf und besitzen ein Molekulargewicht von etwa 150 kDa^{278,279}. Die einzelnen Polypeptidketten bestehen aus einer oder mehreren konstanten (*constant*, C) und einer variablen (V) Domäne (Abb. 1.22). Die N-terminal gelegenen variablen Domänen VL und VH sind gemeinsam an der Bindung von Antigenen beteiligt. Die CH2- und CH3-Domänen der beiden schweren Ketten bilden zusammen den sogenannten Fc-Teil (Abb. 1.22). Dieser ist unter anderem an der Induktion von inflammatorischen Reaktionen beteiligt, indem er mit Komponenten des Komplementsystem oder mit Fc-Rezeptoren auf der Oberfläche von Immunzellen interagiert²⁸⁰.

Eine Ausnahme unter den Säugetieren bilden die *Camelidae* (Kamele, Dromedare, Lamas). Zwischen 25 und 50 % aller Antikörper der *Camelidae* sind sogenannte Schwere-Kette-Antikörper²⁸¹. Diesen fehlen die leichten Polypeptidketten (Abb. 1.22)²⁸². Dadurch weisen sie ein reduziertes Molekulargewicht von etwa 90 kDa auf²⁸². Des Weiteren ist die gesamte Antigenspezifität auf die variable Domäne der schweren Polypeptidkette, die sogenannte VHH-Domäne, konzentriert (Abb. 1.22).

Generell bestehen die variablen Domänen aus vier konstanten Bereichen (Rahmenregionen) und drei dazwischen liegenden hypervariablen Bereichen

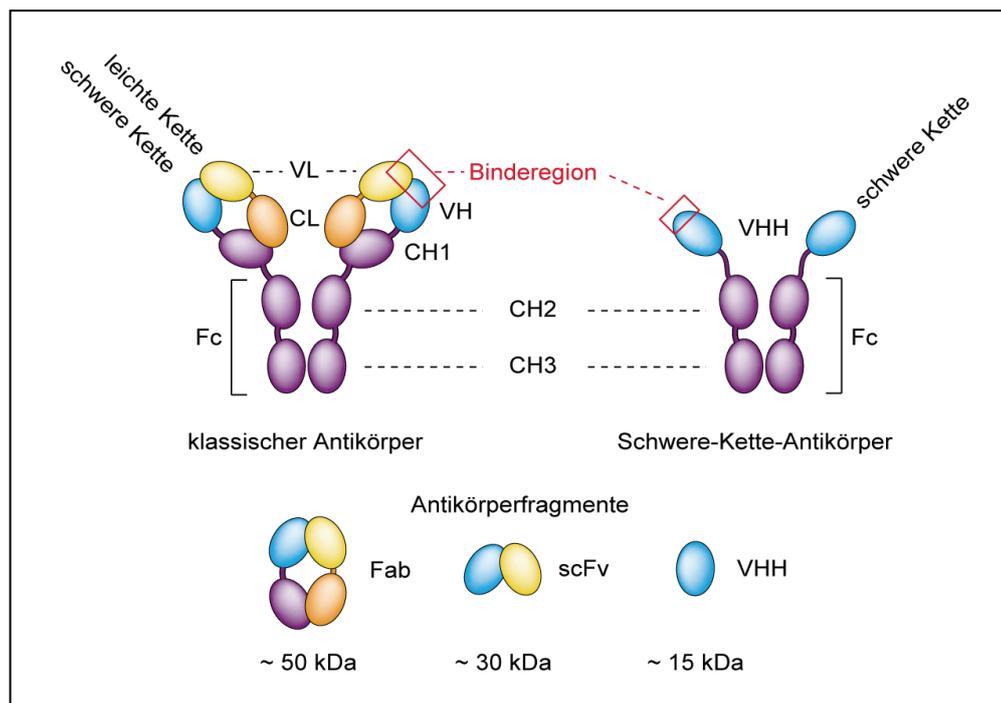


Abbildung 1.22. Vergleich konventioneller und Schwere-Kette-Antikörper.

Während konventionelle Antikörper aus zwei schweren und zwei leichten Polypeptidketten bestehen, sind Schwere-Kette-Antikörper lediglich aus zwei schweren Polypeptidketten aufgebaut. Dadurch unterscheiden sich ihre antigenbindenden Regionen signifikant voneinander. Das kleinste funktionelle Antikörperfragment von Schwere-Kette-Antikörpern ist die VHH-Domäne, welche signifikant kleiner als konventionelle Fab- oder scFV-Fragmente ist. V: variable Domäne der leichten (VL) oder schweren (VH, VHH) Polypeptidkette. C: konstante Domäne der leichten (CL) oder schweren (CH1, 2, 3) Polypeptidkette. Bildquelle: Muyldermans et al. (2001)²⁷⁸.

(*complementarity determining region*, CDR). Die CDRs sind im Wesentlichen für die Spezifität der Antigenbindung verantwortlich. In diesem Zusammenhang weisen die VHH-Domänen der Schwere-Kette-Antikörper einige strukturelle Besonderheiten im Vergleich zu konventionellen VH-Domänen auf²⁷⁸. Die CDR 1 von VHH-Domänen ist in Richtung des N-Terminus verlängert. Ebenso ist die CDR 3 von VHH-Domänen signifikant länger (durchschnittlich 17 Aminosäuren) als die der VH-Domänen (durchschnittlich 12 Aminosäuren) und hat eine größere exponierte Oberfläche²⁸³. Zwischen der CDR 1 und CDR 3 in VHH-Domänen ist oftmals eine zusätzliche Disulfidbrücke ausgebildet, die die großen Schleifen stabilisiert²⁸⁴. Diese Besonderheiten vergrößern das strukturelle Repertoire der VHH-Domänen und kompensieren dadurch das Fehlen der VL-Domäne. Darüber hinaus weisen VHH-Domänen eine erhöhte Löslichkeit auf, da in den Rahmenregionen mehr hydrophile Aminosäuren auftreten²⁸⁵. Diese Eigenschaften von VHH-Domänen sind von

entscheidendem Vorteil für rekombinante Selektions- und Expressionssysteme, sowie für genetische Manipulation²⁸⁵.

1.10. Die kamelide VHH-Domäne B10

Wie bereits erwähnt wurde, sind die molekularen Grundlagen der konformationssensitiven Bindung von Amyloidfibrillen durch Antikörper bislang nicht genau bekannt (Kap. 1.8.6.). In diesem Zusammenhang ergab sich vor dieser Arbeit die Möglichkeit, eine rekombinante VHH-Domänen-Bibliothek für den Versuch der gerichteten Selektion eines fibrillenspezifischen Bindemoleküls zu nutzen. Diese Selektion führte zur Entdeckung der kameliden VHH-Domäne B10²⁸⁶. Im Folgenden werden die Selektion, sowie die vor dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zu B10 zusammengefasst.

1.10.1. Die Selektion von B10

In Bezug auf die spezifische Selektion von Bindemolekülen stellen rekombinante Bibliotheken eine moderne und kosteneffektive Möglichkeit dar²⁸⁷. Durch genetische Manipulationen ist die selektive Anpassung an die jeweiligen Bedürfnisse möglich, und eine umfangreiche Expression erlaubt detaillierte funktionelle Analysen^{279,288}. Des Weiteren kann die Selektion von Bindemolekülen in der Gegenwart von miteinander kompetitierenden Antigenen ausgeführt werden, wodurch beispielsweise Kreuzreaktionen ausgeschlossen werden können.

Die Selektion von B10 erfolgte aus einer vollsynthetischen, rekombinanten Bibliothek kamelider VHH-Domänen (G. Habicht, M. Siegemund, U. Horn, HKI, Jena). Diese basiert auf einer Konsensus-Sequenz, die anhand publizierter Sequenzdaten von kameliden Antikörpern definiert wurde. Die Generierung der Bibliothek erfolgte durch die Synthese und Assemblierung von Oligonukleotiden mit jeweils vollständig randomisierten CDRs (Abb. 1.23a). In diesem Kontext ist die natürliche Längenvariabilität der CDR 3 von VHH-Domänen berücksichtigt worden (Abb. 1.23b). Nach der Generierung der Bibliothek wurde diese auf Leserahmenverschiebung, Vollängen-Expression und Löslichkeit der VHH-Domänen selektiert. Daraus resultierend ergibt sich eine theoretische Diversität der Bibliothek von 10^8 funktionellen VHH-Domänen.

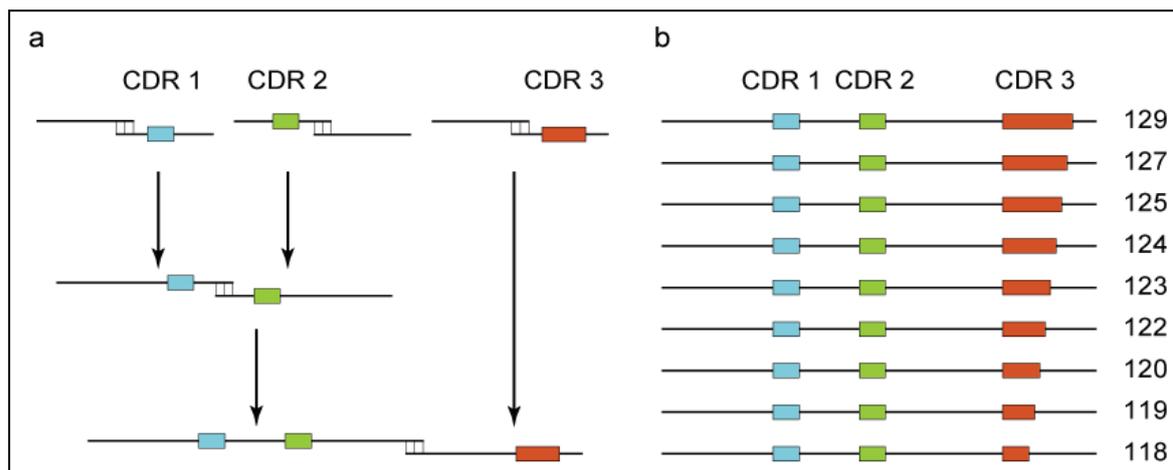


Abbildung 1.23. Synthese und Eigenschaft der kameliden VHH-Domänen-Bibliothek.

Durch Assemblierung synthetischer Oligonukleotide erfolgte die Generierung der vollsynthetischen Bibliothek aus VHH-Domänen (a). Dabei wurde die natürlich auftretende Längenvariabilität der CDR 3 von kameliden VHH-Domänen berücksichtigt (b). Die Zahlen geben die Aminosäureanzahl verschiedener VHH-Domänen an, wie sie in der Bibliothek auftreten. Bildquelle: Diplomarbeit von G. Habicht & M. Siegemund (HKI, Jena, 2002).

Die Selektion von B10 aus der VHH-Domänen-Bibliothek erfolgte durch ein sogenanntes Phagen-Display²⁸⁹. Für diese Technik ist der rekombinante Charakter der Bibliothek von Vorteil. Beim Phagen-Display werden replikationsfähige Phagen genutzt, um ein gewünschtes Protein auf deren Oberfläche zu präsentieren. Die Selektion der Phagen, die jeweils eine spezifische VHH-Domäne präsentieren, erfolgte gegen *in vitro* gebildete A β (1-40)-Fibrillen. Durch Zugabe eines zehnfachen Überschusses an disaggregiertem A β (1-40)-Peptid, welches vermutlich als Monomer vorliegt²⁹⁰, wurde sichergestellt, dass sequenzspezifische VHH-Domänen zusammen mit ungebundenen Phagen entfernt werden konnten. Nach drei Zyklen, die jeweils aus der Selektion der Phagen und deren Amplifikation bestehen, reicherten sich vier VHH-Domänen an. Diese VHH-Domänen wurden anschließend periplasmatisch in *E.coli* exprimiert, aufgereinigt und mit Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie analysiert.

1.10.2. B10 unterscheidet A β (1-40)-Fibrillen von disaggregiertem A β (1-40)-Peptid

Um die Bindungseigenschaften der selektierten VHH-Domänen zu testen, wurden biotinyliertes, disaggregiertes A β (1-40)-Peptid und partiell biotinylierte A β (1-40)-Fibrillen auf zwei von vier unterschiedlichen Flusszellen eines Streptavidin-beschichteten Biacore-Chips immobilisiert. Als Referenz für die Messungen wurden die zwei übrigen Flusszellen des Sensor-Chips genutzt. Die Untersuchung der Bindung erfolgte durch die Injektion verschiedener Konzentrationen der VHH-Domänen mit Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie. Die Analyse zeigte, dass drei der vier VHH-Domänen signifikante Interaktionen mit Streptavidin aufweisen, während die vierte VHH-Domäne, als B10 bezeichnet, spezifisch A β (1-40)-Fibrillen erkannte (Abb. 1.24a). Im Gegensatz dazu zeigte B10 keine signifikanten Interaktionen mit disaggregiertem A β (1-40)-Peptid (Abb. 1.24a). Aus den Bindungsdaten verschiedener B10-Konzentrationen an A β (1-40)-Fibrillen im Fließgleichgewicht wurde die apparente Dissoziationskonstante K_D mit einem *Steady State Affinity*-Modell ermittelt (Abb. 1.24d). Diese Analyse ergab einen K_D -Wert von 475 ± 54 nM (Abb. 1.24f). Um sowohl eine Verbesserung der monovalenten Bindungseigenschaften, als auch eine Möglichkeit der direkten Nachweisbarkeit von B10 zu erreichen, wurde gentechnisch ein Fusionsprotein generiert. Das als B10AP bezeichnete Fusionsprotein besteht aus B10 und einer alkalischen Phosphatase aus *E.coli*, welche funktionelle Homodimere bildet²⁹¹. Die Analyse von B10AP mit Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie zeigte ebenfalls eine konformationelle Spezifität für A β (1-40)-Fibrillen (Abb. 1.24b). Des Weiteren war eine signifikante Erniedrigung des K_D -Wertes auf $7,22 \pm 0,97$ nM nachweisbar, wodurch sich die divalenten Bindungseigenschaften von B10AP widerspiegeln (Abb. 1.24e, f). Damit ist die Affinität von B10AP zu A β (1-40)-Fibrillen signifikant höher als bei konventionellen Bindemolekülen von Amyloidfibrillen, wie ThT ($0,9-10$ μ M)^{78,292,293}, KR ($0,1-1,6$ μ M)^{80,294} oder SAP (~ 1 μ M)¹⁴. In einer vergleichenden Analyse von einem als 22C4²⁹⁵ bezeichneten sequenzspezifischen Anti-A β -Antikörper mit Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie konnte ein grundlegender Unterschied zu der konformationssensitiven Bindung von B10 beobachtet werden: 22C4 interagiert sowohl mit disaggregiertem A β (1-40)-Peptid, als auch mit A β (1-40)-Fibrillen (Abb. 1.24c). Diese Resultate zeigten, dass B10 und B10AP eine konformationelle Spezifität für A β (1-40)-Fibrillen aufweisen.

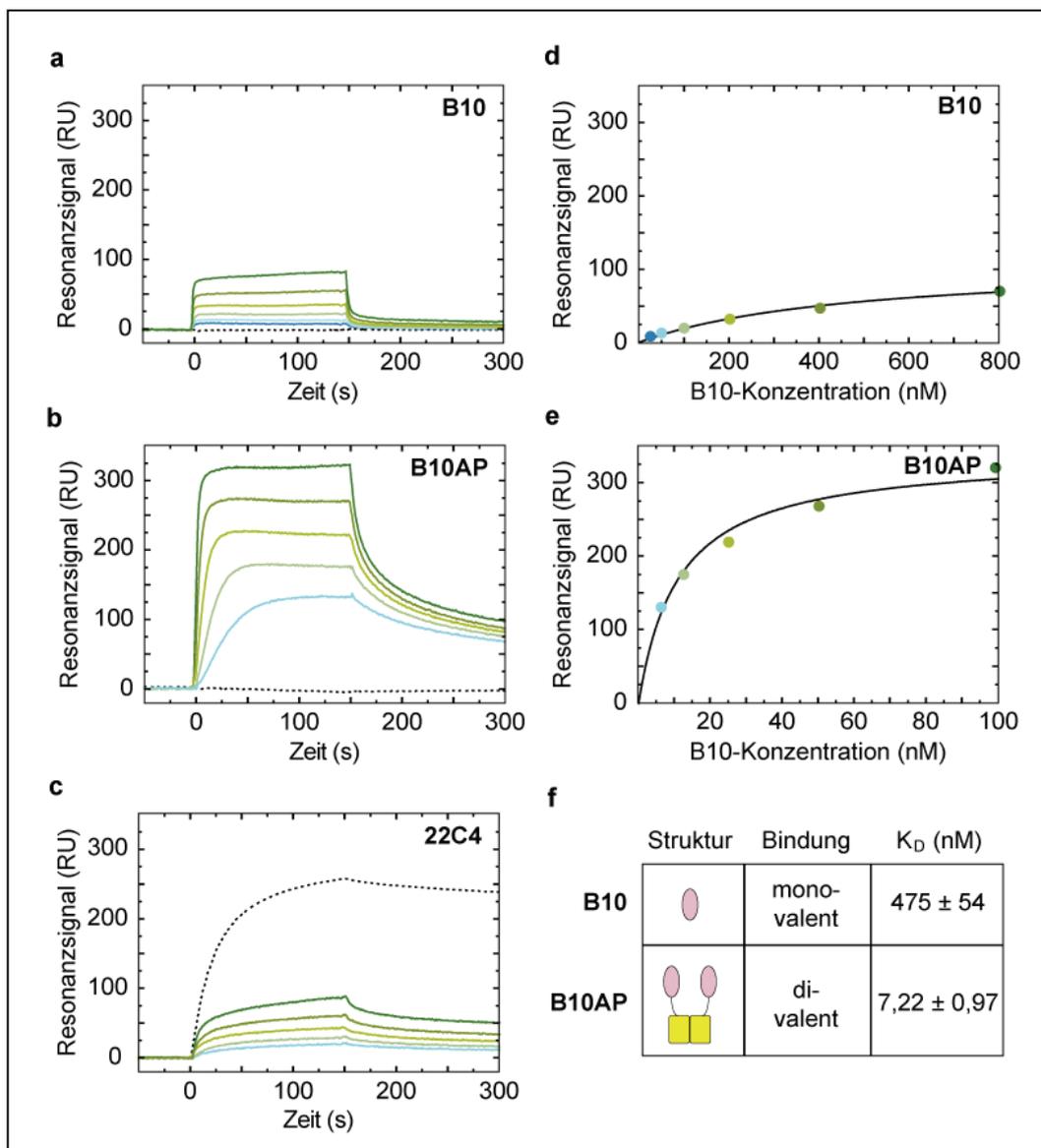


Abbildung 1.24. Untersuchung der konformationellen Spezifität von B10 mit Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie.

(a-c) Sensorgramme der Interaktion von B10 (a), B10AP (b) oder dem sequenzspezifischen Antikörper 22C4 (c) mit disaggregiertem A β (1-40)-Peptid (gepunktete Linie) oder A β (1-40)-Fibrillen (durchgezogene Linien). Die Farben kennzeichnen die Proteinkonzentration der mobilen Phase in (a) von 25 nM (dunkelblau) bis 800 nM (dunkelgrün und schwarz) und in (b, c) von 6,25 nM (hellblau) bis 100 nM (dunkelgrün und schwarz). Die gepunktete Bindungskurve in (c) wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit auf 1/10 des gemessenen Wertes skaliert. (d, e) Basierend auf den Daten der Bindung von B10 (d) oder B10AP (e) an A β (1-40)-Fibrillen im Fließgleichgewicht wurde der K_D -Wert mit einem *Steady State Affinity*-Modell ermittelt. Die Farbkodierung ist entsprechend zu (a, b). (f) Vergleich der Struktur und der Bindungseigenschaften von B10 und B10AP. Die Experimente wurden von G. Habicht und P. Hortschansky (HKI, Jena) durchgeführt. Bildquelle: Habicht & Haupt et al. (2007)²⁸⁶.

Um die Konformationssensitivität von B10 aus den Messungen mit Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie zu bestätigen, wurde B10AP mittels Immunoblot getestet. Dabei sollte die Detektion der Bindung mit Hilfe des alkalischen Phosphatase-Anteils von B10AP sichtbar gemacht werden. Diesbezüglich wurde ein Spot-Blot etabliert, mit dem die Bindung von B10AP an Liganden nachgewiesen werden kann. Dafür erfolgte eine Immobilisierung äquivalenter Mengen von disaggregiertem A β (1-40)-Peptid und A β (1-40)-Fibrillen auf einer Nitrozellulosemembran. Diese Membran wurde nachfolgend mit B10AP inkubiert und dessen Bindung durch die Verwendung eines chromogenen Substrats der alkalischen Phosphatase nachgewiesen. Die Analyse des Spot-Blots zeigte, dass B10AP an A β (1-40)-Fibrillen bindet, während mit disaggregiertem A β (1-40)-Peptid keine signifikanten Interaktionen nachweisbar waren (Abb. 1.25). Darüber hinaus konnten A β (1-40)-Fibrillen unter diesen experimentellen Bedingungen bis zu einer Nachweisgrenze von 50 ng Peptid durch B10AP detektiert werden (Abb. 1.25b). Im Zusammenhang mit den Resultaten der Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie dokumentieren diese Daten, dass B10 eine konformationelle Spezifität für A β (1-40)-Fibrillen aufweist. Außerdem zeigten die Daten, dass das Fusionsprotein B10AP für Immunoblots verwendet werden kann.

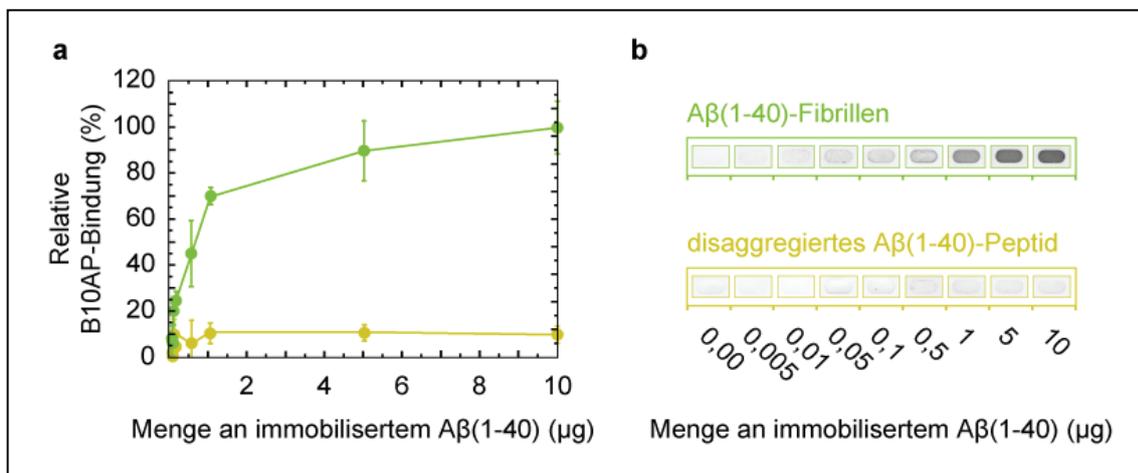


Abbildung 1.25. Untersuchung der konformationellen Spezifität von B10 mittels Spot-Blot.

Die Quantifizierung (a) einer Spot-Blot-Färbung (b) von disaggregiertem A β (1-40)-Peptid (gelb) und A β (1-40)-Fibrillen (grün) mit B10AP zeigt die Konformationssensitivität von B10. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung ($n = 3$). Dieses Experiment wurde durch G. Habicht (HKI, Jena) durchgeführt. Bildquelle: Habicht & Haupt et al. (2007)²⁸⁶.

In einem nächsten Schritt wurde getestet, ob B10 neben *in vitro* gebildeten A β (1-40)-Fibrillen auch solche erkennt, die in lebenden Systemen entstanden sind. Dazu wurden zunächst A β (1-40)-Amyloidablagerungen aus einem etablierten Zellkultursystem untersucht²⁹⁶. Die B10AP-Färbung der Amyloidablagerungen wurde anschließend mit Immunfluoreszenz ausgewertet. Die Analyse der Färbung zeigte, dass B10AP große A β (1-40)-Amyloidablagerungen erkennt (Abb. 1.26a), wohingegen kleinere A β (1-40)-Amyloidablagerungen eine eher heterogene Färbung zeigten. Des Weiteren belegte eine Immundoppelfärbung die klare Kollokalisierung von B10AP mit dem sequenzspezifischen Anti-A β (1-16)-Antikörper (Abb. 1.26a). Diese Resultate lieferten erste Hinweise, dass B10 *in vivo* gebildete A β (1-40)-Amyloidfibrillen erkennt. Als nächstes wurden *post mortem*-Hippocampus-Schnitte von Alzheimer-Erkrankten und gleichaltrigen Kontrollen ohne klinische Anzeichen der Alzheimer-Krankheit mit B10AP untersucht. Dessen Bindung wurde durch ein chromogenes Substrat der alkalischen Phosphatase sichtbar gemacht. Neben der B10AP-Färbung wurde der Nachweis von Amyloidablagerungen durch eine KR-Färbung und eine Analyse der Infiltration mit Mikroglia verifiziert. In dieser Untersuchung konnten durch die B10AP-Färbung in elf der zwölf untersuchten Alzheimer-Fälle Amyloidablagerungen mit einem Durchmesser von >10 μ m nachgewiesen werden (Abb. 1.26b). Dagegen zeigte keine der zehn gleichaltrigen Kontrollen einen solchen Effekt (Abb. 1.26c).

Zusammenfassend zeigten diese Daten, dass B10 ein konformationelles Epitop erkennt, welches in A β (1-40)-Fibrillen, nicht aber in disaggregiertem A β (1-40)-Peptid, vorhanden ist. Des Weiteren zeigte die Bindung von *in vitro* und *in vivo* gebildeten Fibrillen durch B10, dass A β (1-40)-Fibrillen unterschiedlichen Ursprungs die gleiche grundlegende Konformation und Oberflächenstruktur aufweisen.

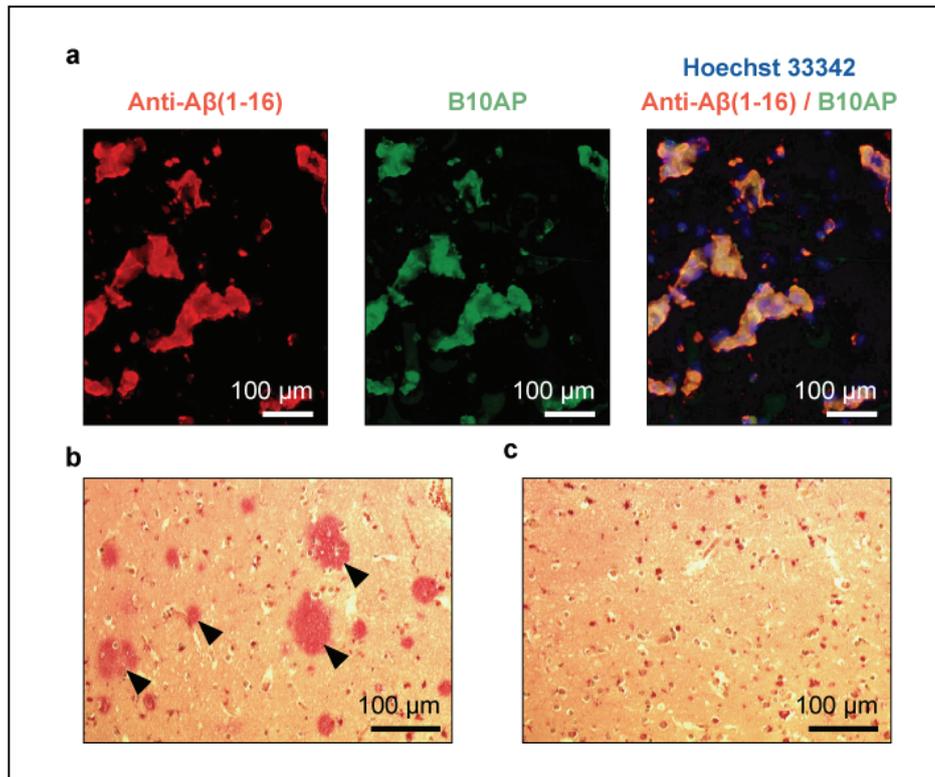


Abbildung 1.26. B10AP erkennt *in vivo* gebildete A β (1-40)-Fibrillen.

(a) In Zellkultur gebildete Amyloidablagerungen²⁹⁶ wurden mit einem Anti-A β (1-16)-Antikörper, B10AP und Hoechst 33342 (Darstellung von Zellnuklei) gefärbt. (b, c) B10AP-Färbung von Hippocampus-Schnitten eines diagnostizierten Alzheimer-Falls (b) oder einer gleichaltrigen Kontrolle ohne klinische Anzeichen der Alzheimer-Krankheit (c). Der Nachweis von B10AP erfolgte mit *permanent red chromogen*. Im Falle des Alzheimer-Gehirns (b) ist eine deutliche Anfärbung von Amyloidablagerungen (>10 μ m, Pfeile) zu erkennen. Die Experimente wurden von (a) R. P. Friedrich (FLI, Jena) und (b, c) G. Gellermann (FLI, Jena) durchgeführt. Bildquelle: Habicht & Haupt et al. (2007)²⁸⁶.

1.10.3. Das B10-Epitop ist gleichmäßig und seitlich der A β (1-40)-Fibrille lokalisiert

Um die Verteilung des B10-Epitops an der A β (1-40)-Fibrille zu untersuchen wurden A β (1-40)-Fibrillen mit B10AP dekoriert und durch eine sogenannte Ceriumphosphat-Färbung sichtbar gemacht. Diese Methode nutzt die alkalische Phosphatase von B10AP, um die Bildung von Ceriumphosphat zu katalysieren. Ceriumphosphat ist ein elektronendichtes Präzipitat, das sich in der Nähe der katalytischen Umsetzung akkumuliert und im Transmissions-EM (TEM) sichtbar ist²⁹⁷. Die Auswertung mit TEM zeigte eine einheitliche Verteilung der Färbung entlang der A β (1-40)-Fibrillen ohne auffällige ungefärbte Bereiche (Abb. 1.27b). Dagegen zeigten die Proben ohne B10AP keine Ceriumphosphat-Färbung (Abb. 1.27a). Daraus lässt sich schließen, dass das B10-Epitop gleichmäßig und seitlich der Fibrille verteilt ist und nicht ausschließlich an den

Enden der Fibrille. Eine nähere Analyse der verwendeten Probe mit TEM zeigte eine für A β (1-40)-Fibrillen typische morphologische Heterogenität^{124,125} (Abb. 1.27c). Die meisten Fibrillen weisen eine gebänderte und helikal gewundene Struktur auf, unterscheiden sich allerdings in ihrer Dicke und der Länge der helikalen Windung. Aufgrund der gleichmäßigen Färbung aller Fibrillen im TEM lässt sich vermuten, dass B10AP unabhängig von der strukturellen Heterogenität der untersuchten A β (1-40)-Fibrillen bindet. Außerdem lassen diese Daten schließen, dass B10 ein Epitop erkennt, welches einheitlich und seitlich der A β (1-40)-Fibrille lokalisiert ist.

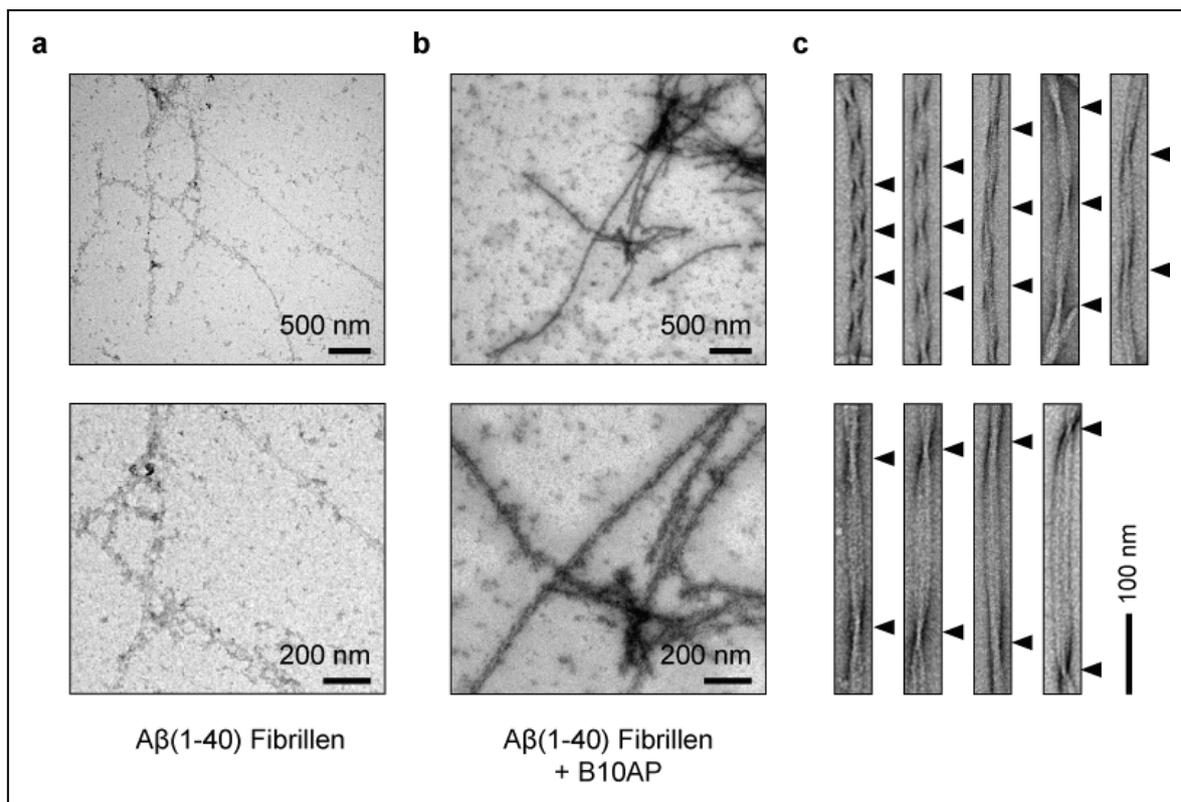


Abbildung 1.27. Lokalisierung des B10-Epitops entlang der A β (1-40)-Fibrille.

(a, b) Ceriumphosphat-Färbung von A β (1-40)-Fibrillen in (a) Ab- und (b) Anwesenheit von B10AP. Ceriumphosphat ist als tiefschwarzes Präzipitat erkennbar. (c) TEM-Analysen der in (a) und (b) verwendeten A β (1-40)-Fibrillen zeigten die strukturelle Heterogenität der Probe. Die Fibrillen unterscheiden sich deutlich in der Dicke und der Länge der helikalen Windung (schwarze Dreiecke). Das Experiment wurde von C. Sachse (FLI, Jena) durchgeführt. Bildquelle: Habicht & Haupt et al. (2007)²⁸⁶.

1.10.4. B10 bindet A β (1-40)-Fibrillen mit einer molaren Stöchiometrie von 1:10

Um herauszufinden, in welchem molaren Verhältnis B10 an A β (1-40)-Fibrillen bindet, wurden die mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie gewonnenen Bindungsdaten von B10 an A β (1-40)-Fibrillen unter Verwendung der Gleichung 1.1 analysiert. Unter Einbeziehung weiterer Parameter, wie dem Bindungssignal der immobilisierten A β (1-40)-Fibrillen auf der Chipoberfläche und dem Molekulargewicht von B10 und dem A β (1-40)-Peptid, ergab sich eine molare Stöchiometrie der Bindung von etwa 1:10 (B10:A β).

$$s = \frac{R_{\max} \times MW_L}{R_L \times MW_A} \quad \text{(Gleichung 1.1)}$$

R_{\max} : Bindungssignal bei Absättigung der fibrillenbedeckten Sensor-Oberfläche mit B10 (**115 RU**)

MW_A : Molekulargewicht von B10 (**15725,4 Da**)

MW_L : Molekulargewicht vom A β (1-40)-Peptid (**4229,8 Da**)

R_L : Bindungssignal der immobilisierten A β (1-40)-Fibrillen (**345,7 RU**)

s: molare Stöchiometrie B10:A β (1-40)

Diese Daten weichen etwas vom theoretischen Wert ab, der aus den molekularen Dimensionen der B10-Kristallstruktur (3LN9.PDB²⁹⁸, gelöst von I. Morgado & C. Parthier, Martin-Luther-Universität (MLU), Halle (Saale)) und derzeitigen Daten von A β (1-40)-Fibrillen berechnet wurde. Die drei CDRs von B10 überspannen eine Distanz von etwa 30 Å (Abb. 1.27). Des Weiteren ergibt die Röntgenbeugung von A β (1-40)-Fibrillen einen Abstand von etwa 4,7 Å zwischen A β (1-40)-Peptiden innerhalb eines β -Faltblattes⁴⁶. Demzufolge deckt theoretisch ein Molekül B10 etwa sieben Moleküle A β (1-40) entlang der Fibrillenlängsachse ab (Abb. 1.27). Der Unterschied zwischen dem theoretischen Wert und dem experimentellen Wert kann durch eine gegenseitige sterische Behinderung der B10-Moleküle erklärt werden, wodurch diese möglicherweise entlang der Fibrille weniger dicht gepackt sind, und somit nicht alle Bindungsstellen abgedeckt werden.

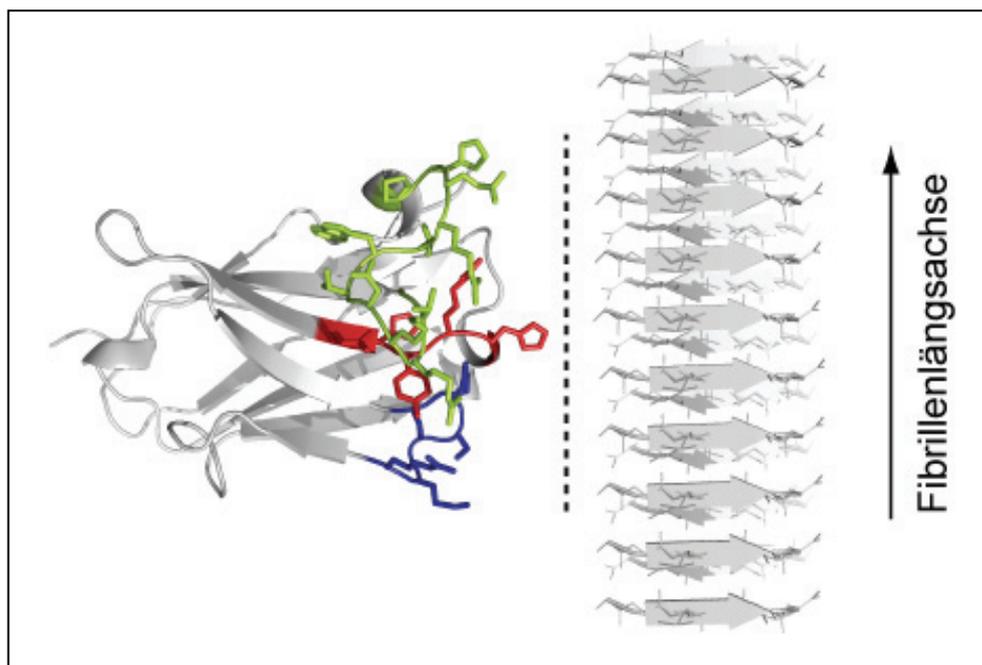


Abbildung 1.27. Vergleich der molekularen Dimensionen von B10 und einer gekreuzten β -Faltblatt-Struktur.

Die B10-Kristallstruktur (links) zeigt die räumliche Verteilung der CDR 1 (rot), CDR 2 (blau) und CDR 3 (grün). Im Vergleich mit der Struktur eines Mikrokristalls überdeckt ein Molekül B10 etwa sieben Moleküle entlang der gekreuzten β -Faltblatt-Struktur. Die gestrichelte Linie verdeutlicht die Dimension der CDRs entlang der Fibrillenlängsachse. PDB-Zugangscode: B10 (3LN9.PDB)²⁹⁸, A β (37-42)-Mikrokristall (PDB:2ONV)⁴⁴.

1.11. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Verschiedene Antikörper mit konformationssensitiven Bindungseigenschaften für Amyloidfibrillen wurden in der Vergangenheit generiert. Einige dieser Antikörper erkennen ein Epitop, welches vermutlich generisch für Amyloidfibrillen ist. Die Analyse eines konformationellen Epitops mit klassischen strukturaufklärenden Methoden wird durch einige spezifische Eigenschaften von Amyloidfibrillen beträchtlich erschwert. Daher sind die molekularen und strukturellen Grundlagen der konformationssensitiven Bindung von Amyloidfibrillen durch Antikörper bislang kaum untersucht und verstanden.

Das Ziel dieser Arbeit war die funktionelle und strukturelle Untersuchung der konformationssensitiven Bindung von Amyloidfibrillen durch Antikörper am Beispiel der VHH-Domäne B10. Unter Verwendung einer Vielzahl an komplementären biochemischen und biophysikalischen Techniken wurden Beiträge zu folgenden Komplexen geliefert:

1. Die Bindungsspezifität von B10

- Interagiert B10 neben A β (1-40)-Amyloidfibrillen auch mit anderen A β (1-40)-Konformeren?
- Bindet B10 neben Amyloidfibrillen alternative konformationelle Zustände von Polypeptidketten?

2. Die Charakterisierung des B10-Epitops

- Auf welchen molekularen Interaktionen beruht die konformationssensitive Bindung von B10 an Amyloidfibrillen?
- Ist das B10-Epitop eine generische Eigenschaft von Amyloidfibrillen?
- Welche strukturellen Eigenschaften weist das von B10 erkannte Epitop auf?

3. Die Untersuchung der funktionellen Aktivität von B10

- Welche Auswirkung hat B10 auf die Bildung und Stabilität von Amyloidfibrillen?

In diesem Kontext lieferten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit neue Einsichten für das Verständnis der konformationssensitiven Bindung von Amyloidfibrillen durch Antikörper.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien und Geräte

2.1.1. Chemikalien

Nicht aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen Roth, Sigma-Aldrich und Fluka bezogen. Als Reinheitsgrad wurde mindestens *pro analysis* verwendet. Soweit nicht anders angegeben wurden alle Lösungen mit Reinstwasser (Milli-Q) angesetzt und gegebenenfalls autoklaviert oder sterilfiltriert.

Tabelle 2.1. Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller
Agar-Agar, Kobe I	Roth
Agarose	Invitrogen
30 % Ammoniumhydroxidlösung	Roth
Ammoniumchlorid	Roth
Ammoniummolybdat Tetrahydrat	Fluka
Ampicillin Natriumsalz	Roth
Borsäure	Fluka
Calciumchlorid Dihydrat	Fluka
Chloramphenicol	Roth
Chloroform	Merck
Coomassie Brilliantblau R-250	Fluka
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Di-Natriumhydrogenphosphat Dodecahydrat	Roth
Dithiotreitol (DTT)	Roth
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Roth
Eisen(III)-chlorid	Fluka
Eisen(III)-citrat Monohydrat	Fluka
Formvar Resin 15/95	Ted Pella
α -Glukose Monohydrat	Roth
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Guanidinhydrochlorid	Roth
Harnstoff	Roth
Hefeextrakt	Roth

2. Material und Methoden

Heparin (~ 18 kDa, Herstellerangabe)	Sigma-Aldrich
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Roth
1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFIP)	Fluka
Hexaminkobalt(III)-chlorid	Applichem
Imidazol	Roth
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth
Kaliumacetat	Roth
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Kobalt(III)-chlorid Hexahydrat	Riedel de Haën
Kongorot	Sigma-Aldrich
Kupfer(II)-chlorid Dihydrat	Fluka
α -Laktose Monohydrat	Roth
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Roth
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Roth
Mangan(II)-chlorid Tetrahydrat	Fluka
β -Mercaptoethanol	Roth
2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Roth
Natriumazid	Fluka
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	Roth
Natriumhydroxid	Roth
Natriummolybdat Dihydrat	Riedel de Haën
Natriumselenit	Fluka
Nickel(II)-chlorid Hexahydrat	Fluka
Nickel(II)-sulfat Hexahydrat	Roth
N-Z-Amin (Casein Hydrolysat)	Fluka
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth
Polygalakturonsäure	Fluka
Ponceau S	Sigma-Aldrich
Rubidiumchlorid	Roth
Thiamin-Hydrochlorid	Roth
Thioflavin T	Sigma-Aldrich
Trichloressigsäure	Roth
Trifluoressigsäure	Roth
Tris	Roth
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trypton/Pepton (aus Casein)	Roth
Tween 20	Roth
Uranylacetat Dihydrat	Plano
Zinkacetat Dihydrat	Roth
Zinksulfat Monohydrat	Fluka

2.1.2. Kits, Standards und gebrauchsfertige Lösungen

Tabelle 2.2. Kits, Standards und gebrauchsfertige Lösungen.

Produkt	Hersteller
Quickchange XL II Site directed mutagenesis-Kit	Stratagene
Midiprep-Kit Nucleobond PC 100	Macherey-Nagel
Miniprep-Kit Genejet Plasmid	Fermentas
Miniprep-Kit Qiaprep Spin	Qiagen
Gelextraktions-Kit QiaEx II	Qiagen
NBT/BCIP-1-Step-Substrat	Pierce
Roti Histokitt	Roth
Coomassie Plus (Bradford) Protein Assay-Reagenz	Pierce
Polyacrylamid-Gelelektrophorese-System NuPAGE	Invitrogen
NuPAGE Fertiggel Novex 4-12 % Bis-Tris (12, 15, 17 Taschen)	
NuPAGE MES Laufpuffer (20x)	
NuPAGE Probenpuffer (4x)	
NuPAGE Antioxidans	
NuPAGE Proben Reduktionsmittel	
DNS-Längenstandard GeneRuler (1 kb)	Fermentas
Protein-Standard Mark12	Invitrogen

2.1.3. Chromatographiemedien

Tabelle 2.3. Chromatographiemedien und ihre Anwendung.

Material	Methode	Hersteller
Ni-NTA Superflow	Ni-Chelat-Chromatographie	Qiagen
Ni-Sepharose High Performance	Ni-Chelat-Chromatographie	GE Healthcare
Q-Sepharose Fast Flow	Ionenaustausch-Chromatographie	GE Healthcare
Mono-Q	Ionenaustausch-Chromatographie	GE Healthcare
Heparin-Sepharose CL-6B	Affinitäts-Chromatographie	GE Healthcare
Source 15RPC	Umkehrphase-Chromatographie	GE Healthcare
Jupiter C4	Umkehrphase-Chromatographie	Phenomenex
Superdex 75	Gelfiltration	GE Healthcare

2.1.4. Sonstige Materialien

Tabelle 2.4. Sonstige verwendete Materialien.

Produkt	Hersteller
Dialyseschlauch Spectra/Por Float-A-Lyzer G2	Spectrum Laboratories
Filterpapier (Zellulose, 3 mm Dicke)	Whatman
Küvette, Halb-Mikro (Absorption, Acryl) (Schichtdicke: 10mm)	Sarstedt
Küvette, Halb-Mikro (Absorption, Quarzglas) (Schichtdicke: 10 mm)	Hellma
Küvette, Mikro (Fluoreszenz, Quarzglas) (Schichtdicke: 5 x 5 mm)	Hellma
Küvette, Ultra-Mikro (Absorption, Quarzglas) (Schichtdicke: 10 mm)	Hellma
Küvette, Ultra-Mikro (Fluoreszenz, Quarzglas) (Schichtdicke: 10 x 2 mm)	Hellma
Mikrotiterplatte, 96 Loch, Flachboden, schwarz, Polystyrol	Greiner Bio-One
Netzchen (Kupfer, 200 Stege / Zoll)	Agar Scientific
Nitrozellulose-Membran Hybond ECL (0,45 µm)	GE Healthcare
Nitrozellulose -Membran Protran (0,1 µm; 0,45 µm)	Whatman
Objektträger SuperFrost	Roth
Pinzette Dumont N5AC	Electron Microscopy Sciences
Rotilabo Abdeckfolie	Roth
Spritzenvorsatzfilter Minisart (0,2 µm)	Sartorius
Sterilfilter MicronSep (0,22 µm; 1,2 µm)	Roth
Sterilfilter Magna-Nylon (0,45 µm)	Roth
Zentrifugationsfilter Amicon (Ultra-4, Ultra-15) (Größenausschluss 3 kDa)	Millipore
Zentrifugationsfilter Nanosep (Größenausschluss 10 kDa)	Pall

2.1.5. Geräte

Im Folgenden werden nur Geräte aufgeführt, die nicht der Standardlaborausstattung entsprechen.

Tabelle 2.5. Verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller
Begasungseinheit Multiplex Ventil Depot	Liebisch Labortechnik
Chromatographie-System ÄKTAexplorer 100	GE Healthcare
Chromatographie-System ÄKTApurifier 100	GE Healthcare
Chromatographie-System ÄKTAfplc	GE Healthcare
Drehanoden-Röntgeneratore FR591	Enraf Nonius
CCD Flächenzähler MAR300	MAR Research
Fermenter Sixfors (0,4 l)	Infors
Fermenter Biostat ED (15 l)	Braun Biotech International
Fluoreszenz-Spektrometer LS 55	PerkinElmer
Fluoreszenz-Spektrometer RF-5301PC	Shimadzu
FT-IR-Spektrometer Tensor 27	Bruker Optik
Gefriertrocknungsanlage	Christ
Geltrockner GelAir Drying System	Biorad
Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie-System	Shimadzu
Inkubationsschüttler Multitron HAT	Infors
Isothermales Titrationskalorimeter VP-ITC	MicroCal LCC
Kathodenzerstäuber Desk V TSC mit Kohlegarnverdampfer	Denton Vacuum
Laboport Vakuumpumpe N86KN.18	KNF Neuberger
Mastercycler personal	Eppendorf
Mikroskop Eclipse 80i mit Polarisator	Nikon
Digitalkamera DS2Mv	Nikon
Mikrotiterplatten-Lesegerät POLARstar galaxy	BMG Labtech
Mikrotiterplatten-Lesegerät FLUOstar Omega	BMG Labtech
NMR-Spektrometer DRX 500 MHz	Bruker
Tripelresonanzkopf TXI mit Gradientenkanal	Bruker
Reinstwasser-Anlage Milli-Q Advantage A10	Millipore
Scanner Epson perfection V700 Photo	Epson
Sicherheitswerkbank HS12	Heraeus Instruments
Spot-Blot-Apparatur Minifold I System	Whatman
Standzentrifuge RC5B Plus	Sorvall
Thermomixer compact	Eppendorf
Tischkühlzentrifuge 5415 R	Eppendorf

Tischkühlzentrifuge Rotina 38R	Hettich
Ausschwingrotor 1760, 1798	Hettich
Festwinkelrotor SLA 3000	Sorvall
Festwinkelrotor SS 34	Sorvall
Transmissions-Elektronenmikroskop EM 900	Carl Zeiss SMT
Ultraschallsystem Vibracell 72442	Bioblock Scientific
Ultrazentrifuge Optima TLX	Beckman Coulter
Festwinkelrotor TLA 100	Beckman Coulter
Festwinkelrotor TLA 120.1	Beckman Coulter
UV-Kabinett HP-UVIS (254 nm, 366 nm)	Desaga
UV-Transilluminator Darkroom Evo III	Raytest Isotopenmessgeräte
UV-VIS-Spektrometer Helios Gamma	Thermo Electron
UV-VIS-Spektrometer Cary 1E	Varian
UV-VIS-Spektrometer HP8453	Agilent Technologies
Vakuumkonzentrator 5301	Eppendorf
Wärmeschrank APT.line BD (E2)	Binder
Zellhomogenisator Emulsiflex-C50	Avestin
Zellhomogenisator NS1001-L2K	GEA Niro Soavi
Zellhomogenisator TS Series Benchtop	Constant Systems

2.1.6. Programme

Tabelle 2.6. Verwendete Programme.

Name	Hersteller
NIS Elements F	Laboratory Imaging
TotalLab 100	Nonlinear Dynamics
iTEM	ResAlta Research Technologies
Pymol	DeLano Scientific
Origin 7	OriginLab

2.1.7. Plasmide

Soweit nicht anders angegeben kodieren die Plasmide für eine Ampicillin-Resistenz.

Tabelle 2.7. Übersicht der genutzten Plasmide.

Plasmid	Verwendung	Herkunft
pMalc2TEVhA β (1-40) ¹⁵⁵	- Expression A β (1-40)-Peptid - ortsgerichtete Mutagenese	M. Fändrich (MPF, Halle (Saale))
p41B10mut_6H ²⁸⁶	- Expression der VHH-Domäne B10 - ortsgerichtete Mutagenese	U. Horn (HKI, Jena)
ptetB10mutpA_6H ²⁸⁶	- Expression des Fusionsproteins B10AP - Resistenz: Chloramphenicol	U. Horn (HKI, Jena)
pET-20b(+)	- Insertion von Pektat-Lyase Pel-15-Varianten über eine NdeI- und HindIII-Schnittstelle - Expression der Pel-15-Varianten	Novagen
pMA-Pel15-Wildtyp	- Vektor für ein synthetisches Pektat-Lyase-Gen	Geneart
pMA-Pel15 L6+	- Vektor für ein synthetisches Pektat-Lyase-Gen	Geneart
pMA-Pel15 M6+	- Vektor für ein synthetisches Pektat-Lyase-Gen	Geneart
pMA-Pel15 R6+	- Vektor für ein synthetisches Pektat-Lyase-Gen	Geneart
pMA-Pel15 M4+	- Vektor für ein synthetisches Pektat-Lyase-Gen	Geneart

2.1.8. Primer

Alle Primer wurden von MWG Biotech synthetisiert und in HPSF-Qualität geliefert.

Tabelle 2.8. Übersicht der genutzten Primer für die ortsspezifische Mutagenese.

Bezeichnung des Proteins	Primer-Sequenz
Plasmid: pMalc2TEVhAβ(1-40)	
A β (1-40) D1G	5´-AACCTGTACTTCCAG GGC GCTGAATTC CGTCAC-3´ 5´-GTGACGGAATTCAGC GCC CTGGAAGTACAGGTT-3´
A β (1-40) E3A	5´-TACTTCCAGGACGCT GCA TTCCGTCACGACTCT-3´ 5´-AGAGTCGTGACGGAAT TGC AGCGTCCTGGAAGTA-3´
A β (1-40) D7A	5´-GCTGAATTC CGTCAC GCC TCTGGTTACGAAGTT-3´ 5´-AACTTCGTAACCAGAG GGC GTGACGGAATTCAGC-3´
A β (1-40) E11A	5´-CACGACTCTGGTTAC GCA GTTTCATCACCAGAAA-3´ 5´-TTTCTGGTGATGAAC TGC GTAACCAGAGTCGTG-3´

Aβ(1-40) E22A 5´-CTGGTATTCTTCGCAG**CA**GACGTGGGTTCTAAC-3´
 5´-GTTAGAACCCACGTCT**TGCT**GCGAAGAATACCAG-3´

Aβ(1-40) D23A 5´-GTATTCTTTCGCAGAA**GCC**GTGGGTTCTAACAAA-3´
 5´-TTTGTTAGAACCCAC**GGC**TTCTGCGAAGAATAC-3´

Plasmid: p41B10mut_6H

B10_6H H35A 5´-GGCTATACCTTTAGC**GCT**CGGTATCATCGTTGG-3´
 5´-CCAACGATGATACCG**AGC**GCTAAAGGTATAGCC-3´

B10_6H R36A 5´-TATACCTTTAGCCAT**GCG**TATCATCGTTGGTTTCGC-3´
 5´-GCGAAACCAACGATGATA**CGC**ATGGCTAAAGGTATA-3´

B10_6H Y37A 5´-ACCTTTAGCCATCGG**GCT**CATCGTTGGTTTCGCCAG-3´
 5´-CTGGCGAAACCAACGAT**AGC**CCGATGGCTAAAGGT-3´

B10_6H H38A 5´-TTTAGCCATCGGTAT**GCT**CGTTGGTTTCGCCAG-3´
 5´-CTGGCGAAACCAAC**AGC**ATAACCGATGGCTAAA-3´

B10_6H R39A 5´-AGCCATCGGTATCAT**GCT**TGGTTTCGCCAGGCGCCG-3´
 5´-CGGCGCCTGGCGAAACCA**AGC**ATGATAACCGATGGCT-3´

B10_6H S56A 5´-ATTGTGGCGGTGATT**GCT**CAGAGTGGGATGCGG-3´
 5´-CCGCATCCCCTCT**AGC**AATCACCGCCACAAT-3´

B10_6H Q57A 5´-GTGGCGGTGATTTCT**GCG**AGTGGGATGCGGACC-3´
 5´-GGTCCGCATCCCCT**CGC**AGAAATCACCGCCAC-3´

B10_6H S58A 5´-GCGGTGATTTCTCAG**GCT**GGGATGCGGACCTAT-3´
 5´-ATAGGTCCGCATCCC**AGC**CTGAGAAATCACCGC-3´

B10_6H G59A 5´-CGGTGATTTCTCAGAGT**GCG**ATGCGGACCTATTATGCGG-3´
 5´-CCGCATAATAGGTCCGCAT**CGC**ACTCTGAGAAATCACCG-3´

B10_6H M60A 5´-ATTTCTCAGAGTGGG**GCG**CGGACCTATTATGCGG-3´
 5´-CCGCATAATAGGTCC**CGC**CCCCACTCTGAGAAAT-3´

B10_6H R61A 5´-TCTCAGAGTGGGAT**GCG**ACCTATTATGCGGATAGCGTG-3´
 5´-CACGCTATCCGCATAATAGGT**CGC**CATCCCCTCTGAGA-3´

B10_6H R105A 5´-TGCGCGGCGGGTAC**GCG**AAGAATGTTTGGACG-3´
 5´-CGTCCAAACATTCTT**CGC**CGTACCCGCCGCGCA-3´

B10_6H K106A 5´-GCGGCGGGTACGAG**GCG**AATGTTTGGACGCGT-3´
 5´-ACGCGTCCAAACATT**CGC**CCTCGTACCCGCCGC-3´

B10_6H N107A 5´-GCGGGTACGAGGA**GCT**GTTTGGACGCGTCAG-3´
 5´-CTGACGCGTCCAAAC**AGC**CTTCCCTCGTACCCGC-3´

B10_6H V108A 5´-GGTACGAGGAAGAAT**GCT**TGGACGCGTCAGCATCC-3´
 5´-GGATGCTGACGCGTCCA**AGC**ATTCTTCCCTCGTACC-3´

B10_6H W109A 5´-GGTACGAGGAAGAATGTT**GCG**ACGCGTCAGCATCCT-3´
 5´-AGGATGCTGACGCGT**CGC**AAACATTCTTCCCTCGTACC-3´

B10_6H T110A 5´-GGTACGAGGAAGAATGTTTGG**GCG**CGTCAGCATCCTTTTG-3´
 5´-CAAAAGGATGCTGAC**CGC**CCAAACATTCTTCCCTCGTACC-3´

B10_6H R111A	5´-TGTTTGGACG GCT CAGCATCCTTTTGATTATTGGGGCCAG-3´ 5´-CTGGCCCCAATAATCAAAAAGGATGCTG AGCC GTCCAAACA-3´
B10_6H Q112A	5´-AGAATGTTTGGACGCGT GCG CATGCTTTTGATTATTGGGG-3´ 5´-CCCCAATAATCAAAAAGGATG GCGC ACGCGTCCAAACATTCT-3´
B10_6H H113A	5´-GTTTGGACGCGTCAG GCT CCTTTTGATTATTGGGGCC-3´ 5´-GGCCCCAATAATCAAAAAG GAGC CTGACGCGTCCAAAC-3´
B10_6H P114A	5´-GTTTGGACGCGTCAG GCT CCTTTTGATTATTGGGGCC-3´ 5´-GGCCCCAATAATCAAAAAG GAGC CTGACGCGTCCAAAC-3´

2.1.9. Restriktionsenzyme

Tabelle 2.9. Liste der verwendeten Restriktionsenzyme.

Enzym	Erkennungssequenz	Schnittstelle	Hersteller
HindIII	5´-AAGCTT-3´	5´-A····AGCTT-3´	Fermentas
	3´-TTCGAA-5´	3´-TTCGA····A-5´	
NdeI	5´-CATATG-3´	5´-CA····TATG-3´	Fermentas
	3´-GTATAC-5´	3´-GTAT····AC-5´	

2.1.10. *E. coli*-Stämme

Tabelle 2.10. Zusammenfassung der verwendeten *E. coli*-Stämme.

Stamm	Genotyp	Herkunft
XL10-Gold	Tet ^r , $\Delta(mcrA)183$, $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$, <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac Hte</i> , [F´, <i>proAB</i> , <i>lacIqZΔM15</i> , Tn10 (Tet ^r) Amy Cam ^r]	Stratagene
RV308	($\Delta(lac)\chi74$ <i>galPO-308::IS2 rpsL</i>)	Maurer et al. ²⁹⁹
BL21(DE3)pLysS	F ⁻ , <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdSB(rB⁻ mB⁻)</i> , <i>gal λ(DE3)</i> , [<i>pLysS Camr</i>]	Novagen

2.1.11. Kulturmedien

Soweit nicht anders angegeben wurden alle Lösungen autoklaviert. Die Antibiotika wurden in folgenden Endkonzentrationen eingesetzt: Ampicillin (100 µg/ml), Chloramphenicol (30 µg/ml).

Tabelle 2.11. Verwendete Kulturmedien und ihre Bestandteile.

Medium	Zusammensetzung
LB-Medium (1 l)	10 g Trypton/Pepton, 5 g Hefeextrakt; 10 g NaCl, pH 7,0
LB-Agar (1 l)	1,5 g Agar (in LB-Medium)
ZYP-5052 (1 l)	928 ml ZY, 1 ml 1000 x Spurenelemente, 1 ml MgSO ₄ (1M), 20ml 50 x 5052, 50 ml 20 x NPS
ZY (1 l)	10 g N-Z-Amin, 5 g Hefeextrakt
20 x NPS (1 l)	66 g (NH ₄) ₂ SO ₄ , 136 g KH ₂ PO ₄ , 142 g Na ₂ HPO ₄
50 x 5052 (1 l)	250 g Glycerin, 25 g Glukose x H ₂ O, 100 g α-Laktose x H ₂ O
1000 x Spurenelemente (100 ml, nicht autoklaviert)	50 ml FeCl ₃ x 6 H ₂ O (0,1 M; in 0,1 M HCl; nicht autoklaviert), 2 ml CaCl ₂ (1 M), 1 ml MnCl ₂ x 4 H ₂ O (1 M); 1 ml ZnSO ₄ x 7 H ₂ O (1 M); 1 ml CoCl ₂ x 6 H ₂ O (0,2 M); 2 ml CuCl ₂ x 4 H ₂ O (0,1 M); 1 ml NiCl ₂ (0,2 M); 2 ml Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O (0,1 M); 2 ml Na ₂ SeO ₃ (0,1 M); 2 ml H ₃ BO ₃ (0,1 M)
M 9-Medium (1 l)	8,6 g Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O; 0,5 g NaCl; 3 g KH ₂ PO ₄ ; 1 g NH ₄ Cl; 10 ml Eisen(III)-citrat (0,023 M); 0,1 ml EDTA (0,2 M); 0,1 ml CoCl ₂ x 6 H ₂ O (0,1 M); 0,1 ml MnCl ₂ x 4 H ₂ O (0,75 M); 0,1 ml CuCl ₂ x 4 H ₂ O (0,1 M); 0,1 ml H ₃ BO ₃ (0,5 M); 0,1 ml Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O (0,1 M); 2 ml Zn(CH ₃ COO) ₂ x 2 H ₂ O (0,018 M) Zugabe nach dem Autoklavieren: 5 ml MgSO ₄ (1 M), 20 ml Glukose (2,5 M)
SOB-Medium (1 l)	20 g Trypton/Pepton; 5 g Hefeextrakt; 0,6 g NaCl, 10 ml MgSO ₄ (1 M)
SOC-Medium (101 ml)	100 ml SOB Medium, 1 ml Glukose (2 M)
Ampicillin (10 ml)	500 mg
Chloramphenicol (10 ml)	300 mg (in 100 % unvergälltem Ethanol)

2.1.12. Native globulär gefaltete Polypeptidketten

Die Klassifizierung der Polypeptidketten basiert auf der SCOP-Datenbank³⁰⁰. Die Angaben zu der Sekundär- und β -Faltblatt-Struktur entstammen der PDBsum-Datenbank (basierend auf dem Promotif-Algorithmus)³⁰¹.

Tabelle 2.12. Eigenschaften der getesteten globulär gefalteten Polypeptidketten.

Protein	Charakteristika	
Maltose-Bindeprotein PDB: 1JW4.PDB ³⁰²	Organismus: <i>E. coli</i> Klasse: α/β -Protein β -Faltblatt-Struktur: gemischt und antiparallel	Quelle: rekombinant ¹⁵⁵ Sekundärstruktur: 42 % α /16 % β
Lysozym PDB: 4LZT.PDB ³⁰³	Organismus: Huhn Klasse: $\alpha+\beta$ -Protein β -Faltblatt-Struktur: antiparallel	Quelle: Boehringer Mannheim Sekundärstruktur: 31 % α /6 % β
Trypsin PDB: 1S81.PDB ³⁰⁴	Organismus: Schwein Klasse: vollständiges β -Protein β -Faltblatt-Struktur: antiparallel	Quelle: Roth Sekundärstruktur: 8 % α /32 % β
Insulin PDB: 1MSO.PDB ³⁰⁵	Organismus: Mensch Klasse: kleine Proteine β -Faltblatt-Struktur: antiparallel	Quelle: Sigma-Aldrich Sekundärstruktur: 55 % α /6 % β
TTR PDB: 1RLB.PDB ⁹³	Organismus: Mensch Klasse: vollständiges β -Protein β -Faltblatt-Struktur: gemischt und antiparallel	Quelle: rekombinant* Sekundärstruktur: 5 % α /53 % β
Pektat-Lyase Pel-15 PDB: 1EE6.PDB ¹¹⁹	Organismus: <i>Bacillus sp.</i> (KSM P15) Klasse: vollständiges β -Protein β -Faltblatt-Struktur: parallel, rechtsgewundene β -Helix	Quelle: rekombinant [#] Sekundärstruktur: 0 % α /57 % β
P22 Tailspike-Protein (109-666) PDB: 1TSP.PDB ¹¹⁸	Organismus: Bakteriophage P22 Klasse: vollständiges β -Protein β -Faltblatt-Struktur: antiparallel und parallel, rechtsgewundene β -Helix	Quelle: rekombinant [#] Sekundärstruktur: 5 % α /41 % β

* Zur Verfügung gestellt von J. Kelly (Scripps Research Institut, LaJolla). # Zur Verfügung gestellt von R. Seckler (Universität Potsdam).

2.1.13. Intrinsisch ungefaltete Polypeptidketten

Die intrinsisch ungefalteten Polypeptidketten wurden frisch aufgelöst und unmittelbar verwendet.

Tabelle 2.13. Liste der getesteten intrinsisch ungefalteten Polypeptide.

Protein	Herkunft
Poly-L-Lysin (Molekulargewicht: 70-130 kDa)	Organismus: synthetisch Quelle: chemische Synthese (Sigma-Aldrich)
disaggregiertes Aβ(1-40)	Organismus: Mensch Quelle: rekombinant ¹⁵⁵
G-Helix, Myoglobin(101-118)	Organismus: Pottwal Quelle: chemische Synthese (Jerini AG)
Glucagon	Organismus: Mensch Quelle: Vega
hSAA(2-21), Isoform 1.1	Organismus: Mensch Quelle: chemische Synthese (Jerini AG)
hSAA, Isoform 1.1	Organismus: Mensch Quelle: rekombinant ³⁰⁶
mSAA, Isoform 1.1	Organismus : Maus Quelle: rekombinant ²⁷

2.1.14. *Ex vivo*-Amyloidfibrillen

Tabelle 2.14. Übersicht der verwendeten *ex vivo*-Amyloidfibrillen.

Name	Amyloid L
Sequenz	variable Fragmente der leichten Kette von Immunglobulinen ³⁰⁷
Organismus	Mensch
Quelle	diagnostizierte AL-Amyloidose (C. Röcken; Charité Berlin)
Extraktion	nach Skinner ³⁰⁸

2.1.15. *In vitro*-Amyloidfibrillen

Eine detaillierte Auflistung der verwendeten *in vitro*-Amyloidfibrillen und ihrer Eigenschaften befindet sich im Anhang (Kap. 8.2).

2.1.16. Antikörper

Tabelle 2.15. Verwendete Antikörper.

Name	Antigen	Wirt	Einsatz	Herkunft
Anti-RAGE-C1-Domäne ³⁰⁹	RAGE (158-179)	Kaninchen	1:2500	G. Fritz (Universitätsklinikum Freiburg)
Anti-Kaninchen-AP	Kaninchen IgG	Ziege	1:15000	Sigma

2.1.17. Weitere Proteine

Tabelle 2.16. Liste weiterer Proteine.

Name	Herkunft
Proteinase K	Fermentas
RAGE(23-243) (= VC1-Domäne) ²⁵¹	G. Fritz (Universitätsklinikum Freiburg)
Tabak-Ätzvirus-Protease	rekombinante Expression (hauseigen) ¹⁵⁵

2.2. Methoden

2.2.1. Proteinexpression in *E.coli*

Soweit nicht anders angegeben erfolgte die Fermentation aller Proteine nach folgendem Ablauf. Die Proteine wurden im *E.coli*-Stamm RV308 durch IPTG-Induktion, die bei einer $OD_{550} = 0,5$ erfolgte, exprimiert³¹⁰. Die Fermentation wurde bei 26 °C, in M 9-Medium, im Hochzelldichte-Fermenter durchgeführt. Vier Stunden nach der Induktion wurden die Zellen zentrifugiert (20 min, 15.000 g, 4 °C) und bei -80 °C eingefroren.

2.2.2. Aufreinigung von A β (1-40)

Das Plasmid pMalC2TevhA β (1-40) kodiert für die zytoplasmatische Expression eines Fusionsproteins aus Maltose-Bindeprotein und humanem A β (1-40). Bestandteil des Fusionsproteins ist ein C-terminal vom Maltose-Bindeprotein gelegener His-tag, gefolgt von einer Spaltstelle für eine Tabak-Ätzvirus-Protease (Abb. 2.1).

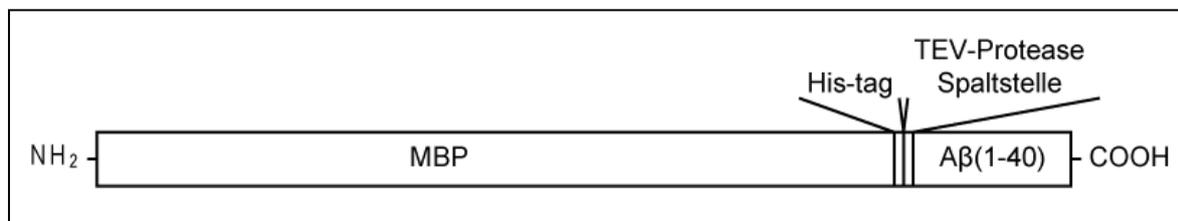


Abbildung 2.1. Organisation des exprimierten A β (1-40) Fusionsproteins.

MBP: Maltose-Bindeprotein, TEV-Protease: Tabak-Ätzvirus-Protease.

Zur Aufreinigung von A β (1-40) wurden 30 g gefrorenes Zellpellet in 300 ml eiskaltem Aufschlusspuffer (Tab. 2.17) gelöst, zweimalig in einem Zellhomogenisator (Druck: 1.000 bar) aufgeschlossen und anschließend zentrifugiert (90 min, 35.800 g, 4 °C). Der Überstand wurde durch eine 1,2 μ m Membran in 500 ml eiskaltem Aufschlusspuffer filtriert. Die Isolierung des Fusionsproteins erfolgte über eine Ni-NTA-Säule (Elution über Stufengradient: 0 % \rightarrow 50 % Elutionspuffer) und anschließend über eine Q-Sepharose-Säule (Elution über linearen Gradient). Die Proteinkonzentration nach der Q-Sepharose-Säule wurde mit Coomassie Plus (Bradford) Protein Assay-Reagenz gemessen. Durch

Zugabe von 4 mg Tabak-Ätzvirus-Protease je 1 mg Protein, wurde das Fusionsprotein über Nacht bei Raumtemperatur gespalten. Das Spaltprodukt Maltose-Bindeprotein mit His-tag wurde über eine Ni-NTA-Säule entfernt und das A β (1-40)-Peptid anschließend mit einer Source RPC15-Säule (Elution über linearen Gradient) gereinigt. Die A β (1-40)-Fraktionen wurden mit SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert und mit Matrix-unterstützter Laser Desorption/Ionisation-Massenspektrometrie auf korrektes Molekulargewicht geprüft. Das gereinigte Protein wurde lyophilisiert und bei -80 °C gelagert.

Tabelle 2.17. Verwendete Puffer für die Aufreinigung von A β (1-40).

Puffer	Zusammensetzung
Aufschlusspuffer	20 mM Tris (pH 8), 150 mM NaCl, 1 mM PMSF
Ni-NTA	
Startpuffer	20 mM Tris (pH 8), 150 mM NaCl
Elutionspuffer	20 mM Tris (pH 8), 150 mM NaCl, 200 mM Imidazol
Q-Sepharose	
Startpuffer	20 mM Tris (pH 8), 15 mM NaCl
Elutionspuffer	20 mM Tris (pH 8), 2 M NaCl
Source RPC15	
Startlösung	0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure
Elutionslösung	0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure (in Acetonitril)

2.2.3. Aufreinigung von B10

Das Plasmid p41B10mut_6H kodiert für die periplasmatische Expression der kameliden VHH-Domäne B10 mit C-terminalem His-tag (Abb. 2.2). B10 wurde nach oben beschriebenen Schema in *E.coli* RV 308³¹⁰ oder *E.coli* BL21DE3(pLys) exprimiert.

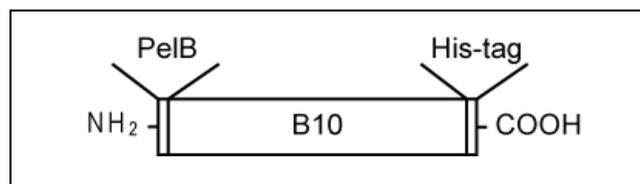


Abbildung 2.2. Organisation der exprimierten VHH-Domäne B10.

PelB: Periplasma Exportsequenz, B10: VHH-Domäne B10.

Zur Aufreinigung von B10 wurden 60 g gefrorenes Zellpellet in 1 l Aufschlusspuffer (Tab. 2.18) gelöst. Nach zweimaliger Passage durch einen Zellhomogenisator (Druck: 1.000 bar) erfolgte die Zugabe von 0,5 % Tween 20 mit anschließender Zentrifugation (90 min, 35.800 g, 4 °C). Der Überstand wurde anschließend durch eine 1,2 µm Membran filtriert. Die Reinigung von B10 erfolgte mit einer Ni-NTA-Säule (Elution über Stufengradient: 5 % → 100 % Elutionspuffer) und einer Source RPC15-Säule (Elution über linearen Gradient). Die Reinheit der B10-Fractionen wurde durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Peakintegration nach analytischer Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie mit einer Jupiter C4-Säule analysiert. Die Überprüfung des korrekten Molekulargewichtes erfolgte mit Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie. Das gereinigte Protein wurde lyophilisiert und bei -80 °C gelagert.

Tabelle 2.18. Verwendete Puffer für die Aufreinigung von B10.

Puffer	Zusammensetzung
Aufschlusspuffer	50 mM Natriumphosphat (pH 8), 2 M NaCl, 50 mM Imidazol
Ni-NTA	
Startpuffer	50 mM Natriumphosphat (pH 8), 300 mM NaCl, 50 mM Imidazol
Elutionspuffer	50 mM Natriumphosphat (pH 8), 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol
Source RPC15	
Startlösung	0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure
Elutionslösung	0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure (in Acetonitril)

2.2.4. Expression und Aufreinigung von B10AP

Das Plasmid ptetB10mutpA_6H kodiert für die periplasmatische Expression des Fusionsproteins B10AP, bestehend aus der kameliden VHH-Domäne B10 und einer alkalischen Phosphatase aus *E.coli* mit einem C-terminalen His-tag (Abb. 2.3).

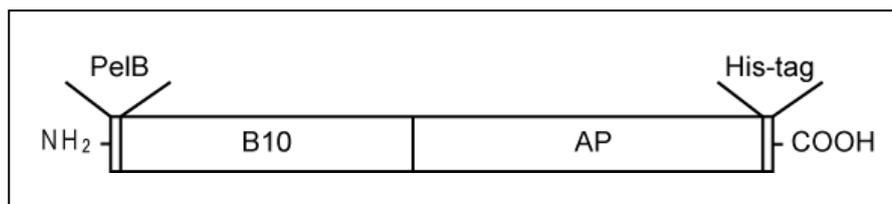


Abbildung 2.3. Organisation des exprimierten Fusionsproteins B10AP.

PelB: Periplasma-Exportsequenz, B10: VHH-Domäne B10, AP: alkalische Phosphatase.

Zur Aufreinigung von B10AP wurden 60 g gefrorenes Zellpellet in 1 l eiskaltem Aufschlusspuffer (Tab. 2.19) gelöst. Nach zweimaliger Passage durch einen Zellhomogenisator (Druck: 1.000 bar) erfolgte die Zugabe von 0,5 % Tween 20 mit anschließender Zentrifugation (90 min, 35.800 g, 4 °C). Der Überstand wurde durch eine 1,2 µm Membran filtriert. Die Reinigung von B10AP erfolgte über eine Ni-NTA-Säule (Elution über Stufengradient: 5 % → 100 % Elutionspuffer), gefolgt von einer Q-Sepharose-Säule (Elution über linearen Gradient). Die B10AP-Fractionen wurden durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation-Massenspektrometrie analysiert. Das gereinigte Protein wurde im Q-Sepharose-Elutionspuffer bei -80 °C gelagert.

Tabelle 2.19. Verwendete Puffer für die Aufreinigung von B10AP.

Puffer	Zusammensetzung
Aufschlusspuffer	50 mM Natriumphosphat (pH 8), 2 M NaCl, 50 mM Imidazol
Ni-NTA	
Startpuffer	50 mM Natriumphosphat (pH 8), 300 mM NaCl, 50 mM Imidazol
Elutionspuffer	50 mM Natriumphosphat (pH 8), 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol
Q-Sepharose Fast Flow	
Startpuffer	20 mM Tris (pH 8,2), 15 mM NaCl
Elutionspuffer	20 mM Tris (pH 8,2), 2 M NaCl

2.2.5. Expression und Aufreinigung von Pel-15 und Varianten

Synthetische Gene, die für die periplasmatische Expression von verschiedenen Varianten der Pektat-Lyase Pel-15 (aus *Bacillus sp.*) mit C-terminalem His-tag kodieren (Abb. 2.5), wurden von Geneart bezogen. Diese Gene wurden jeweils über NdeI- und HindIII-Restriktionsschnittstellen in den Expressionsvektor pET-20b(+) kloniert. Die Expression der Proteine erfolgte in *E.coli* BL21DE3(pLys). In einen 2 l Schüttelkolben wurden 400 ml ZYP-5052-Autoinduktionsmedium gefüllt und mit einer über Nacht-Kultur, welche in LB-Medium gewachsen ist, 1:40 (v/v) beimpft. Nach 24 h Inkubation bei 150 Upm erfolgte die Zentrifugation der Zellen (20 min, 15.000 g, 4 °C). Das Pellet wurde bei -80 °C eingefroren.

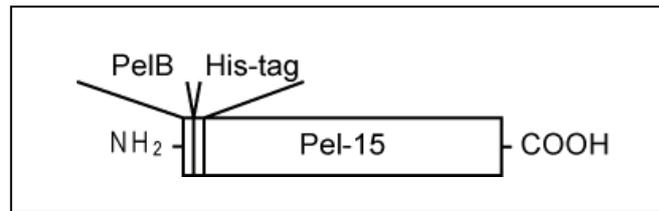


Abbildung 2.5. Organisation der exprimierten Pektat-Lyase Pel-15.

PelB: Periplasma-Exportsequenz, Pel-15: Pektat-Lyase Pel-15.

Die periplasmatische Expression ergab nur beim Pel-15-Wildtyp eine lösliche Fraktion. Die Varianten Pel15 L6+, Pel-15 M6+, Pel-15 R6+, Pel-15 M4+ mussten über die Isolierung von Einschlusskörpern und durch Rückfaltung der Proteine gewonnen werden.

Die Aufreinigung des Pel-15-Wildtyps erfolgte unter nativen Bedingungen. Zu diesem Zweck wurden 10 g gefrorenes Pellet in 70 ml eiskaltem Aufschlusspuffer (Tab. 2.20) gelöst. Nach zweimaliger Passage durch einen Zellhomogenisator (Druck: 2.500 bar) wurde die Suspension zentrifugiert (20 min, 47.807 g, 4 °C) und durch eine 1,2 µm Membran filtriert. Die Aufreinigung von Pel-15-Wildtyps erfolgte über eine Ni-Sepharose-Säule (Elution über Stufengradient: 5 % → 100 % Elutionspuffer) und eine Mono-Q-Säule (Elution über linearen Gradient).

Tabelle 2.20. Puffer für die Aufreinigung des Pel-15-Wildtyps.

Puffer	Zusammensetzung
Aufschlusspuffer	50 mM Natriumphosphat (pH 8), 2 M NaCl, 50 mM Imidazol
Ni-Sepharose	
Startpuffer	50 mM Natriumphosphat (pH 8), 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol
Elutionspuffer	50 mM Natriumphosphat (pH 8), 300 mM NaCl, 500 mM Imidazol
Mono-Q	
Startpuffer	50 mM MES (pH 6,8)
Elutionspuffer	50 mM MES (pH 6,8), 2 M NaCl

Zur Isolation der Einschlusskörper der Pel-15-Varianten wurden 10 g gefrorenes Pellet in 50 ml eiskaltem Resuspensionspuffer (Tab. 2.21) gelöst, zweimal in einem Zellhomogenisator (Druck: 2.500 bar) aufgeschlossen und zentrifugiert (20 min, 47.807 g, 4 °C). Die Isolation der Einschlusskörper erfolgte durch zweimaliges Resuspendieren des Pellets in eiskaltem Isolationspuffer (Tab. 2.21) und anschließender Zentrifugation (20 min, 47.807 g, 4 °C).

Tabelle 2.21. Puffer für die Isolation von Pel-15-Einschlusskörpern.

Puffer	Zusammensetzung
Resuspensionspuffer	50 mM Natriumphosphat (pH 8)
Isolationspuffer	50 mM Natriumphosphat (pH 8); 0,5 M NaCl; 2 M Harnstoff; 2 % (v/v) Triton-X 100

Die Pel-15-Proteine aus den Einschlusskörpern wurden primär durch eine Ni-Sepharose-Säule gereinigt, wobei gleichzeitig die Rückfaltung der Proteine auf der Säule stattfand. Zu diesem Zweck wurde das Einschlusskörper-Pellet unter Rühren für 1 h bei Raumtemperatur in Ni-Sepharose-Startpuffer (Tab. 2.22) resuspendiert. Nach der Zentrifugation der Lösung (20 min, 47.807 g, 4 °C) erfolgte die Filtration des Überstandes durch eine 1,2 µm Membran. Das Filtrat wurde auf eine Ni-Sepharose-Säule aufgetragen. Die Rückfaltung des Proteins erfolgte durch Austausch des Startpuffers gegen Rückfaltungspuffer (linearer Gradient). Die Elution wurde mit einem Stufengradienten (5 % → 100 % Elutionspuffer) durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Reinigung über eine Q-Sepharose-Säule (Elution über linearen Gradient) und eine Superdex 75-Gelfiltrationssäule.

Tabelle 2.22. Puffer für die Aufreinigung der Pel-15-Varianten aus Einschlusskörpern.

Puffer	Zusammensetzung
Ni-Sepharose	
Startpuffer	50 mM Natriumphosphat (pH 8), 0,5 M NaCl, 10 mM Imidazol, 8 M Harnstoff, 1 mM β-Mercaptoethanol
Rückfaltungspuffer	50 mM Natriumphosphat (pH 8), 0,5 M NaCl, 10 mM Imidazol, 1 mM β-Mercaptoethanol
Elutionspuffer	50 mM Natriumphosphat (pH 8), 0,5 M NaCl, 250 mM Imidazol
Q-Sepharose	
Startpuffer	20 mM Tris (pH 8,2)
Elutionspuffer	20 mM Tris (pH 8,2), 2 M NaCl
Superdex 75	
Laufpuffer	50 mM Natriumphosphat (pH 7,4), 150 mM NaCl

Die Überprüfung der Reinheit aller Varianten erfolgte mit SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und die Analyse des korrekten Molekulargewichtes mit Elektrospray-

Ionisation-Massenspektrometrie. Alle Pel-15-Varianten wurden gegen 20 mM Natriumphosphat (pH 7,4) dialysiert und bei 4 °C gelagert. Die strukturelle Integrität der Proteine wurde mit NMR-Spektroskopie und einem Pel-15-Aktivitätstest analysiert.

2.2.6. Eindimensionale Protonen-NMR-Spektroskopie

Zur eindimensionalen Protonen ($1D-^1H$)-NMR-Spektroskopie wurden die Pel-15-Proteine mit Zentrifugationsfiltern auf 220 μ M konzentriert. Die Messung der Proben erfolgte unter Wasservorsättigung bei Raumtemperatur in 5 mm NMR Röhren und wurde durch C. Lücke (MPF, Halle (Saale)) an einem DRX 500 MHz-NMR-Spektrometer (Bruker) vorgenommen. Die Kalibrierung erfolgte gegen 4,4-Dimethyl-4-Silapentan-1-sulfonsäure. Die Spektren stellen die Summe aus 512 Scans dar.

2.2.7. Pel-15-Aktivitätstest

Pektat-Lyasen spalten die α -1,4 glykosidische Bindung in Polygalakturonsäure und erzeugen damit 4,5 ungesättigte Oligogalakturonsäure (Abb. 2.6). Dieses ungesättigte Produkt ist UV-aktiv und eignet sich dadurch zur Ermittlung der Enzymaktivität der Pektat-Lyase. Die Messlösung enthielt folgende Bestandteile: 910 μ l Wasser, 150 μ l 0,5 M Glycin/NaOH-Puffer (pH 10,5), 90 μ l 10 mM $CaCl_2$, 300 μ l 1 % (w/v) PGA (pH 6,5), 50 μ l Wasser mit 0,12 μ g Protein. Die Lösung wurde für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 1,5 ml 50 mM HCl abgebrochen und die Absorption bei einer Wellenlänge von 235 nm gemessen.

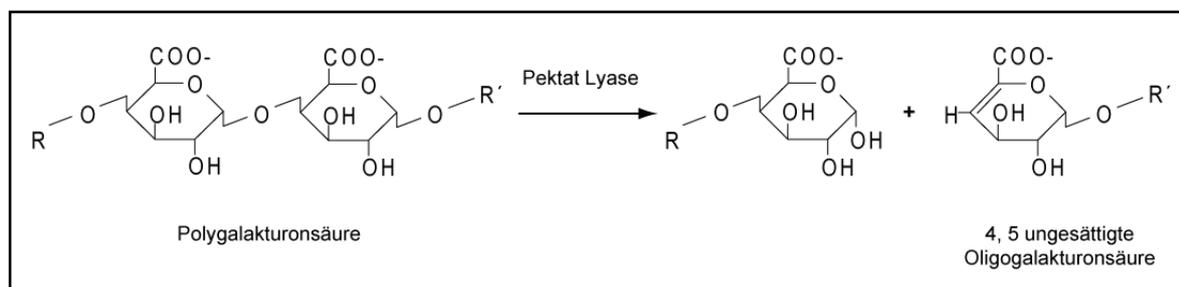


Abbildung 2.6. Enzymatische Spaltung von Polygalakturonsäure durch Pektat-Lyasen.

Polygalakturonsäure wird durch Pektat-Lyasen an der 1,4-glykosidischen Bindung gespalten und es entsteht neben der übrigen Polygalakturonsäure das ungesättigte Spaltprodukt 4,5 Oligogalakturonsäure. Bildquelle: Herron et al. (2000)³¹¹.

2.2.8. Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *E.coli*-Zellen

Die Herstellung chemisch kompetenter Zellen erfolgte nach Hanahan³¹². Zu diesem Zweck wurden 5 ml SOB-Medium mit einer *E.coli*-Kolonie beimpft und über Nacht bei 30 °C in LB-Medium bei 220 Upm geschüttelt. Von der über Nacht-Kultur wurden 100 µl in 50 ml SOB-Medium überführt und bis zu einer OD₅₅₀ = 0,5 geschüttelt. Die Kultur wurde danach für 15 min auf Eis gestellt. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis:

1. zentrifugieren (10 min, 2.500 g, 4 °C),
2. Pellet resuspendieren in 20 ml eiskaltem TFB-Puffer (Tab. 2.23),
3. zentrifugieren (10 min, 2.500 g, 4 °C),
4. Pellet resuspendieren in 4 ml eiskaltem TFB-Puffer,
5. Zugabe von 140 µl DMSO, 5 min inkubieren,
6. Zugabe von 140 µl DTT-Lösung (Tab. 2.23), 10 min inkubieren,
7. Zugabe von 140 µl DMSO, 5 min inkubieren.

Abschließend wurden 40 µl dieser Lösung zu je 10 µl 50 % Glycerol gegeben, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Zur Transformation wurden maximal 200 ng DNA zu 50 µl chemisch kompetenten Zellen gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach 2 min Hitzeschock (42 °C) und nachfolgender zweiminütiger Inkubation auf Eis, wurden 500 µl SOC-Medium zugegeben. Nach 1 h bei 37 °C und 220 Upm schütteln wurde die Lösung auf LB-Agar ausplattiert.

Tabelle 2.23. Lösungen für die Herstellung chemisch kompetenter *E.coli*-Zellen.

Lösung	Zusammensetzung
TFB (1 l)	10 ml MES (1 M, pH 6,3 mit KOH eingestellt); 12 g RbCl, 8,9 g MnCl ₂ x 4H ₂ O; 1,5 g CaCl ₂ x 2 H ₂ O; 0,8 g Hexaminkobalt(III)-chlorid, pH 6,2 (mit KOH eingestellt)
DTT-Lösung	2,25 M DTT, 40 mM Kaliumacetat, pH 6,0 (mit KOH eingestellt)

2.2.9. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde in einem NuPAGE MES-Puffersystem mit NuPAGE 4-12 % Bis-Tris-Gelen bei 180 mV durchgeführt. Die Denaturierung der Proben erfolgte durch Zugabe von NuPAGE-Probenpuffer und

anschließender Inkubation bei 70 °C für 20 min. Reduzierende Bedingungen wurden durch Zugabe von NuPAGE-Antioxidans zum Laufpuffer und NuPAGE-Reduktionsmittel zur Probe erzeugt. Die Gele wurden für 1 h in einer Coomassie-Lösung gefärbt (Tab. 2.24) und anschließend für 1 h mit der Entfärbelösung (Tab. 2.24) inkubiert. Die Trocknung der Gele erfolgte mit einem Gelrockner (Biorad).

Tabelle 2.24. Lösungen für die Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelelen.

Lösung	Zusammensetzung
Coomassie-Färbelösung (1 l)	2,5 g Coomassie Brilliantblau R-250, 10 % (v/v) Essigsäure 30 % (v/v) unvergällter Ethanol
Entfärbelösung	10 % (v/v) Essigsäure, 20 % (v/v) unvergällter Ethanol

2.2.10. Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Standardmäßig wurde die Proteinkonzentration von Lösungen, nach Gill und Hippe³¹³, mit dem Lambert-Beer-Gesetz (Gl. 2.1) bestimmt. Die Absorptionsmessungen erfolgten bei 280 nm in 6 M Guanidinhydrochlorid, 20 mM Natriumphosphat (pH 6,5). Die Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten des Proteins (ϵ_M) erfolgte anhand der Anzahl an Tyrosin, Tryptophan und Cystein, sowie deren molaren Extinktionskoeffizienten³¹³ (Gl. 2.2).

$$E = \epsilon_M \times c \times d \quad \text{(Gleichung 2.1)}$$

E: Extinktion
 ϵ_M : molarer Extinktionskoeffizient ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$)
 c: Konzentration (M)
 d: Pfadlänge der Küvette (cm)

$$\epsilon_M = a \times 1280 + b \times 5690 + c \times 120 \quad \text{(Gleichung 2.2)}$$

ϵ_M : molarer Extinktionskoeffizient ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$)
 a: Anzahl an Tyrosin
 b: Anzahl an Tryptophan
 c: Anzahl an Cystein

Alternativ zu Gill und Hippe³¹³ erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration mit Coomassie Plus (Bradford) Protein Assay-Reagenz. Dazu wurden 500 μ l Proteinlösung mit 500 μ l Coomassie-Lösung gemischt, 5 min in Dunkelheit inkubiert und die Absorption

bei 595 nm gemessen. Anhand einer Standard-Eichkurve mit bovinem Serumalbumin wurde die Konzentration der Proteinlösung abgelesen.

2.2.11. Disaggregation von A β (1-40)

Zur Disaggregation wurde 1 mg A β (1-40)-Peptid in 2 ml HFIP-Trifluoressigsäure-Gemisch (1:1) gelöst. Nach einer Inkubation (4 h, Raumtemperatur) erfolgte das vollständige Abdampfen der Lösung durch Begasung mit Stickstoff. Der entstandene Proteinfilm wurde in 1 ml 0,15 % Ammoniumhydroxid gelöst und lyophilisiert. Das disaggregierte Peptid wurde bei -80 °C gelagert.

2.2.12. Präparation löslicher A β (1-40)-Oligomere

Zur Herstellung von löslichen Oligomeren wurden 2,5 mg A β (1-40)-Peptid in 100 % HFIP gelöst. Nach einer Inkubation (15 min, Raumtemperatur) wurde die Lösung 1:10 mit Wasser verdünnt. Nach einer weiteren Inkubation (15 min, Raumtemperatur) erfolgte eine Zentrifugation (15 min, 14.000 g, Raumtemperatur). Der Überstand nach der Zentrifugation wurde als Fraktion der löslichen Oligomere verwendet.

2.2.13. Präparation von *in vitro*-Amyloidfibrillen

Eine detaillierte Beschreibung der Präparation der verschiedenen getesteten Amyloidfibrillen und ihrer Charakterisierung findet sich im Anhang (Kap. 8.2).

Zur Präparation von Amyloidfibrillen der A β (1-40)-Mutanten wurden 230 μ M der jeweiligen Mutante in 50 mM Natriumphosphat (pH 7,4), 10 mM Natriumazid gelöst. Die Proteinkonzentration wurde mit Coomassie Plus (Bradford) Protein Assay-Reagenz bestimmt. Die Fibrillenbildung erfolgte durch Inkubation für 2 Wochen bei 37 °C und wurde mit TEM, ThT und FTIR analysiert.

2.2.14. Ortsspezifische Mutagenese

Alle B10- beziehungsweise A β (1-40)-Mutanten wurden ausgehend von den Plasmiden p41B10mut6H beziehungsweise pMalc2TEVhA β (1-40) durch ortsspezifische Mutagenese mit dem QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis-Kit hergestellt. Alle verwendeten Primer können Tabelle 2.8 entnommen werden. Die erfolgreiche Mutagenese wurde per DNS-Sequenzierung überprüft. Die mutierten Plasmide wurden in chemisch kompetente *E. coli* RV 308 oder BL21DE3(pLys) transformiert. Die Reinigung aller A β (1-40)-Varianten wurde identisch nach der Strategie der A β (1-40)-Aufreinigung durchgeführt. Die Reinheit der A β (1-40)-Mutanten wurde mit SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese überprüft. Die Reinigung aller B10-Varianten erfolgte nach der Strategie der B10-Aufreinigung. Die Reinheit der B10-Varianten wurde mit SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und einer analytischen Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie analysiert. Die K_D -Werte der Bindung der Mutanten an A β (1-40)-Amyloidfibrillen wurden mit Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie ermittelt.

2.2.15. Disaggregation von A β (1-40)-Fibrillen durch B10

Zur Disaggregation von A β (1-40) Fibrillen durch B10AP wurden 50 μ M A β (1-40)-Fibrillen mit und ohne 5 μ M B10AP für 1 Woche in 50 mM HEPES (pH 7,4), 50 mM NaCl, 1 mM Na-Azid bei 37 °C inkubiert. Die Analyse der Proben erfolgte mit einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Ultrazentrifugation (20 min, 51.3000 g, 20 °C) und TEM.

2.2.16. Degradation mit Proteinase K

Um die Protease-Stabilität verschiedener A β (1-40)-Konformere zu testen, wurden 50 μ M disaggregiertes A β (1-40)-Peptid, B10AP-stabilisierte A β (1-40)-Protofibrillen oder A β (1-40) Fibrillen mit 62,5 ng/ml Proteinase K in 50 mM Hepes (pH 7,4), 50 mM NaCl bei 37 °C inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurden 80 μ l entnommen, mit 1 mM PMSF versetzt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben wurden anschließend mit einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert.

2.2.17. Spot-Blot-Analyse

Zur Spot-Blot-Analyse wurden Konzentrationsreihen von Polypeptidketten mit einer Spot-Blot-Apparatur auf eine Nitrozellulose-Membran aufgetragen. Der Blot erfolgte bei Raumtemperatur in Tris-gepufferter Salzlösung (*Tris buffered saline*, TBS) oder TBST (TBS mit Tween 20) (Tab. 2.25). Das Auftragen der Proben erfolgte auf jeweils zwei Nitrozellulose-Membranen und mindestens in Duplikaten. Die eine Membran wurde für 1 h mit Ponceau S (Tab. 2.25) gefärbt um die gleichmäßige Beladung mit Protein zu gewährleisten. Die Färbung wurde densitometrisch mit dem TotalLab-Programm ausgewertet. Die Intensität von A β (1-40)-Fibrillen wurde als 100 % Standard festgelegt. Die zweite Membran wurde 1 h mit Blockierungslösung inkubiert (Tab. 2.25) und anschließend für dreimal 5 min in TBST gewaschen. Im Folgenden wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur in TBST mit 0,5 μ g/ml B10AP oder 1 μ g/ml RAGE-VC1 inkubiert. Danach erfolgte wieder ein Waschschrift von dreimal 5 min in TBST. Die RAGE-VC1-Bindung wurde durch eine weitere Inkubation mit einem Anti-RAGE-C1-Domäne-Antikörper in TBST für 1 h, gefolgt von einem Waschschrift von dreimal 5 min in TBST und einem zweiten einstündigen Inkubationsschritt in TBST mit einem Anti-Kaninchen-AP-Antikörper sichtbar gemacht. Der Nachweis der alkalischen Phosphatase erfolgte durch Entwicklung mit NBT/BCIP. Die Auswertung der Signalintensität erfolgte mit TotalLab. Die Intensität von A β (1-40)-Fibrillen wurde als 100 % Standard festgelegt.

Für Konkurrenzexperimente zwischen A β (1-40)- und AL-Fibrillen um die Bindung von B10AP wurden AL-Amyloidfibrillen auf mehreren Nitrozellulose-Membranen immobilisiert. Diese Membranen wurden für 1 h in Blockierungslösung (Tab. 2.25) inkubiert. Danach erfolgte eine Inkubation (1 h) mit einer bereits einstündig inkubierten Lösung aus B10AP und A β (1-40)-Fibrillen. Dafür wurden A β (1-40)-Fibrillen in einem Verhältnis von 1:0,5; 1:5 oder 1:10 (w/w) zu AL-Fibrillen eingesetzt. Die B10AP-Bindung wurde wie oben beschrieben sichtbar gemacht und ausgewertet.

Tabelle 2.25. Verwendete Lösungen für die Spot-Blot-Analyse.

Lösung	Zusammensetzung
TBS	50 mM Tris (pH 7,4), 150 mM NaCl
TBST	50 mM Tris (pH 7,4), 150 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween 20
Ponceau S-Färbelösung	2 % (w/v) Ponceau S, 3 % (w/v) Trichloressigsäure
Blockierungslösung	2 % (w/v) bovines Serumalbumin in TBS oder TBST

2.2.18. Heparin-Sepharose-Chromatographie

Heparin weist sowohl Kationentauscher-Eigenschaften, als auch Affinitäts-Eigenschaften auf. Nutzt man Heparin unter pH-Bedingungen, die sich oberhalb des isoelektrischen Punktes eines Proteins befinden, so bindet dieses Protein nicht aufgrund der Kationentauscher-Eigenschaften von Heparin, sondern aufgrund spezifischer Interaktionen. Zu diesem Zweck wurde die Bindung von B10AP an Heparin CL-6B-Sepharose in 10 mM Natriumphosphat (pH 7,4), 150 mM NaCl durchgeführt. Die Elution von B10AP erfolgte durch Erhöhung der NaCl-Konzentration auf 0,5 M mit einem Stufengradient. Die Proben wurden mit SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert.

2.2.19. DNS-Bandenverschiebung

Bindet ein Protein stabil genug an Nukleinsäuren, so weist dieser Komplex ein langsames geleelektrophoretisches Laufverhalten auf. Zur Überprüfung der Interaktion von B10 mit DNS wurde ein lineares 5,6 kbp-DNS-Fragment mit und ohne B10AP in 50 mM Tris-Puffer (pH 7,4), 150 mM NaCl für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Ansätze wurden mit 1 % (w/v) Agarose-Gelelektrophorese in 40 mM Tris-Puffer (pH 8,5), 40 mM Essigsäure, 1 mM EDTA analysiert. Die Proben wurden mit einem UV-Transilluminator visualisiert.

2.2.20. B10AP-RAGE-Kompetition

Die Kompetition zwischen B10AP und RAGE-VC1, oder zwischen B10AP und B10 als Kontrolle, um die Bindung an A β (1-40)-Fibrillen wurde in 50 mM HEPES (pH 7,4) durchgeführt. Dafür wurden 50 μ M A β (1-40)-Fibrillen mit 5 μ M B10AP für 10 min bei Raumtemperatur vorinkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 5 μ M RAGE-VC1 oder 5 μ M B10. Die Lösung wurde danach in einem TLA100-Rotor ultrazentrifugiert (10 min, 43.4513 g, 20 °C) und die Proben mit einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert.

2.2.21. Kongorot-Absorptionsspektroskopie

Alle Spektren wurden bei Raumtemperatur mit einem UV-VIS-Spektrometer (Cary) aufgenommen. Die Proben enthielten entweder 50 mM Natriumborat (pH 9,0) oder 50 mM HEPES (pH 7,4), 50 mM NaCl. Die folgenden Konzentrationen wurden eingesetzt: 10 μ M Kongorot; 5 μ M B10AP; 50 μ M A β (1-40)-Peptid enthalten in Oligomeren, Fibrillen, fragmentierten Fibrillen, mit 5 μ M B10AP dekorierten Fibrillen oder mit 5 μ M B10AP stabilisierten Protofibrillen.

2.2.22. Kongorot-grüne Doppelbrechung

Die untersuchten Amyloidfibrillen wurden nach der „alkalischen Kongorot-Methode“ gefärbt⁷⁹. Dazu wurden 100 μ l einer Fibrillenlösung (1 mg/ml) mit einem TLA 100-Rotor ultrazentrifugiert (20 min, 43.6000 g, 20 °C). Das Pellet wurde für 10 min in Lösung 1 inkubiert und danach für 20 min in Lösung 2 gefärbt (Tab. 2.26). Nach der Färbung des Pellets erfolgte ein kurzer Waschschrift mit Wasser und anschließend die Dehydratation mit einer Alkoholreihe (je 2 min 80 %, 96 %, 100 %). Das Pellet wurde auf einem Objektträger ausgestrichen und mit Roti-Histokit eingebettet. Die Analyse der Proben erfolgte mit einem Eclipse 80i-Mikroskop (Nikon), das mit einem Polarisator und einer DS2Mv-Digitalkamera ausgestattet war.

Tabelle 2.26. Verwendete Lösungen für die alkalische KR-Methode.

Lösung	Zusammensetzung
Lösung 1 (1 l)	30 g NaCl, 80 % (v/v) unvergällter Ethanol, vor Gebrauch 10 mM NaOH zugesetzt
Lösung 2 (1 l)	5 g Kongorot, 30 g NaCl, 80 % (v/v) unvergällter Ethanol, vor Gebrauch 10 mM NaOH zugesetzt

2.2.23. FTIR-Spektroskopie

Die Infrarot-Spektren wurden bei Raumtemperatur mit einem Tensor 27 FTIR-Spektrometer (Bruker) aufgenommen, welches mit einer BIO-ATR II-Zelle und einem, mit flüssigem Stickstoff, gekühltem LN-MCT-Detektor ausgestattet war. Zur Messung wurden 15 μl Probe (Konzentration 2-10 mg/ml) auf die Zelle gegeben. Die Spektren stellen die Summe aus 64 Scans bei einer Auflösung von 2 cm^{-1} und vierfachem *zero filling* dar.

2.2.24. Thioflavin T-Fluoreszenzspektroskopie

Die ThT-Spektren wurden bei Raumtemperatur mit einem RF-5301PC- (Shimadzu) oder einem LS 55 Fluoreszenz-Spektrometer (PerkinElmer) aufgenommen. Die ThT-Anregung erfolgte bei 450 nm (Schlitzweite 7 nm) in einer Küvette mit 5 mm Pfadlänge. Die Emissionsspektren wurden zwischen 460 nm und 700 nm aufgenommen (Schlitzweite 7 nm). Die Proben enthielten entweder 50 mM Natriumborat (pH 9,0) oder 50 mM Hepes (pH 7,4), 50 mM NaCl. Die folgenden Konzentrationen wurden verwendet: 20 μM ThT; 0,5 μM B10AP; 5 μM A β (1-40).

2.2.25. Thioflavin T-Aggregationskinetik

ThT-Aggregationskinetiken wurden in einer 96 Loch-Mikrotiterplatte bei 37 °C, in einem BMG Mikrotiterplatten-Lesegerät, das mit einer Fluoreszenzoptik ausgestattet ist, gemessen. Die Datenpunktaufnahme erfolgte alle 30 min. Vor jeder Messung wurde die Platte 10 s mit 100 Upm geschüttelt. Um Verdunstung zu verhindern, erfolgte der Verschluss der Platten mit Rotilabo-Abdeckfolie. Die Anregung von ThT erfolgte bei 450 nm. Die Emission wurde bei 490 nm durch den Plattenboden gemessen. Folgende Konzentrationen wurden gewählt: 50 μM A β (1-40)-Peptid, 50 mM HEPES (pH 7,4), 50 mM NaCl, 20 μM ThT, verschiedene Konzentrationen an B10AP.

2.2.26. Röntgenbeugung

Zur Probenvorbereitung wurden 0,44 mg disaggregiertes A β (1-40)-Peptid mit 0,64 mg B10AP in 400 μ l 50 mM HEPES (pH 7,4), 50 mM NaCl für 1 d bei 37 °C inkubiert und danach ultrazentrifugiert (15 min, 40.0447 g, 20 °C). Das hydratisierte Pellet wurde in eine Glaskapillare überführt und diese mit Wachs verschlossen. Die Messung erfolgte für 30 min und wurde mit Hilfe von D. Röser (FLI, Jena) an einem Röntgengenerator FR591 (Enraf Nonius) durchgeführt. Die angegebenen Werte der Reflexe wurden durch Mittelung von acht individuellen Messungen, an verschiedenen Positionen entlang des Reflexionsringes, ermittelt.

2.2.27. Transmissions-Elektronenmikroskopie

Alle Proben wurden auf kohlebedampften, mit Formvarfilm überzogenen Kupfernetzchen immobilisiert³¹⁴. Die Herstellung eines Formvarfilms erfolgte durch das Eintauchen eines mit Spülmittel gereinigten Objektträgers in eine 1 % (w/v) Formvar-Chloroform-Lösung (Abb. 2.7a). Nach Trocknung bei Raumtemperatur wurde der Formvarfilm durch Abschwemmen auf eine Wasseroberfläche von dem Objektträger gelöst (Abb. 2.7b). Der schwimmende Film wurde mit Kupfernetzchen belegt und mit einem neuen Objektträger aus dem Wasser entnommen (Abb. 2.7c). Der Film wurde bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend kohlebedampft (Abb. 2.7d).

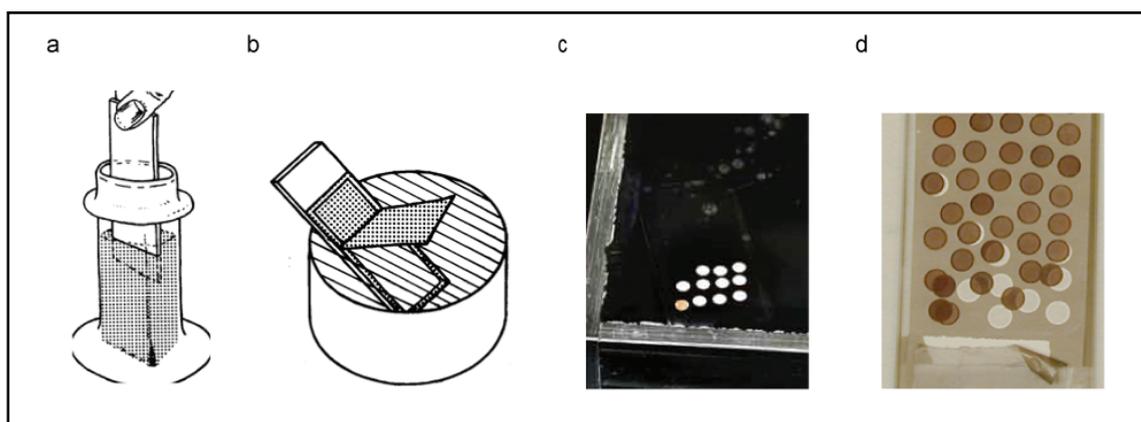


Abbildung 2.7. Präparation kohlebedampfter, mit Formvarfilm überzogener Netzchen.

(a) Durch Eintauchen eines Objektträgers in eine 1 % (w/v) Formvar-Chloroform Lösung entsteht ein Formvarfilm auf dem Objektträger. (b) Abschwemmen eines Formvarfilms von einem Objektträger. (c) Ein mit Netzchen bedeckter Objektträger wird in die Lösung getaucht. (d) Ein Objektträger mit Formvarfilm nach Kohlebedampfung. Bildquelle: quorumtech.com/applications/techniques-and-advantages/carbon-coating-preparation-techniques-and-advantages.html, cryoem.ucsd.edu/procedures/carbonfilm.shtm,

Die Negativ-Kontrastierung der Probe wurde mit der Einzeltropfen-Methode durchgeführt³¹⁴. Dazu wurden 4 μl einer Proteinlösung auf ein kohlebedampftes, mit Formvarfilm überzogenes Kupfernetzchen gegeben (Abb. 2.8a, b). Nach 30 s Inkubation erfolgte ein dreimaliges Waschen des Netzchens durch Eintauchen in je 50 μl Wasser und anschließend die Negativkontrastierung durch Eintauchen in dreimal je 50 μl 2 % (w/v) Uranylacetat oder 2 % (w/v) Ammoniummolybdat (Abb. 2.8c). Danach wurde die Flüssigkeit mit Filterpapier vom Netzchen abgesaugt und dieses bei Raumtemperatur getrocknet (Abb. 2.8d). Die Proben wurden mit einem Zeiss EM 900-TEM bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV ausgewertet.

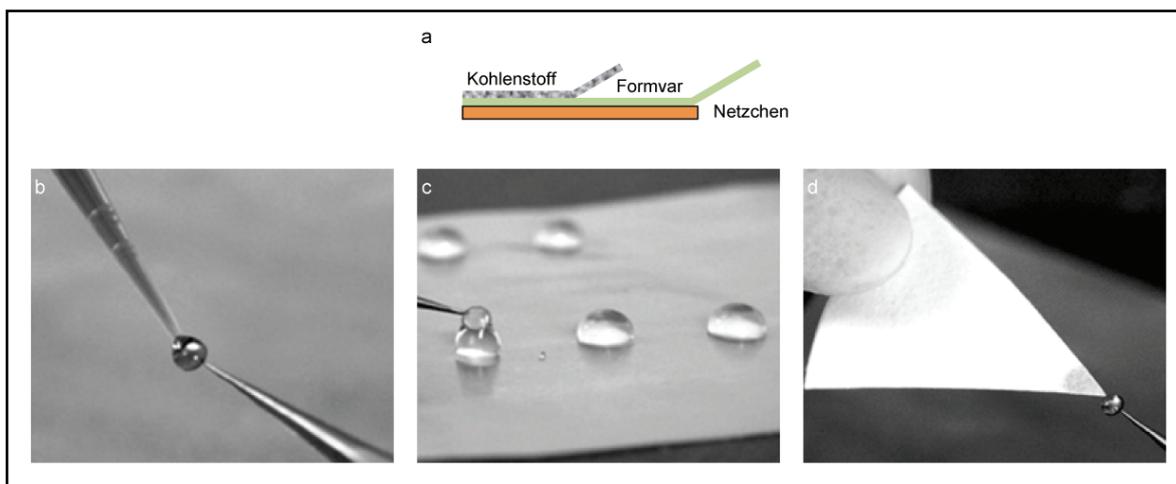


Abbildung 2.8. Negativkontrastierung einer TEM-Probe mit der Tropfentechnik.

(a) Schema eines kohlebedampften, Formvar-Film überzogenen Netzchens. (b) Auftragen der Probe auf ein Netzchen. (c) Waschen des Netzchens in Wassertropfen. (d) Absaugen der Flüssigkeit. Bildquelle: Burghardt & Droleskey (2006)³¹⁵.

2.2.28. Isothermale Titrationskalorimetrie

Die isothermale Titrationskalorimetrie wurde mit einem VP-ITC (MicroCal) bei 20 °C und 310 Upm durchgeführt. Die Proben wurden vor der Messung gegen 50 mM Natriumphosphat (pH 7,4), 150 mM NaCl dialysiert. Die Lösungen wurden vor dem Befüllen der Probenkammer und der Injektionsspritze entgast. Zur Messung wurden 300 μl Ligand (Konzentration: 50 μM) wurden zu 1,4 ml B10AP (Konzentration: 5 μM) in Schritten von 15 μl injiziert. Die Daten der Vorinjektion (2 μl) wurden immer verworfen. Als Referenz für mathematische Korrekturen, wurden die Daten der Injektion von Puffer in B10AP und Ligand in Puffer verwendet. Die Analyse der Daten erfolgte mit dem Programm Origin. Wenn möglich wurde die Bindungsisotherme mit einem „eine

Bindungsstelle“-Modell durch die nicht lineare Methode der kleinsten Fehlerquadrate bestimmt.

2.2.29. Darstellung der Proteinstrukturen

Alle Strukturen wurden mit dem Programm Pymol dargestellt. Es wurden folgende Protein Datenbank (PDB)-Dateien verwendet: Maltose-Bindeprotein: 1JW4.PDB³⁰², Lysozym: 4LZT.PDB³⁰³, Trypsin: 1S81.PDB³⁰⁴, Insulin: 1MSO.PDB³⁰⁵, TTR: 1RLB.PDB⁹³, Pektat-Lyase Pel-15: 1EE6.PDB¹¹⁹, P22 Tailspike-Protein(109-666): 1TSP.PDB¹¹⁸, HET-s(218-289)-Fibrille (pH 7,5): 2RNM.PDB¹¹², A β (1-42)-Fibrille: 2BEG.PDB¹⁰⁴, B10: 3LN9.PDB²⁹⁸, 12A11: 3IFN.PDB³¹⁶ A β (37-42)-Mikrokristall: PDB:2ONV⁴⁴, RAGE-VC1-Domäne: 3CJJ.PDB²⁵⁷.

3. Ergebnisse

Die kamelide Antikörperdomäne B10, welche die Amyloidfibrillen des Alzheimer A β (1-40)-Peptides erkennt (Kap. 1.10.2), lag zu Beginn dieser Arbeit als hoch aufgereinigtes Protein in der Arbeitsgruppe vor (Anhang Tab. 8.1).

3.1. Untersuchungen zur Bindungsspezifität von B10

3.1.1. B10 unterscheidet A β (1-40)-Fibrillen von anderen A β (1-40)-Konformeren

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass B10 A β (1-40)-Fibrillen von disaggregiertem A β (1-40)-Peptid unterscheidet (Kap. 1.10.2). Um zu untersuchen, ob B10 neben A β (1-40)-Fibrillen auch mit anderen A β (1-40)-Konformeren wechselwirkt, wurden spezifische nicht-fibrilläre Aggregate, sogenannte lösliche Oligomere¹⁴⁹, strukturell charakterisiert und auf eine Interaktion mit B10 getestet. Die Analyse mit TEM zeigte, dass die A β (1-40)-Oligomere im Vergleich zu A β (1-40)-Fibrillen eine runde Struktur mit einem Durchmesser von 10 nm bis 60 nm aufweisen (Abb. 3.1a). Des Weiteren zeigte die Analyse mit den amyloidspezifischen Farbstoffen ThT und KR, dass A β (1-40)-Oligomere sehr viel schwächer mit diesen interagiert als A β (1-40)-Fibrillen (Abb. 3.1b, c). Diese Daten zeigen, dass sich A β (1-40)-Oligomere und A β (1-40)-Fibrillen strukturell voneinander unterscheiden. Um die Interaktion zwischen B10 und A β (1-40)-Oligomeren zu untersuchen, wurde ein Spot-Blot unter Verwendung äquivalenter Mengen an A β (1-40)-Oligomeren und A β (1-40)-Fibrillen mit B10AP durchgeführt (Abb. 3.1d). Die Auswertung der Färbung zeigte, dass für A β (1-40)-Oligomere im Vergleich zu A β (1-40)-Fibrillen keine signifikante Interaktion mit B10 nachweisbar ist (Abb. 3.1d). Daraus lässt sich schließen, dass das B10-Epitop nicht in allen A β (1-40)-Konformeren vorhanden ist.

Eine weitere Analyse der strukturellen Eigenschaften von A β (1-40)-Oligomeren mit Fern-UV-Zirkulardichroismus zeigte ein einzelnes Minimum bei 217 nm (Abb. 3.3e). Dieses Minimum ist charakteristisch für eine β -Faltblatt-Konformation. Daraus folgt, dass A β (1-40)-Oligomere einen hohen β -Faltblatt-Anteil aufweisen und diesbezüglich A β (1-40)-Amyloidfibrillen ähneln. Des Weiteren zeigte die Analyse mit FTIR-Spektroskopie einen geringen, aber signifikanten strukturellen Unterschied in der Amid-I-Region zwischen beiden Konformeren (Abb. 3.1f). A β (1-40)-Oligomere weisen ein Amid-I-Maximum bei 1623 cm⁻¹ auf, wohingegen A β (1-40)-Fibrillen ein Maximum

bei 1628 cm^{-1} besitzen. Beide Maxima sind typisch für eine amyloidähnliche β -Faltblatt-Struktur⁸⁴. Darüber hinaus zeigen $A\beta(1-40)$ -Oligomere zusätzlich ein klar abgesetztes Maximum bei 1693 cm^{-1} (Abb. 3.1f). Ein Maximum in dieser Region wird generell als ein Indikator für eine antiparallele β -Faltblatt-Struktur interpretiert⁸⁸. Im Gegensatz dazu deuten experimentelle Festkörper-NMR-Daten von $A\beta(1-40)$ -Fibrillen darauf hin, dass diese aus parallelen β -Faltblättern aufgebaut sind¹⁰⁰. Zusammenfassend lässt sich aus diesen Daten schließen, dass $A\beta(1-40)$ -Oligomere und $A\beta(1-40)$ -Fibrillen eine β -Faltblatt-

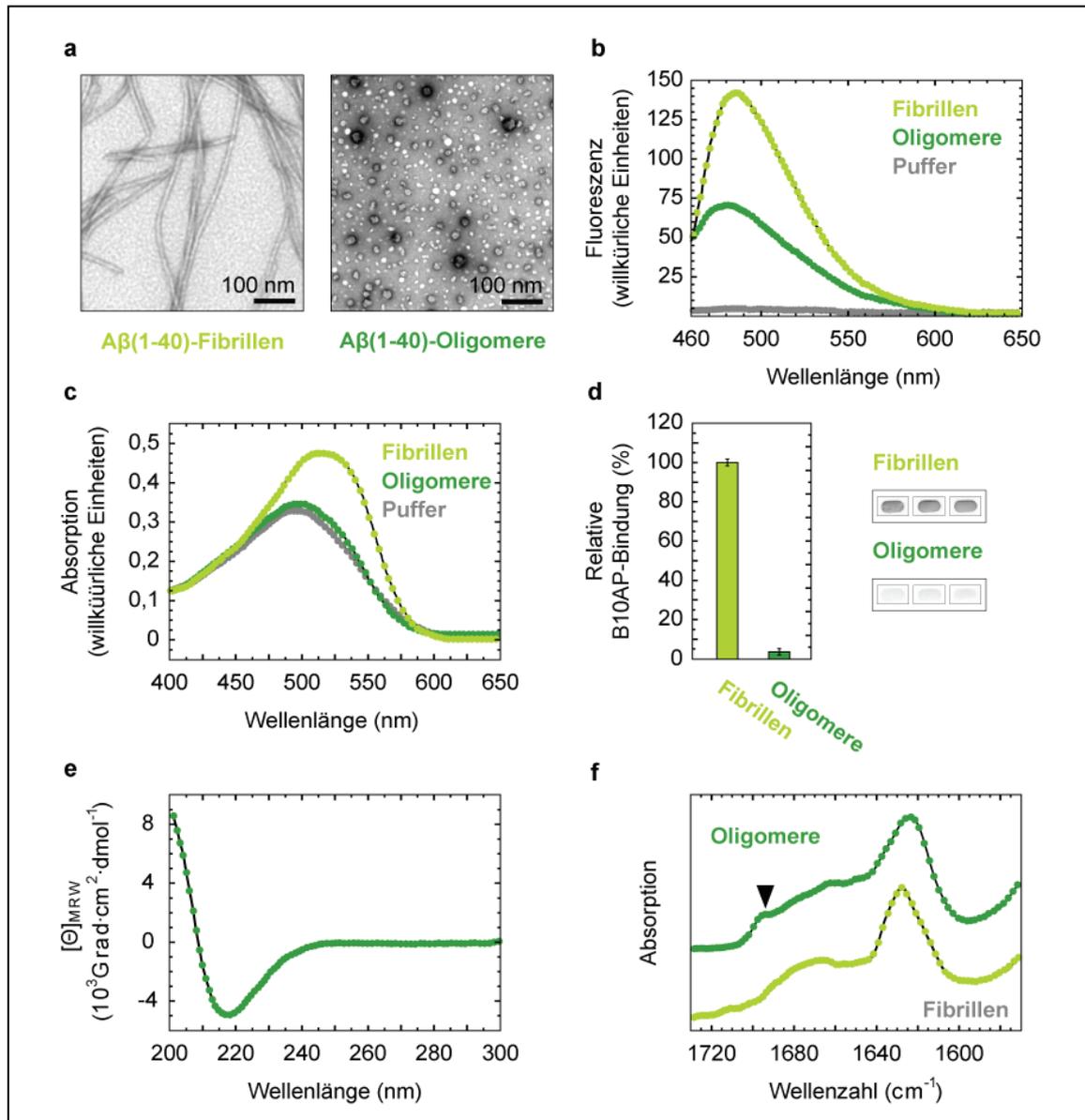


Abbildung 3.1. B10AP zeigt keine signifikante Interaktion mit $A\beta(1-40)$ -Oligomeren.

(a) TEM-Analyse der Präparation von $A\beta(1-40)$ -Fibrillen und $A\beta(1-40)$ -Oligomeren. (b, c) ThT-Fluoreszenz (b) oder KR-Absorption (c) in Gegenwart von Puffer, $A\beta(1-40)$ Fibrillen oder $A\beta(1-40)$ -Oligomeren. (d) Quantifizierte Spot-Blot-Färbung von $A\beta(1-40)$ -Fibrillen und $A\beta(1-40)$ -Oligomeren mit B10AP. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung ($n = 2-3$). (e) Fern-UV-Zirkulardichroismus-Spektrum von $A\beta(1-40)$ -Oligomeren (aufgenommen von J. Meinhardt, FLI, Jena). (f) FTIR-Spektrum von $A\beta(1-40)$ -Fibrillen und $A\beta(1-40)$ -Oligomeren. Im Spektrum von $A\beta(1-40)$ -Oligomeren tritt ein zusätzliches Maximum bei 1693 cm^{-1} auf^l (Pfeil).

reiche Struktur aufweisen, die sich jedoch signifikant voneinander unterscheidet. Des Weiteren ist die Bindung von B10 nicht durch die bloße Präsenz einer β -Faltblatt-Struktur erklärbar.

3.1.2. B10 interagiert nicht mit intrinsisch ungefalteten oder globulär gefalteten Polypeptidketten

Als nächstes untersuchten wir intrinsisch ungefaltete und globulär gefaltete Polypeptidketten mit verschiedenen Techniken auf eine Interaktion mit B10. Dies erfolgte zum einen durch eine Spot-Blot-Analyse mit B10AP. Um eine vergleichbare Beladung der Membran mit den verschiedenen Polypeptidketten zu gewährleisten, wurde eine zweite identisch aufgetragene Membran mit Ponceau S gefärbt und ausgewertet. Das Ponceau-S- und das B10AP-Signal einer mitgeführten $A\beta(1-40)$ -Fibrillenlösung wurden als Standard für die Auswertung verwendet. Die Analyse der Ponceau S-Färbung zeigte eine gleichmäßige Beladung der Membran mit den verschiedenen Polypeptidketten (Abb. 3.2a, b). Allerdings zeigte die B10AP-Färbung keine signifikanten Interaktionen mit den getesteten intrinsisch ungefalteten (Abb. 3.2a) oder globulär gefalteten Polypeptidketten (Abb. 3.2b). Um diese Resultate zu verifizieren, wurde die Analyse der B10-Interaktion an einigen ausgewählten Polypeptidketten mit isothermaler Titrationskalorimetrie wiederholt. Bei der isothermalen Titrationskalorimetrie erfolgt eine schrittweise Zugabe eines Stoffes zu einem anderen. Der Nachweis einer Interaktion beider Stoffe ist bei dieser sehr sensitiven Technik mit der Messung einer Wärmedifferenz verbunden, die bei einer exothermen oder endothermen Reaktion entsteht. Im vorliegenden Fall erfolgte eine schrittweise Zugabe der jeweils zu analysierenden Polypeptidkette zu einer B10AP-Lösung. In Übereinstimmung mit den Spot-Blot-Daten zeigte die Analyse mit isothermaler Titrationskalorimetrie, dass für keine der untersuchten Polypeptidketten eine Interaktion mit B10AP nachweisbar ist (Abb. 3.2c). Daraus lässt sich schließen, dass B10 ein Epitop erkennt, welches nicht in intrinsisch ungefalteten oder bei globulär gefalteten Polypeptidketten vorhanden ist. Diese Daten zeigen ebenfalls, dass das B10-Epitop eine spezifische Eigenschaft von $A\beta(1-40)$ -Fibrillen ist.

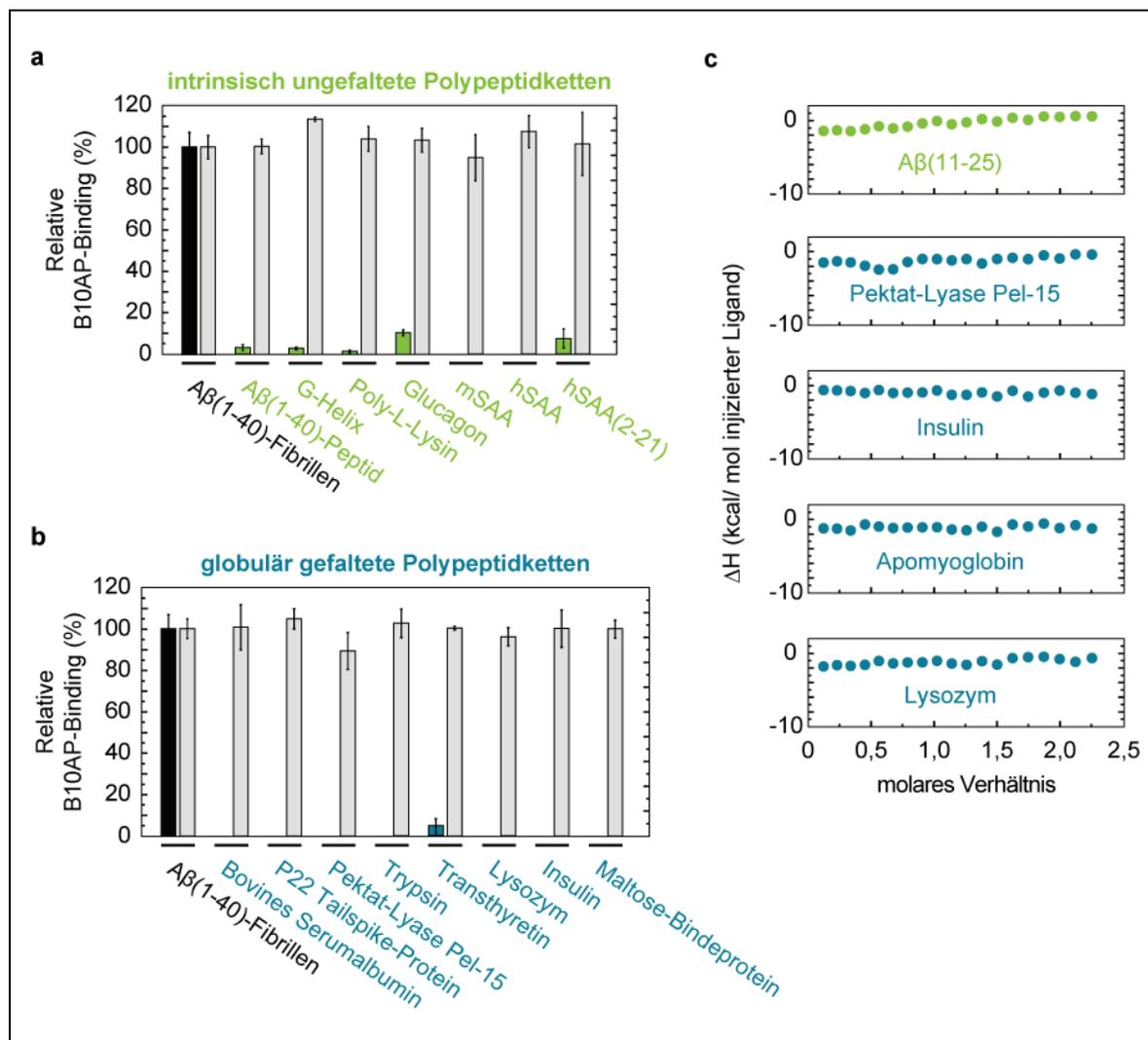


Abbildung 3.2. B10 zeigt keine signifikante Interaktion mit intrinsisch ungefalteten oder globulär gefalteten Polypeptidketten.

(a, b) Quantifizierte Spot-Blot-Färbung von intrinsisch ungefalteten (a, orange) oder globulär gefalteten Polypeptidketten (b, blau) mit B10AP. Eine gleiche Proteinbeladung der Membran wurde mit Ponceau S-Färbung nachgewiesen (grau). Das Signal von Aβ(1-40)-Fibrillen wurde als 100 % definiert (schwarz). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung (n = 2-3). (c) Mit isothermaler Titrationskalorimetrie sind keine Interaktionen zwischen B10AP und den getesteten Polypeptidketten nachweisbar. Darstellung der Enthalpieänderung ΔH gegen das molare Verhältnis von getestetem Ligand zu B10AP.

Eine Analyse der strukturellen Eigenschaften der getesteten globulär gefalteten Polypeptidketten zeigte, dass diese signifikant in ihrer dreidimensionalen Struktur, sowie in Gehalt und Organisation ihrer Sekundärstrukturen variieren (Abb. 3.3, Tab. 2.12). Einige dieser Polypeptidketten weisen einen hohen β-Faltblatt-Anteil oder eine β-Helix-Struktur auf, wie zum Beispiel Pektat-Lyase Pel-15¹¹⁹ oder das Tailspike-Protein

des Bakteriophagen P22 (Aminosäuren 109-666)³¹⁷. Obwohl diese globulär gefalteten Polypeptidketten, ebenso wie A β (1-40)-Fibrillen, einen hohen β -Faltblatt-Gehalt aufweisen, sind keine signifikanten Interaktionen mit B10 nachweisbar. Im Zusammenhang mit den sehr schwachen Interaktionen von B10 mit β -Faltblatt-reichen A β (1-40)-Oligomeren (Abb. 3.1) zeigen diese Daten, dass B10 keine generelle β -Faltblatt-Konformation erkennt.

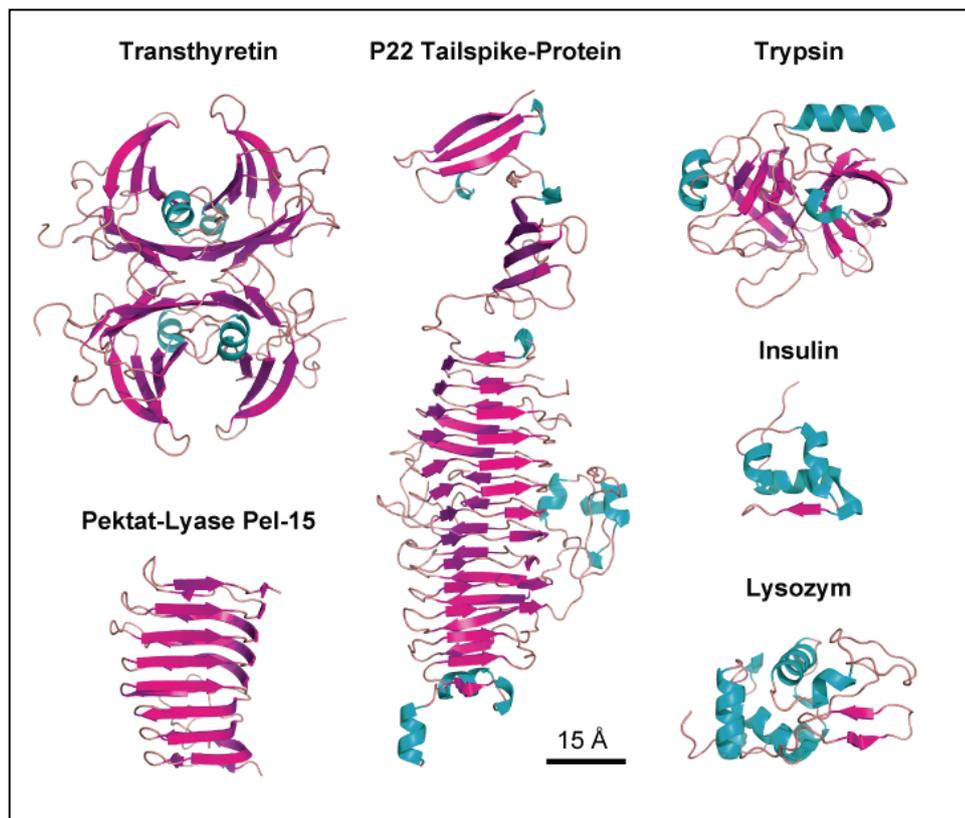


Abbildung 3.3. Vergleich der strukturellen Diversität der getesteten globulär gefalteten Polypeptidketten.

Bändermodell der Struktur von Transthyretin: 1RLB.PDB⁹³, Pektat Lyase Pel-15: 1EE6.PDB¹¹⁹, P22 Tailspike-Protein (nur eine Untereinheit abgebildet): 1TSP.PDB¹¹⁸, Trypsin: 1S81.PDB³⁰⁴, Insulin: 1MSO.PDB³⁰⁵, Lysozym: 4LZT.PDB³⁰³.

Zusammenfassend lassen diese Resultate den Schluss zu, dass B10 ein Epitop erkennt, welches spezifisch in A β (1-40)-Fibrillen vorkommt. Demzufolge bietet die Bindungsspezifität von B10 eine ideale Grundlage, um die konformationssensitive Bindung von Antikörpern an Amyloidfibrillen aufzuklären. Auf der Grundlage von diesen Daten begannen wir, das von B10 erkannte Epitop in weiteren Versuchen systematisch zu charakterisieren.

3.2. Untersuchungen zur Charakterisierung des B10-Epitops

3.2.1. Die antigenbindende Region von B10 ist mit positiv geladenen Aminosäuren angereichert

Erste Hinweise auf die strukturellen Eigenschaften des von B10 erkannten Antigens lieferte die Analyse der im Labor gelösten Kristallstruktur von B10 (durch I. Morgado und C. Parthier, MLU, Halle (Saale)). Die drei CDRs, die in ihrer Gesamtheit die antigenbindende Region bilden, bestimmen die molekulare Spezifität von B10. In diesem Kontext formen die CDRs eine relativ flache Oberfläche, ohne eine große und tiefe Bindungstasche zu bilden (Abb. 3.4a). Im Gegensatz dazu ist bei sequenzspezifischen Anti-A β -Antikörpern eine großflächige und tiefe Antigen-Bindungstasche ausgebildet, in der das A β -Peptid in einer ausgestreckten Konformation eingebettet ist^{316,318,319} (Abb. 3.4b). Dadurch unterscheidet sich B10 signifikant von sequenzspezifischen Anti-A β -Antikörpern, wobei jedoch konformationelle Änderungen bei der Antigenbindung von B10 nicht auszuschließen sind. Diese strukturelle Gegebenheit lässt darauf schließen, dass B10 bevorzugt mit relativ flachen Antigen-Oberflächen interagiert.

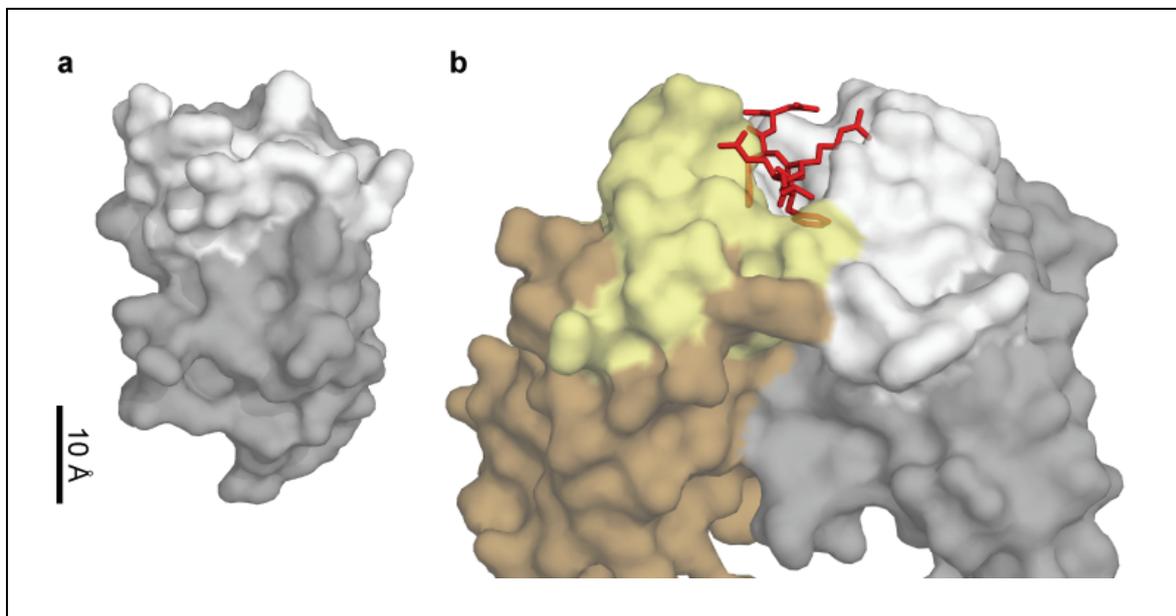


Abbildung 3.4. Struktureller Vergleich der antigenbindenden Region von B10 und einem sequenzspezifischen Anti-A β -Antikörper.

Oberflächendarstellung der Struktur von B10 (a) oder des Fab-Fragments des sequenzspezifischen Anti-A β -Antikörpers 12A11³¹⁶ (b). Die Darstellung in (b) zeigt einen Ausschnitt der Fab-Struktur mit Komplexierung des A β (1-8)-Peptidfragmentes (rot). Die leichte Kette ist in braun, die schweren Ketten sind in grau abgebildet. Die CDRs sind in aufgehellt dargestellt. PDB-Zugangscode: B10: 3LN9.PDB²⁹⁸, 12A11: 3IFN.PDB³¹⁶.

Die Analyse der CDRs von B10 offenbarte eine signifikante Anreicherung von positiv geladenen Aminosäuren, während negativ geladene Aminosäuren fehlen (Abb. 3.5a). Des Weiteren zeigte die Kristallstruktur von B10, dass die positiv geladenen Aminosäuren über die gesamte antigenbindende Region verteilt sind (Abb. 3.5b). Dies spiegelt sich in einer sehr stark positiven Oberflächenladung der Bindungsregion wider (Abb. 3.5c). Dagegen weisen die Bindungstaschen von sequenzspezifischen Anti-A β -Antikörpern mehrere positiv und negativ geladene Reste auf^{316,318,319}. Dadurch besteht deren antigenbindende Region aus bedeutend weniger positiv geladenen Oberflächenbereichen (Abb. 3.5d). Anhand dieser Daten lässt sich vermuten, dass die antigenbindende Region von B10 aufgrund der auffallend positiven Ladung bevorzugt mit negativ geladenen Bereichen von Liganden interagiert. Außerdem lässt sich daraus schließen, dass B10 seine Liganden über elektrostatische Interaktionen erkennt.

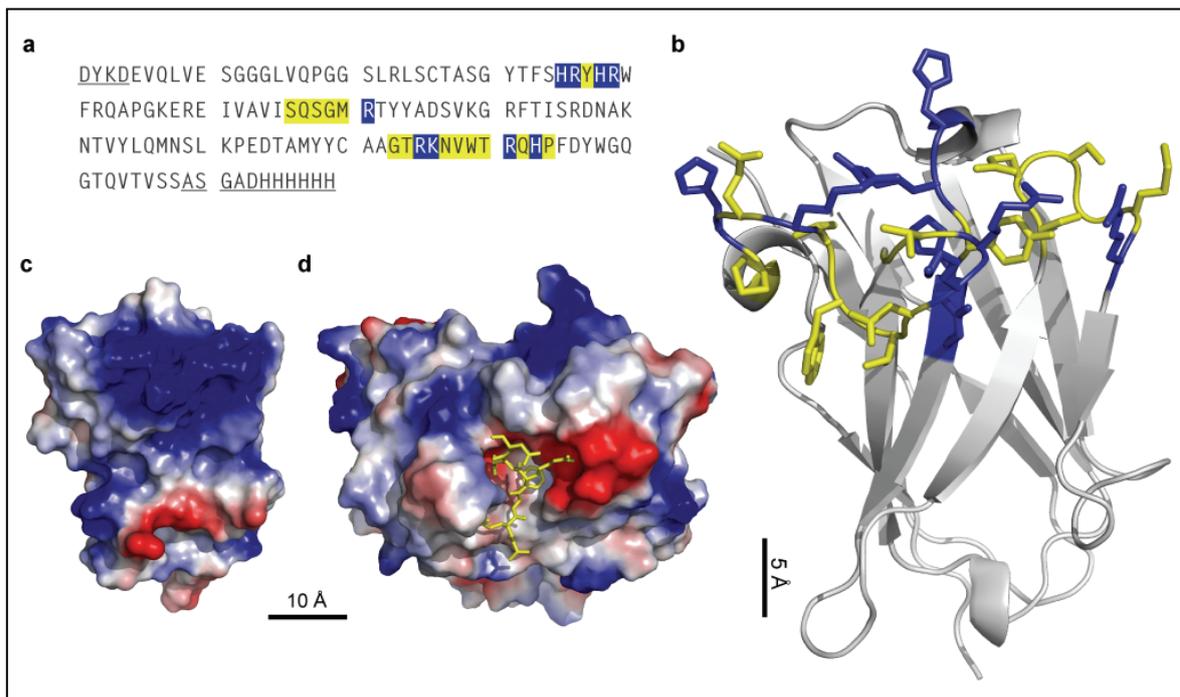


Abbildung 3.5. Die CDRs von B10 sind mit positiv geladenen Aminosäuren angereichert.

(a) Aminosäuresequenz von B10. Die Positionen der CDRs sind farbig dargestellt (blau: positiv geladen, gelb: ungeladen). Die unterstrichenen Reste sind nicht in der B10 Kristallstruktur sichtbar. (b) B10-Kristallstruktur als Bändermodell. Die Farbkodierung ist entsprechend zu (a). (c, d) Elektrostat. Oberflächenpotential der B10-Struktur (c) und der Struktur des Fab-Fragments des sequenzspezifischen Anti-A β -Antikörpers 12A11³¹⁶ (d). Positiv geladene Bereiche sind blau und negativ geladene Bereiche sind rot gefärbt. Die Darstellung in (d) zeigt das Fab-Fragment in der Aufsicht auf die CDRs mit Komplexierung des A β (1-8)-Peptidfragmentes (gelb). PDB-Zugangscode: B10: 3LN9.PDB²⁹⁸, 12A11: 3IFN.PDB³¹⁶.

3.2.2 B10 erkennt Liganden aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen

Um die Hypothese zu überprüfen, dass B10 seine Liganden durch elektrostatische Interaktionen erkennt, wurde eine ortsspezifische Mutagenese aller 23 Positionen der CDRs von B10 durchgeführt und deren Effekt auf die Bindungsaffinität für A β (1-40)-Fibrillen untersucht. In diesem Kontext erfolgte der Austausch jeweils eines CDR-Restes gegen ein Alanin. Die Aufreinigung und Analyse der B10-Varianten wurde immer auf die gleiche Weise durchgeführt und soll am Beispiel der H35A-Mutante zusammengefasst werden. Das Protein wurde mit einem C-terminalen His-tag exprimiert. Identisch zur etablierten Reinigungsstrategie von B10 erfolgte die Aufreinigung aller B10-Varianten mit einer Ni-Chelat-Chromatographie sowie einer Umkehrphase-Chromatographie und wurde parallel mit SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese überprüft (Abb. 3.6). Diesbezüglich dokumentierte das Gel nach der Ni-Chelat-Chromatographie, dass H35A nahezu sauber ist und nur einige schwache zusätzliche Banden sichtbar sind (Abb. 3.6b). Die anschließende Umkehrphase-Chromatographie führte zur erfolgreichen Isolation des Proteins ohne erkennbare Fremd-Banden im SDS-Gel (Abb. 3.6d). Die typischerweise

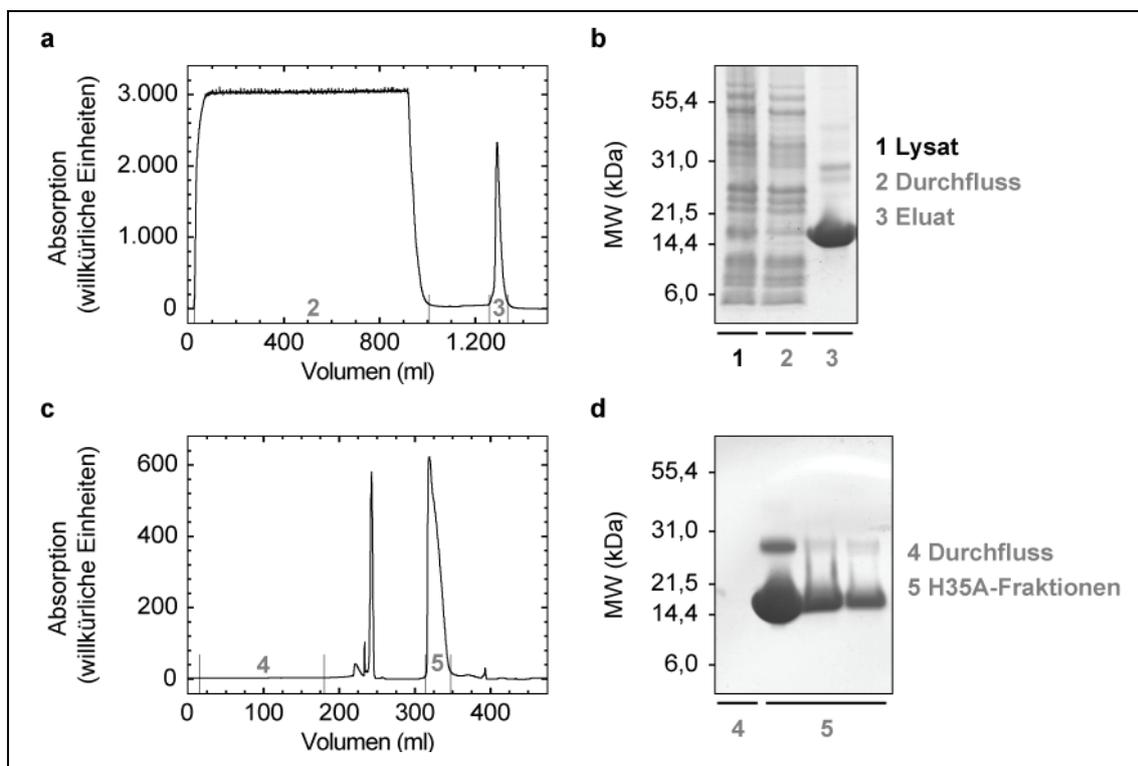


Abbildung 3.6. Aufreinigung der B10-Mutante H35A.

Aufreinigung der B10-Mutante H35A durch eine Ni-Chelat-Chromatographie (a, b) und eine Umkehrphase-Chromatographie (c, d). Die Coomassie-gefärbten SDS-Proteingele (b, d) dokumentieren den Verlauf der Reinigung. Die Bande bei etwa 30 kDa in (d) entspricht einem B10-Dimer. MW: Molekulargewicht.

auftretende Bande bei etwa 30 kDa entspricht einem H35A-Dimer (Abb. 3.6d). Das korrekte Molekulargewicht des Proteins wurde mit Massenspektrometrie bestätigt. Darüber hinaus erfolgte eine Analyse der Reinheit des Proteins durch eine analytische Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie und die Integration der Fläche unter dem Ausschlag (Abb. 3.7a). Die Analyse zeigte, dass die Reinheit in allen Fällen mindestens 97 % beträgt (Anhang Tab. 8.1). Nachdem diese Untersuchungen die Identität und eine genügende Reinheit des Proteins bestätigten, erfolgte die Ermittlung des K_D -Wertes für die Bindung der Mutante an A β (1-40)-Fibrillen mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie (Abb. 3.7b, c). Aus den Bindungsdaten verschiedener Konzentrationen der jeweiligen B10-Variante an A β (1-40)-Fibrillen im Fließgleichgewicht (Abb. 3.7b) wurde der K_D -Wert mit einem *Steady State Affinity*-Modell ermittelt (Abb. 3.7c). Eine Auflistung der K_D -Werte aller B10-Varianten ist im Anhang (Tab. 8.1) zusammengefasst.

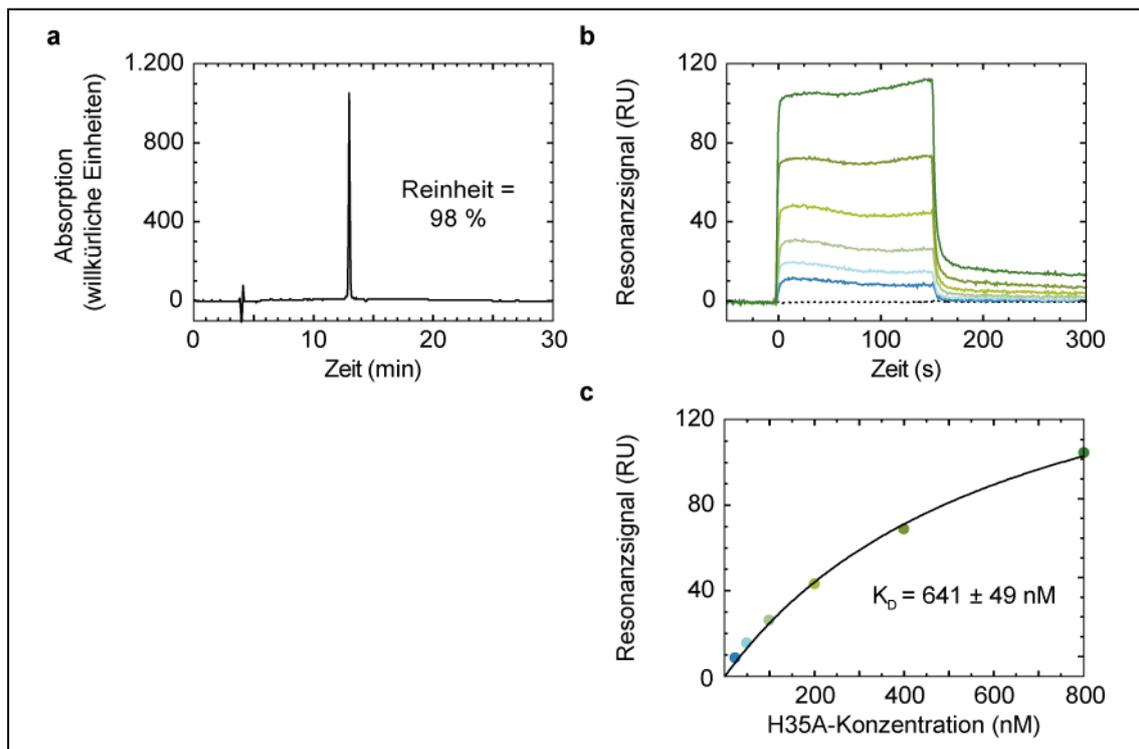


Abbildung 3.7. Analyse der B10-Mutante H35A.

Die Analyse von H35A mit analytischer Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (a) und Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie (b, c) dokumentiert eine Reinheit von 98 % und einen K_D -Wert von 641 ± 49 nM. Die Sensorgramme in (b) zeigen die Interaktion von H35A mit disaggregiertem A β (1-40)-Peptid (gepunktete Linie) oder A β (1-40)-Fibrillen (durchgezogene Linien). Die Farben kennzeichnen die Proteinkonzentration der mobilen Phase von 25 nM (dunkelblau) bis 800 nM (dunkelgrün und schwarz). Der K_D -Wert wurde aus den Bindungsdaten der verschiedenen Konzentrationen im Fließgleichgewicht mit einem *Steady State Affinity*-Modell ermittelt (d). Die analytische Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie wurde von A. Pech (MLU, Halle (Saale)) und die Messung mit Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie von M. Bereza und P. Hortschansky (HKI, Jena) durchgeführt.

Der Vergleich der K_D -Werte der verschiedenen B10-Varianten zeigte, dass die ortsspezifische Mutagenese der positiv geladenen CDR-Reste in ein Alanin zu einer Schwächung der Interaktion zwischen B10 und A β (1-40)-Fibrillen führt (Abb. 3.8a). Diesbezüglich konnten die stärksten Effekte bei den Resten R39 (CDR 1) und R61 (CDR 2) beobachtet werden (Abb. 3.8a). Dagegen führte der Austausch eines ungeladenen CDR-Restes in keinem Fall zu einer Erhöhung des K_D -Wertes (Abb. 3.8a). Aufgrund dieser Resultate wurde die B10-Doppelmutante R39A/R61A erzeugt. Die Analyse von R39A/R61A mit Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie zeigte, dass die Bindung im Vergleich zu den Einzelmutanten fast komplett reduziert ist (Abb. 3.8b). Daraus lässt sich schließen, dass positiv geladene CDR-Reste von entscheidender Bedeutung für die Erkennung von A β (1-40)-Fibrillen durch B10 sind. Die Analyse der B10-Kristallstruktur

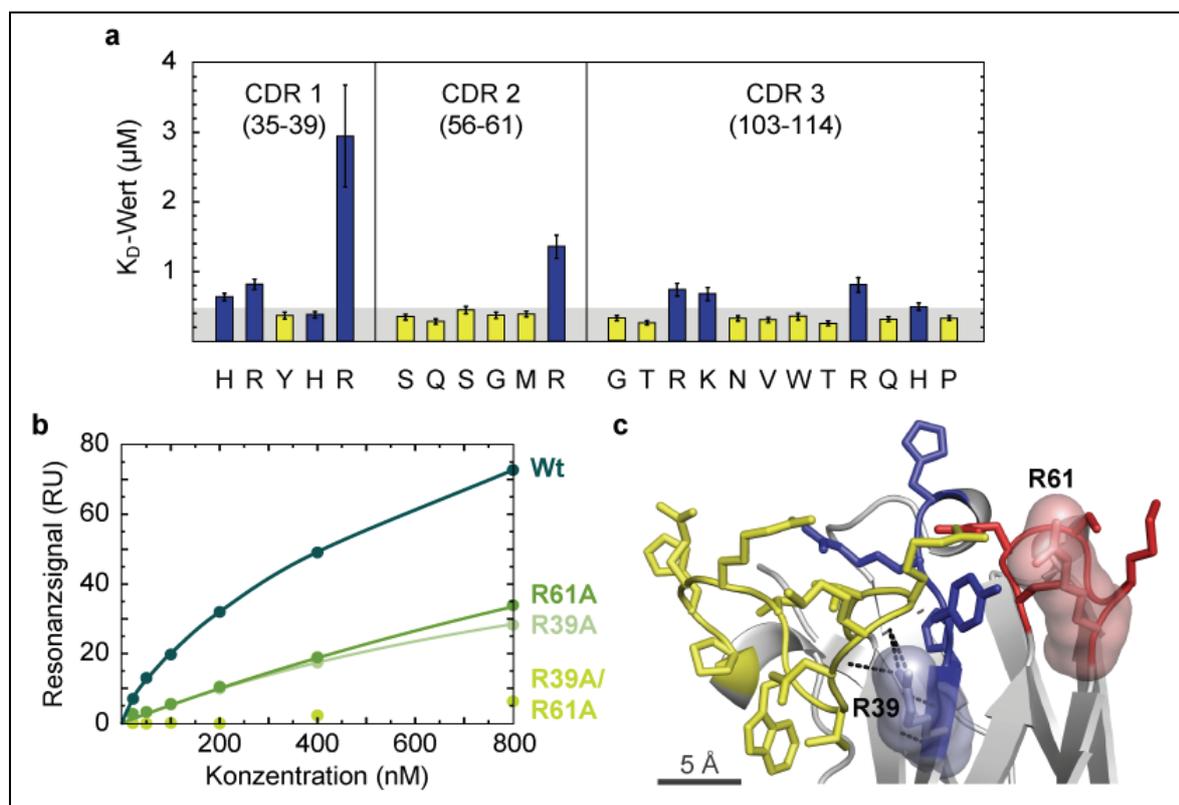


Abbildung 3.8. Positiv geladene CDR-Reste sind entscheidend für die Bindung von B10 an A β (1-40)-Fibrillen.

(a) Alanin-Mutagenese der CDRs von B10. Dargestellt sind die K_D -Werte (abgeleitet aus Bindungsanalysen mit Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie) der B10-Varianten für die Bindung an A β (1-40)-Fibrillen. Der graue Hintergrund stellt den K_D -Wert für den B10-Wildtyp dar. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an ($n = 2-3$). Die Messung wurde von M. Bereza und P. Hortschansky (HKI, Jena) durchgeführt. (b) Vergleich der Bindungsdaten von B10-Wildtyp (Wt) sowie den B10-Varianten R39A, R61A und der Doppelmutante R39A/R61A an A β (1-40)-Fibrillen aus Messungen mit Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie. Die Anpassung der Daten erfolgte mit einem *Steady State Affinity*-Modell. Aufgrund des geringfügigen Signales der R39A/R61A-Variante erfolgte keine Anpassung. (c) Räumliche Lage der Reste R39 und R61 im Kontext der antigenbindenden Region von B10. Die CDRs sind in blau (CDR 1), rot (CDR 2) und gelb (CDR 3) dargestellt. R39 interagiert über polare Kontakte (gestrichelte Linie) mit Resten der CDR 3. PDB-Zugangscode: B10: 3LN9.PDB²⁹⁸.

zeigte, dass ein Großteil von R39 im Inneren der B10-Struktur liegt und mit mehreren Resten der CDR 3 polare Kontakte ausbildet. Daher ist zu vermuten, dass R39 die große Schleife der CDR 3 teilweise stabilisiert. Dieser Zusammenhang liefert eine Erklärung für den dramatischen Effekt der R39A-Mutation auf die Bindung von B10 an A β (1-40)-Fibrillen. Dagegen ist R61 frei an der Oberfläche exponiert und somit wahrscheinlich direkt an der Bindung von A β (1-40)-Fibrillen beteiligt. Zusammenfassend lassen diese Daten den Schluss zu, dass elektrostatische Interaktionen entscheidend für die Bindung von B10 an A β (1-40)-Fibrillen sind.

Um zu überprüfen, ob die Bindung von B10 an A β (1-40)-Fibrillen abhängig von elektrostatischen Interaktionen ist, wurde diese unter verschiedenen Pufferbedingungen mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie getestet. Dazu wurden verschiedene Additiva zu dem Laufpuffer gegeben und deren Effekte auf die Bindung analysiert (Abb. 3.9a). In Übereinstimmung zu den Daten der Mutagenese ist die Bindung von B10 an A β (1-40)-Fibrillen empfindlich gegenüber Störungen von elektrostatischen Wechselwirkungen. Bereits die Anwesenheit von 0,5 M NaCl führt zu einer beträchtlichen Reduktion der Bindung (Abb. 3.9a). Demgegenüber verursachen andere Additiva, wie 20 % Ethanol (Inhibition hydrophober Interaktionen) oder 2 M Harnstoff (Inhibition hydrophiler und hydrophober Interaktionen)³²⁰, deutlich schwächere Effekte (Abb. 3.9a). Diese Daten zeigen, dass elektrostatische Interaktionen entscheidend für die Bindung von B10 an A β (1-40)-Fibrillen sind. Weitere Unterstützung für diese Hypothese liefert eine sorgfältige Analyse der B10-Kristallstruktur. Die antigenbindende Region von B10 interagiert mit einigen negativ geladenen Bestandteilen des Kristallisationspuffers, den Citrat- und Sulfationen. In diesem Kontext binden die anionischen Moleküle durch Ausbildung polarer Kontakte an spezifische Reste der CDRs. In Übereinstimmung mit den Mutagenese-Daten ist der Rest R61 ebenfalls an der Bindung dieser Moleküle beteiligt.

Aus all diesen Daten lässt sich schließen, dass die Erkennung von A β (1-40)-Fibrillen durch B10 auf elektrostatischen Interaktionen beruht. Des Weiteren lässt sich schlussfolgern, dass die positiv geladenen CDR-Reste von B10 bevorzugt mit negativ geladenen Gruppen in A β (1-40)-Fibrillen interagieren.

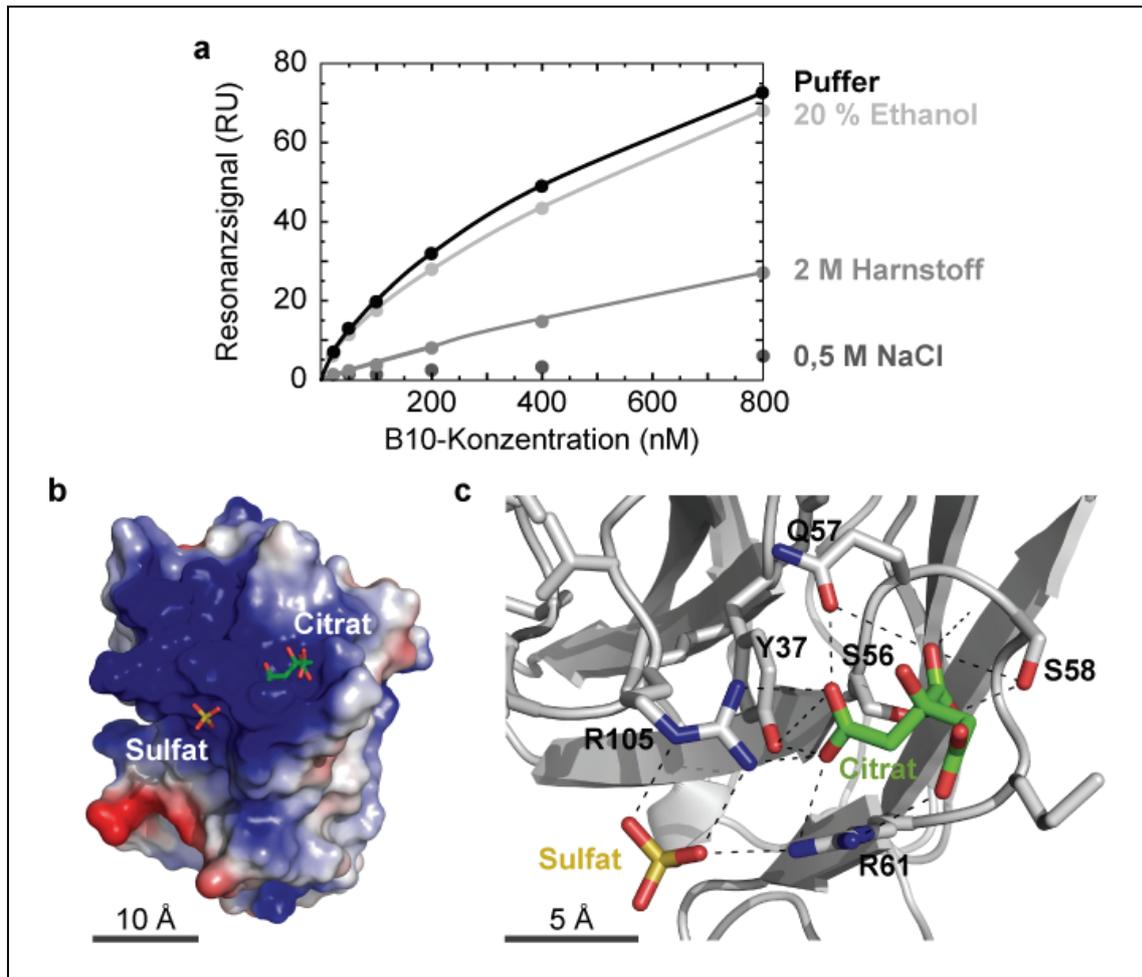


Abbildung 3.9. B10 bindet A β (1-40)-Fibrillen durch elektrostatische Interaktionen.

(a) Messung der Bindung von B10 an A β (1-40)-Fibrillen in Abhängigkeit von verschiedenen Pufferbedingungen mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie. Der Puffer wurde mit Endkonzentrationen von 20 % Ethanol, 2 M Harnstoff oder 0,5 M NaCl supplementiert. Die Daten der Bindung von B10 an A β (1-40)-Fibrillen im Fließgleichgewicht wurden mit einem *Steady State Affinity*-Modell angepasst. Aufgrund des geringfügigen Signals lieferte eine Anpassung für 0,5 M NaCl keine validen Ergebnisse. Die Messungen wurden von P. Hortschansky (HKI, Jena) durchgeführt. (b, c) Interaktion der negativ geladenen Citrat- und Sulfationen mit der antigenbindenden Region von B10 in globaler Ansicht als elektrostatische Oberfläche (b) oder in Nahansicht als Bändermodell (c). Die gestrichelten Linien zeigen polare Kontakte mit den angegebenen Resten der CDRs. PDB-Zugangscode: B10: 3LN9.PDB²⁹⁸.

3.2.3. Die Mutagenese von A β (1-40) führt zur Veränderung der Fibrillenstruktur

Um das B10-Epitop in A β (1-40)-Fibrillen weiter einzugrenzen, wurde eine ortsspezifische Mutagenese des A β (1-40)-Peptides durchgeführt. Zu diesem Zweck erfolgte jeweils der Austausch einer negativ geladenen Aminosäure gegen ein Alanin oder Glycin. Die Aufreinigung aller A β (1-40)-Varianten wurde nach identischer Strategie durchgeführt und mit SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert. Am Beispiel der D1G-Mutante soll die Aufreinigungsstrategie zusammengefasst werden (Abb. 3.10). Die A β (1-40)-Varianten wurden als Fusionsprotein mit dem Maltose-Bindeprotein und einem His-*tag* exprimiert. Des Weiteren enthält das Fusionsprotein eine Schnittstelle, die eine proteolytische Spaltung mit der Tabak-Ätzvirus-Protease ermöglicht. Der erste Schritt der Aufreinigung erfolgte mit einer Ni-Chelat-Chromatographie (Abb. 3.10a, b). Danach wurde das Fusionsprotein über Nacht proteolytisch gespalten (Abb. 3.10b) und die Spaltprodukte A β (1-40)-Peptid und Maltose-Bindeprotein-His-*tag* mit einer erneuten Ni-Chelat-Chromatographie voneinander getrennt (Abb. 3.10c, d). Abschließend erfolgte die Isolation des A β -Peptides mit einer Umkehrphase-Chromatographie (Abb. 3.10e, f) und die Überprüfung der Reinheit der D1G-Fractionen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Abb. 3.10f). In allen Fällen waren für die weiter verwendeten Fractionen keine sichtbaren Verunreinigungen durch andere Proteine nachweisbar. Das korrekte Molekulargewicht aller Varianten wurde massenspektrometrisch nachgewiesen.

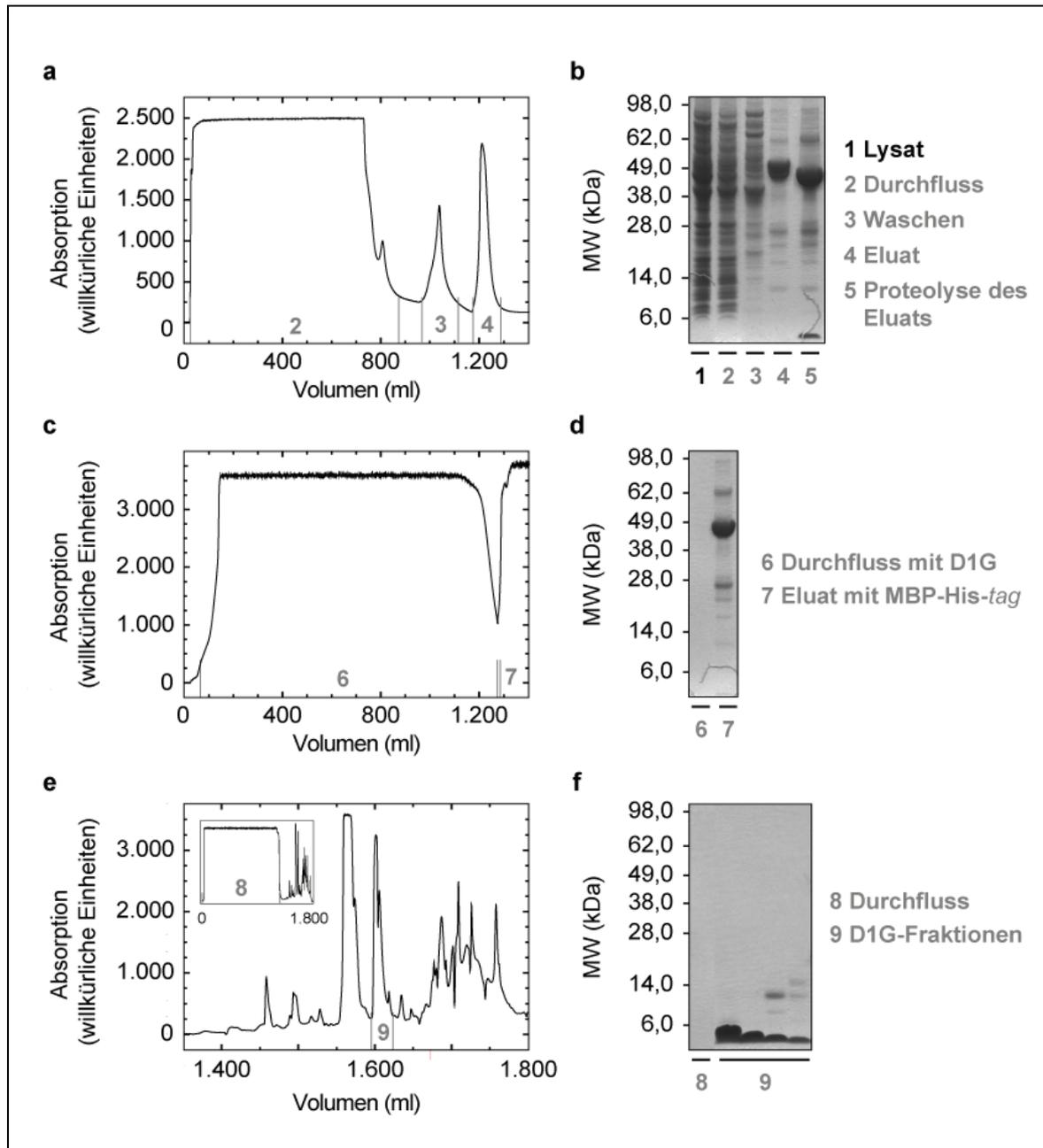


Abbildung 3.10. Aufreinigung der A β (1-40)-Mutante D1G.

Die Aufreinigung der A β (1-40)-Variante D1G erfolgte primär durch eine Ni-Chelat-Chromatographie (a, b). Nach proteolytischer Spaltung des Fusionsproteins (b) wurde das Peptid durch eine erneute Ni-Chelat-Chromatographie (c, d) und eine Umkehrphase-Chromatographie (e, f) isoliert. Die Coomassie-gefärbten SDS-Proteingele (b, d, f) dokumentieren den Verlauf der Reinigung. In (e) ist nur der relevante Ausschnitt des eingebetteten Umkehrphase-Chromatogramms dargestellt. MW: Molekulargewicht, MBP: Maltose-Bindeprotein.

Bis auf die Variante D23A, die als Peptid unlöslich ist³²¹, wurden aus den jeweiligen A β (1-40)-Varianten Fibrillen gebildet und diese mit verschiedenen Techniken analysiert. Die Fibrillen wurden zuerst mit B10AP im Spot-Blot getestet (Abb. 3.11a). Alle A β (1-40)-Varianten zeigten eine reduzierte Bindung von B10AP im Vergleich zu Wildtyp-Fibrillen auf, wobei eine Reduktion von maximal 50 % zu beobachten war (Abb. 3.11a). Diese Daten zeigen, dass der Austausch einer negativ geladenen Aminosäure in eine ungeladene Aminosäure nicht ausreicht, um die Bindung von B10 an A β (1-40)-Fibrillen komplett zu unterbinden. Eine weitere Analyse der Fibrillen deutete darauf hin, dass sich diese strukturell voneinander unterscheiden. Im TEM erscheinen die A β (1-40)-Varianten D1G, E3A, D7A und E11A als regelmäßige, gerade Fibrillen, während E22A eine unregelmäßige, kurze Struktur ähnlich der von Protofibrillen aufweist³²² (Abb. 3.11b). Des Weiteren zeigten Untersuchungen mit FTIR-Spektroskopie, dass die Fibrillen unterschiedliche Amid-I-Maxima aufweisen (Abb. 3.11c). Die Lage der Maxima, in der für Amyloidfibrillen charakteristischen Region zwischen 1611 cm⁻¹ bis 1630 cm⁻¹, weist auf einen grundsätzlich gleichen strukturellen Aufbau hin. Allerdings deutet die voneinander abweichende Lage der Maxima auf Unterschiede der fibrillären Feinstruktur hin. In Übereinstimmung dazu zeigte die Analyse mit ThT ebenso deutliche Unterschiede zwischen den Fibrillen (Abb. 3.18d). Diese Daten zeigen, dass die Mutagenese des A β (1-40)-Peptides zu einer signifikanten Veränderung der Fibrillenstruktur führt. Welche Auswirkungen diese Veränderungen auf die Bindung von B10AP haben, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht geklärt. Daher ist anhand dieser Daten keine eindeutige Schlussfolgerung über die von B10 erkannten Region in A β (1-40)-Fibrillen möglich.

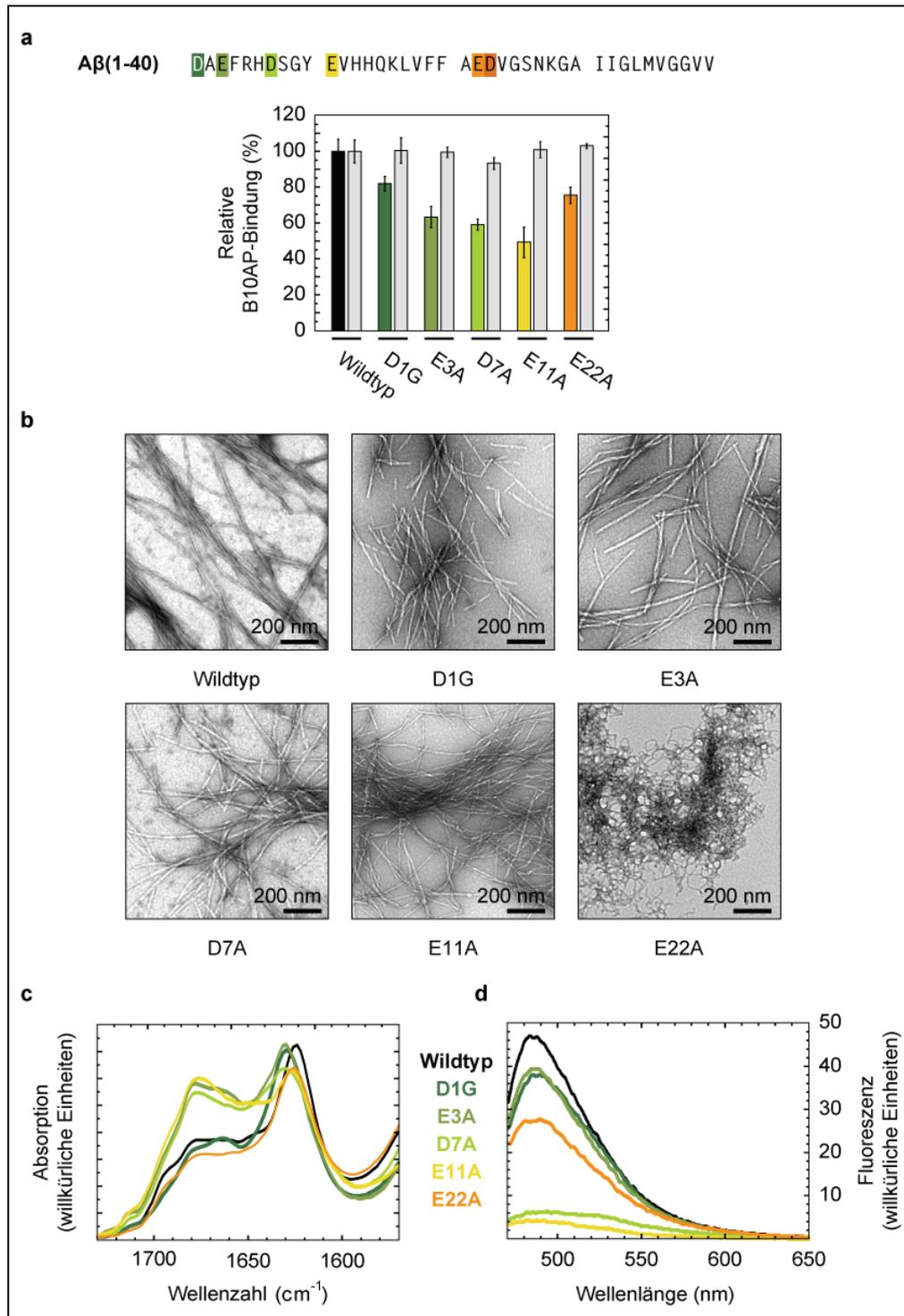


Abbildung 3.11. Lokalisierung der B10-Bindungsstelle an der $A\beta(1-40)$ -Fibrille.

(a) Oben: $A\beta(1-40)$ -Sequenz. Die negativ geladenen Aminosäuren sind farbkodiert dargestellt. Unten: Quantifizierte Spot-Blot-Färbung der aus den $A\beta$ -Varianten gebildeten Fibrillen mit B10AP. Eine gleiche Proteinbeladung der Membran wurde mit einer Ponceau S-Färbung nachgewiesen (grau). Als 100 % Referenz wurde das Signal von Wildtyp-Fibrillen definiert. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung ($n = 2-3$). Die Variante D23A ist unlöslich und konnte nicht untersucht werden. (b-d) Analyse der aus den $A\beta$ -Varianten gebildeten Amyloidfibrillen mit TEM (b), FTIR (c) und ThT (d).

3.2.4. Das B10-Epitop ist bei Amyloidfibrillen weit verbreitet, jedoch nicht generisch

Für einige fibrillenspezifische Antikörper wurde gezeigt, dass sie Amyloidfibrillen unabhängig von der Sequenz der zugrunde liegenden Polypeptidkette erkennen. Um zu überprüfen, ob das B10-Epitop ebenfalls bei verschiedenen Amyloidfibrillen auftritt, wurde die Bindung von B10AP an verschiedene Amyloidfibrillen analysiert. In diesem Zusammenhang lieferte eine Spot-Blot-Untersuchung von *ex vivo*-Amyloidfibrillen, die aus einem Gewebe einer diagnostizierten humanen AL-Amyloidose extrahiert wurden, erste Hinweise (Abb. 3.12). Deren Analyse zeigte, dass B10AP neben A β (1-40)-Fibrillen auch an AL-Amyloidfibrillen bindet (Abb. 3.12a). Um zu überprüfen, ob beide Amyloidfibrillen durch dieselbe Binderegion von B10 erkannt werden, wurde ein Konkurrenzexperiment durchgeführt (Abb. 3.12b). Dazu wurden AL-Amyloidfibrillen auf einer Membran immobilisiert. Gleichzeitig erfolgte eine Vorinkubation von B10AP mit verschiedenen Mengen an A β (1-40)-Fibrillen (Masseverhältnisse immobilisiertes AL:A β 1:0,5; 1:5; 1:10). Diese Lösung wurde anschließend mit der Membran inkubiert und die Färbung ausgewertet. Die Analyse zeigt, dass die Bindung von B10AP an AL-Amyloidfibrillen durch A β (1-40)-Fibrillen kompetitierbar ist (Abb. 3.12b). Dies deutet darauf hin, dass die getesteten Fibrillen durch dieselbe Binderegion von B10 erkannt

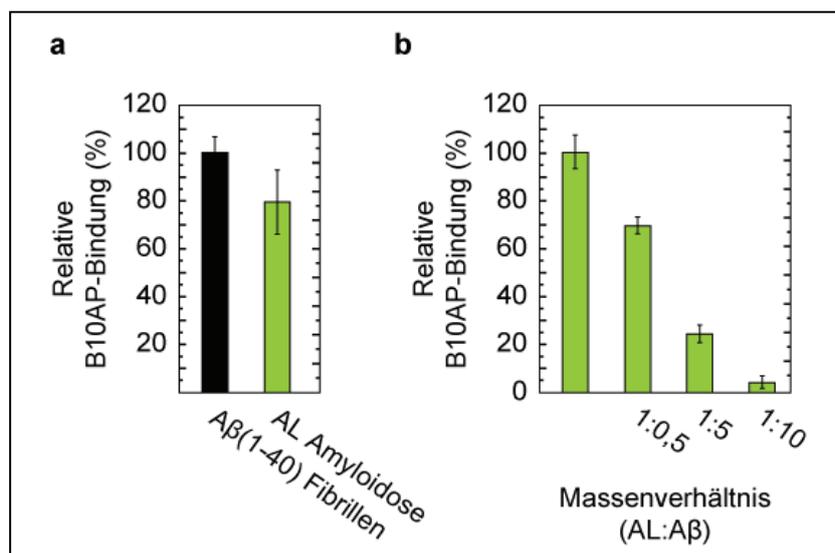


Abbildung 3.12. B10 erkennt verschiedene Amyloidfibrillen durch dieselbe Binderegion.

(a) Quantifizierte Spot-Blot-Färbung von *ex vivo*-AL-Amyloidfibrillen mit B10AP. Als 100 % Referenz wurde das Signal von A β (1-40)-Fibrillen definiert. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung (n = 6). (b) Quantifizierte Spot-Blot-Färbung von *ex vivo*-AL-Fibrillen mit B10AP nach Vorinkubation von B10AP mit A β (1-40)-Fibrillen (Masseverhältnisse AL:A β 1:0,5; 1:5; 1:10). Als 100 % Referenz wurde das Signal der AL-Fibrillen ohne Vorinkubation von B10AP mit A β (1-40)-Fibrillen definiert. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung (n = 6).

werden. Zusammenfassend lässt sich aus diesen Daten schließen, dass B10 ein Epitop erkennt, welches in verschiedenen Amyloidfibrillen vorkommt. Des Weiteren lässt sich im Zusammenhang mit der B10-Bindung von sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* gebildeten A β (1-40)-Fibrillen schließen (Abb. 1.26), dass diese die gleiche Oberflächenstruktur aufweisen.

Aufgrund der Bindung von B10 an AL-Amyloidfibrillen wurde mittels Spot-Blot eine systematische Untersuchung der Bindung von B10AP an verschiedenste *in vitro* gebildete Amyloidfibrillen durchgeführt. Die Vorläuferproteine der zugrunde liegenden Polypeptidketten zeigen zueinander und zum A β -Vorläufer keinerlei Sequenzhomologien. Die verwendeten Polypeptidketten wurden rekombinant oder synthetisch hergestellt und unter spezifischen Bedingungen inkubiert (für Details siehe Anhang Kap. 8.2). Alle untersuchten Fibrillen weisen entsprechend der Analyse mit TEM, Röntgenbeugung, KR oder anderen Techniken typische Charakteristika von Amyloidfibrillen auf (Anhang Kap. 8.2). Demzufolge besitzen alle getesteten Fibrillen grundsätzlich die gleiche Struktur. Darüber hinaus umfassen die untersuchten Amyloidfibrillen ein breites Spektrum an detaillierten strukturellen Eigenschaften (Tab. 3.1, Abb. 3.13, für weitere Details siehe Anhang Kap. 8.2), wie die Länge oder Sequenz der Polypeptidkette (Volllänge oder Peptidfragment), die Anzahl an negativ geladenen Aminosäuren der Polypeptidkette, die fibrilläre Struktur (gebogene, unregelmäßige oder gerade, regelmäßige Fibrillen), die Händigkeit der Fibrillenwindung (linkshändig oder rechtshändig), die Chiralität des Polypeptid-Rückgrates (Polypeptidketten ausschließlich aus D- oder L-Aminosäuren) oder das Vorhandensein von parallelen oder antiparallelen β -Faltblättern.

Tabelle 3.1. Übersicht der strukturellen Eigenschaften der untersuchten *in vitro*-Amyloidfibrillen.

Fehlende Informationen zu den Eigenschaften, der unter den verwendeten Inkubationsbedingungen entstandenen Fibrillen, sind mit einem Fragezeichen gekennzeichnet. Weitere Eigenschaften der Fibrillen sind im Anhang (Kap. 8.2) aufgelistet. AS: Aminosäuren.

Polypeptidkette	Länge der Polypeptidkette	fibrilläre Struktur im TEM	Anzahl an AS je Polypeptidkette (negative / gesamt)	Helizität der Fibrille	Aminosäure-Chiralität	β -Faltblatt-Organisation
A β (1-40) pH 9	Volllänge	gerade, lang	6 / 40	links	L	?
A β (1-40) pH 7,4	Volllänge	gerade, lang	6 / 40	?	L	parallel ¹⁰⁰
A β (1-42)	Volllänge	gerade, lang	6 / 42	links	L	?
hSAA(1-12)	Fragment	gerade, lang	2 / 12	rechts	L	?
hSAA(1-12)	Fragment	gerade, lang	2 / 12	links	D	?
Insulin	Volllänge	gerade, lang	4 / 51	?	L	?
G-Helix	Fragment	gerade, lang	1 / 18	?	L	?
hSAA	Volllänge	gebogen, kurz	16 / 104	?	L	?
mSAA	Volllänge	gebogen, kurz	16 / 103	?	L	?
Glucagon	Volllänge	gerade, lang	3 / 29	?	L	?
HET-s(218-289) pH 3	Fragment	gerade, lang	9 / 79	?	L	?
HET-s(218-289) pH 7,5	Fragment	gerade, lang	9 / 79	?	L	parallel, β -Helix ¹¹²
A β (16-22)	Fragment	gerade, lang	1 / 7	?	L	antiparallel ¹²¹
A β (11-25)	Fragment	gerade, lang	3 / 15	?	L	antiparallel ⁹⁸
hSAA(2-21)	Fragment	gerade, kurz	3 / 20	links	L	?
TTR	Volllänge	gebogen, kurz	17 / 127	?	L	?
Apomyoglobin	Volllänge	gebogen, kurz	21 / 153	?	L	?
PABN1-(+7)Ala	Volllänge	gerade, lang	28 / 152	?	L	antiparallel ³²³

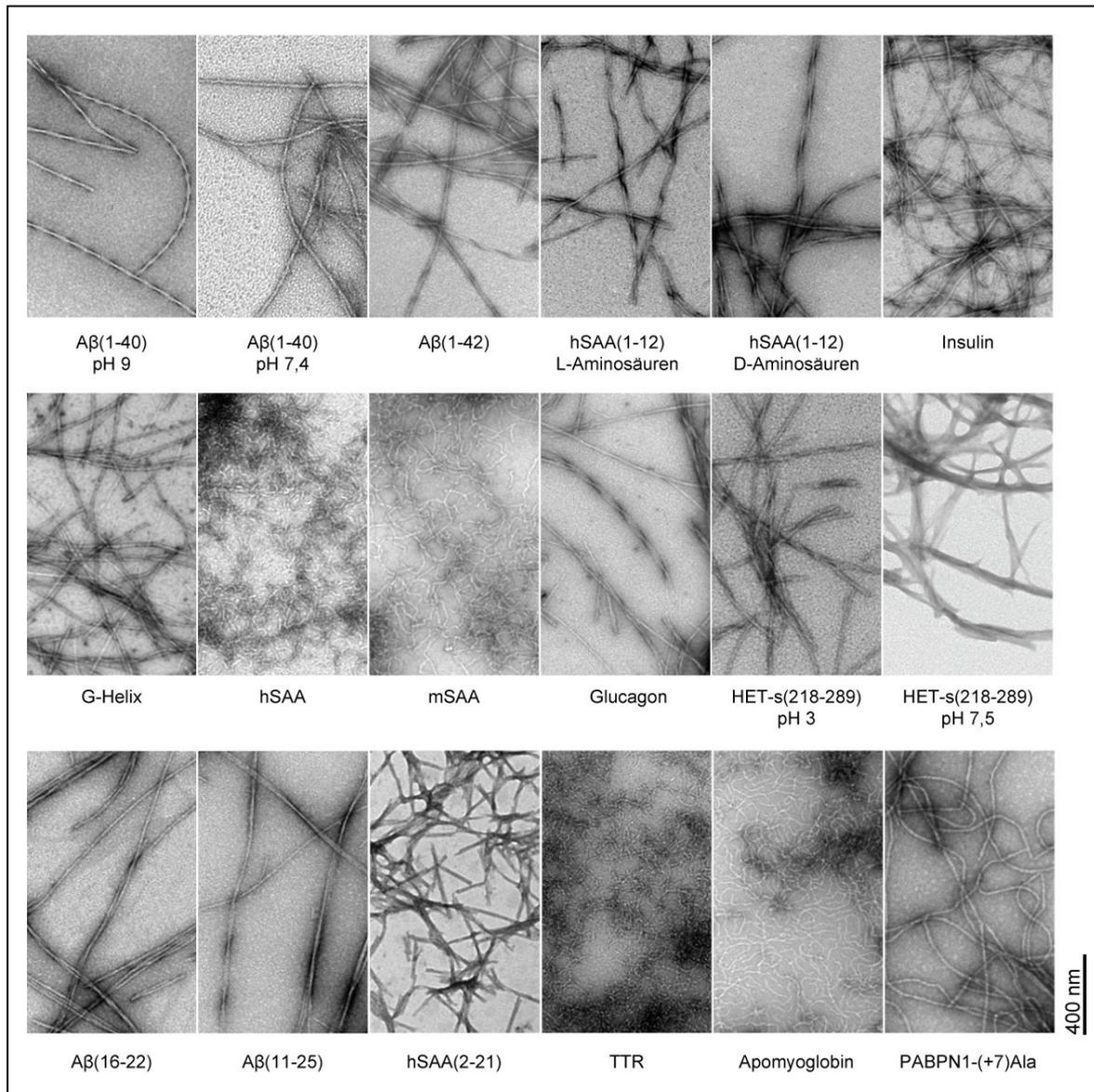


Abbildung 3.13. TEM-Analyse der untersuchten *in vitro*-Amyloidfibrillen.

Negativkontrast-TEM-Bilder zeigen die Diversität der fibrillären Struktur der untersuchten *in vitro*-Amyloidfibrillen.

Die Analyse der B10AP-Bindung zeigte eine signifikante Interaktion mit den meisten der getesteten Fibrillen (Abb. 3.14a). Dazu gehören zum Beispiel A β (1-42)-, Insulin-, G-Helix- oder hSAA-Fibrillen. Allerdings interagieren einige Amyloidfibrillen, wie Apomyoglobin-, TTR-, A β (11-25)- oder hSAA(2-21)-Fibrillen, nicht mit B10AP. Diese Daten zeigen, dass das B10-Epitop bei vielen, jedoch nicht bei allen Amyloidfibrillen vorkommt. In weiteren Untersuchungen konnten die Spot-Blot-Daten in der Arbeitsgruppe bestätigt werden, indem einige Fibrillen mit Immunogold-markiertem B10AP inkubiert und danach mit TEM untersucht wurden (Abb. 3.14b). Die Analyse zeigte, dass B10AP an alle als B10-positiv klassifizierten Fibrillen aus der Spot-Blot-Analyse bindet, wie beispielsweise A β (1-40)-Fibrillen. Des Weiteren konnte keine

Bindung an alle als B10-negativ klassifizierten Fibrillen aus der Spot-Blot-Analyse nachgewiesen werden, wie beispielsweise Apomyoglobin-Fibrillen. Ferner bestätigte eine Kontrolle, dass B10AP in einer Mischung aus A β (1-40)- und Apomyoglobin-Fibrillen spezifisch an A β (1-40)-Fibrillen bindet (Abb. 3.14b). Alle diese Daten lassen den Schluss zu, dass B10 ein Epitop erkennt, welches weit verbreitet, jedoch nicht generisch für Amyloidfibrillen ist. Außerdem erkennt B10 keine generische Konformation des Polypeptid-Rückgrates in Amyloidfibrillen. Diese Schlussfolgerung wird zusätzlich durch die Bindung von Fibrillen des hSAA(1-12)-Peptides aus D-Aminosäuren oder L-Aminosäuren unterstützt. Demzufolge ist die Bindung von B10 unabhängig von der Chiralität des zugrunde liegenden Polypeptid-Rückgrates. Im Zusammenhang mit der fehlenden Interaktion von B10 mit intrinsisch ungefalteten und globulär gefalteten Polypeptidketten (Kap. 3.1.2) lassen diese Daten den Schluss zu, dass B10 ein Epitop erkennt, welches spezifisch für verschiedene Amyloidfibrillen ist.

Als nächstes analysierten wir die spezifischen Eigenschaften der B10-positiven und B10-negativen Fibrillen. Alle untersuchten Fibrillen bestehen aus Polypeptidketten, die mindestens eine negativ geladene Aminosäure enthalten (Tab. 3.1). In diesem Kontext stellten wir fest, dass die B10-positiven G-Helix-Fibrillen lediglich eine negativ geladene Aminosäure pro Polypeptidkette enthalten. Daraus lässt sich schließen, dass eine negativ geladene chemische Gruppe je Polypeptidkette ausreicht, um ein B10-Epitop in Amyloidfibrillen zu bilden. Des Weiteren umfassen die B10-positiven Fibrillen so gut wie alle untersuchten strukturellen Eigenschaften. Weder die Länge der Polypeptidkette oder die fibrilläre Struktur, noch die Händigkeit der Fibrillenwindung oder die Chiralität des Polypeptid-Rückgrates können die Bindung von B10 an spezifische Fibrillen erklären. Allerdings ist es möglich, dass B10 bevorzugt mit Fibrillen interagiert, die aus parallelen β -Faltblättern aufgebaut sind. So interagiert B10 mit HET-s(218-289)-Fibrillen (pH 7,5), welche aus parallelen β -Faltblättern bestehen¹¹². Dagegen sind mit A β (11-25)- und A β (16-22)-Fibrillen, welche vermutlich aus antiparallelen β -Faltblättern bestehen^{98,121}, keine Interaktionen nachweisbar. In diesem Kontext lässt jedoch vor allem der Mangel an strukturellen Informationen über die meisten untersuchten Amyloidfibrillen keine endgültige Schlussfolgerung über die strukturellen Unterschiede der von B10 gebundenen Fibrillen zu.

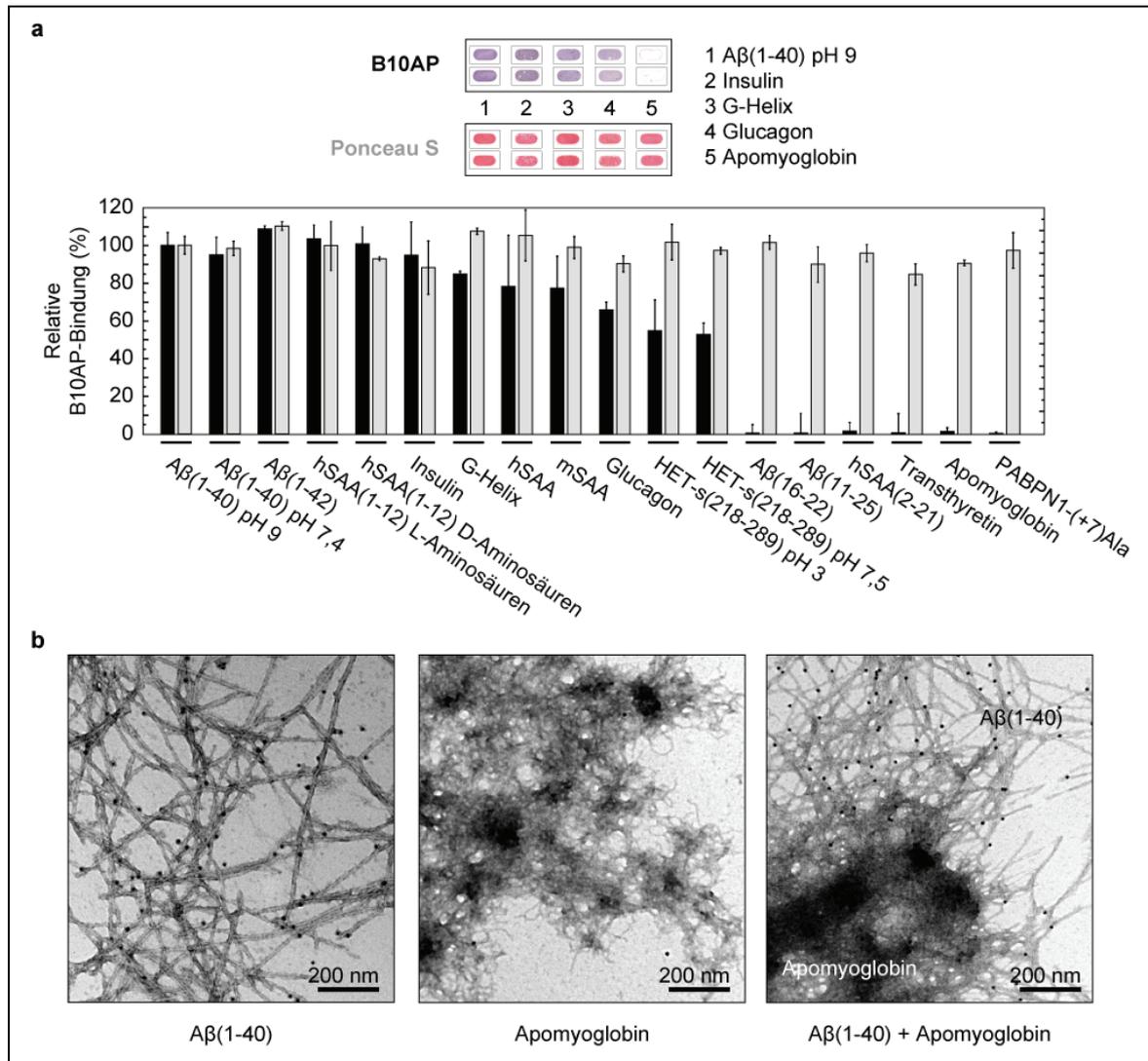


Abbildung 3.14. Das B10-Epitop ist bei Amyloidfibrillen weit verbreitet, jedoch nicht generisch.

(a) Spot-Blot-Färbung in Duplikaten (oben) und deren Quantifizierung (unten) von verschiedenen Fibrillen mit B10AP (schwarz) und Ponceau S (Proteinbeladung, grau). Als 100 % Referenz wurde das Signal von Aβ(1-40)-Fibrillen definiert. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung (n = 2-3). (b) Immunogold-Färbung der B10-positiven Aβ(1-40)-Fibrillen (links), der B10-negativen Apomyoglobin-Fibrillen (Mitte) und einer Mischung aus beiden Fibrillen (rechts). Das Experiment in (b) wurde von S. T. Kumar (MPF, Halle (Saale)) durchgeführt.

3.2.5. Das B10-Epitop stellt eine hoch regelmäßige und anionische Oberflächenstruktur dar

Die bisherigen Daten ließen darauf schließen, dass B10 ein Epitop erkennt, das spezifisch in verschiedenen Amyloidfibrillen vorhanden ist, aber nicht in intrinsisch ungefalteten oder globulär gefalteten Polypeptidketten vorkommt. Im Zusammenhang mit der fehlenden Interaktion von B10 mit den untersuchten globulär gefalteten Polypeptidketten, waren insbesondere die Interaktionen mit HET-s(218-289)-Fibrillen interessant. Die B10-positiven HET-s(218-289)-Fibrillen (pH 7,5) entsprechen in ihrer Grundstruktur und Geometrie den als B10-negativ getesteten globulären β -Helix-Proteinen P22 Tailspike-Protein und Pektat-Lyase Pel-15 (Kap. 3.1.2). Im Unterschied zu HET-s(218-289)-Fibrillen (pH 7,5) weisen die β -Helices dieser globulär gefalteten Polypeptidketten keine periodische Abfolge von Aminosäuren entlang der Längsachse der β -Helix auf¹¹². Des Weiteren deuteten die bisherigen Daten darauf hin, dass B10 seine Liganden über elektrostatische Interaktionen erkennt, wobei die stark positiv geladene Binderegion von B10 vermutlich mit negativ geladenen Gruppen der Liganden interagiert. Aufgrund dieser Zusammenhänge analysierten wir die Ladungsoberfläche von B10-positiven Amyloidfibrillen und globulär gefalteten Polypeptidketten auf Besonderheiten.

Die globulär gefalteten Polypeptidketten weisen eine unregelmäßige Anordnung von geladenen und ungeladenen chemischen Gruppen auf, die eine ungeordnete und gefurchte Oberfläche erzeugen (Abb. 3.15). Dagegen weisen die strukturell hoch geordneten Amyloidfibrillen eine sehr regelmäßige und relativ flache Oberfläche auf (Abb. 3.15). Die Struktur von HET-s(218-289)-Fibrillen (pH 7,5)¹¹² zeigt ein regelmäßiges Ladungsmuster mit einer räumlich dichten Abfolge von negativen Ladungen entlang der Fibrillenlängsachse. In Übereinstimmung dazu zeigt die Oberflächendarstellung eines Strukturmodells von A β (1-42)-Fibrillen¹⁰⁴ ebenfalls eine regelmäßige Anordnung von negativen Ladungen. Amyloidfibrillen präsentieren somit, im Gegensatz zu globulär gefalteten Polypeptidketten, eine relativ flache Oberfläche mit einem hoch regelmäßigen und sich wiederholenden Muster an geladenen und ungeladenen chemischen Gruppen. Des Weiteren lässt sich schließen, dass sich die Oberflächen von B10-positiven Amyloidfibrillen durch ein hoch regelmäßiges anionisches Muster entlang der Fibrillenlängsachse auszeichnen, welches durch B10 erkannt wird. Im Zusammenhang mit der Bindung von G-Helix-Fibrillen (Abb. 3.14) lässt sich schlussfolgern, dass bereits eine negativ geladene Aminosäure pro Polypeptidkette ausreicht, um dieser Muster zu bilden.

Darüber hinaus deutet die flache Beschaffenheit der Oberfläche von Amyloidfibrillen darauf hin, dass sie eine optimale Antigenoberfläche zu der flachen Binderegion von B10 darstellt (Kap. 3.2.1).

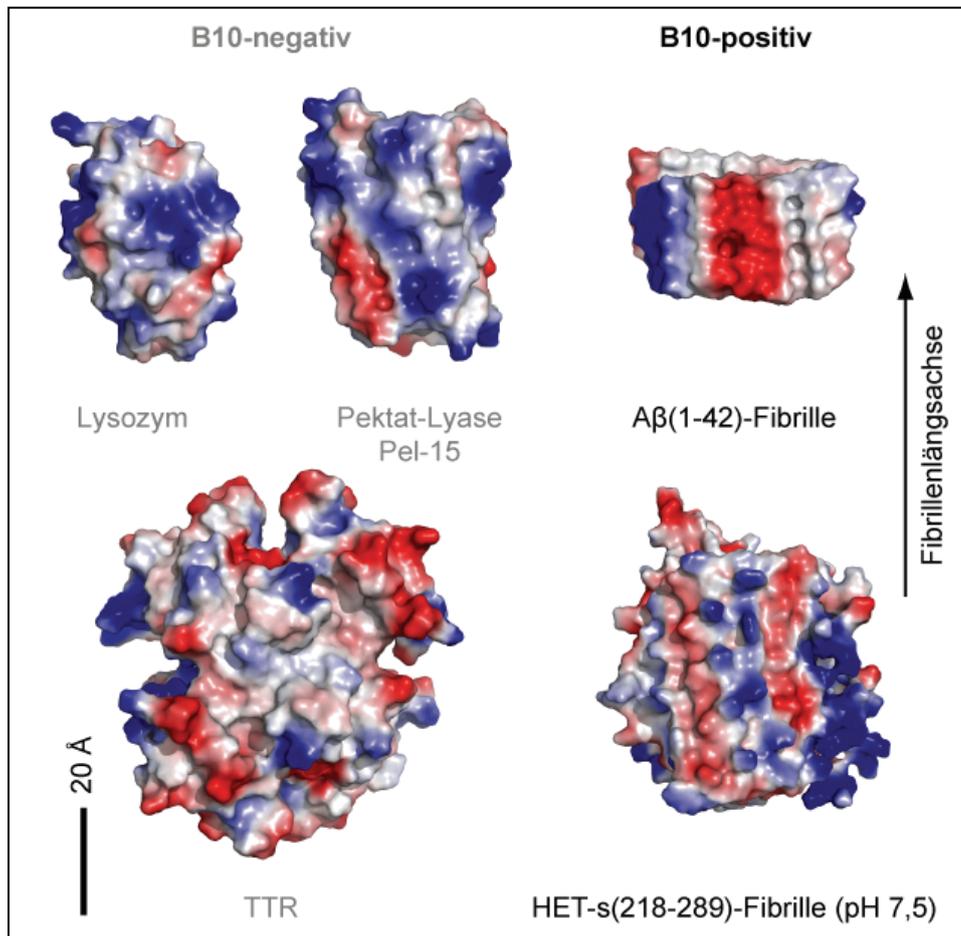


Abbildung 3.15. Vergleich der Ladungsoberfläche von globulär gefalteten Polypeptidketten und B10-positiven Amyloidfibrillen.

Darstellung des elektrostatischen Oberflächenpotentials von B10 negativen, globulär gefalteten Polypeptidketten oder B10-positiven Amyloidfibrillen. Die globulär gefalteten Polypeptidketten weisen eine unregelmäßige Anordnung der Oberflächenladungen auf. Dagegen präsentieren die A β (1-42)- und HET-s(218-289)-Fibrillen (pH 7,5) ein hochgeordnetes, regelmäßiges Muster an negativen Ladungen auf der Oberfläche. Rot: negative Ladung, blau: positive Ladung. PDB-Zugangscode: Lysozym: 4LZT.PDB³⁰³, TTR: 1RLB.PDB⁹³, Pektat-Lyase Pel-15: 1EE6.PDB¹¹⁹, HET-s(218-289)-Fibrille (pH 7,5): 2RNM.PDB¹¹², A β (1-42)-Fibrille: 2BEG.PDB¹⁰⁴.

Aufgrund der letztgenannten Daten mutmaßten wir, dass B10 hoch regelmäßige und anionische Oberflächenstrukturen in seinen Liganden erkennt. Diese Annahme impliziert, dass B10 verschiedene Moleküle, unabhängig von der zugrunde liegenden Stoffklasse erkennt. Um diese Hypothese zu testen, untersuchten wir nicht-proteinöse Biopolymere, welche eine hoch regelmäßige Struktur und anionische Eigenschaften aufweisen, wie beispielsweise Heparin³²⁴ und DNS³²⁵. Zu diesem Zweck wurde die

Interaktion von B10AP mit Heparin chromatographisch untersucht und mit einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert (Abb. 3.16a). Da Heparin sowohl Affinitäts- als auch Kationentauscher-Eigenschaften aufweist, erfolgte die Untersuchung unter Anionenaustauscher-Bedingungen, um eine unspezifische Bindung von B10AP an Heparin zu verhindern. Die Auswertung der SDS-PAGE zeigte, dass B10AP mit Heparin interagiert (Abb. 3.16a). Zusätzlich konnte die Bindung von B10 an Heparin durch Zugabe von 0,5 M NaCl inhibiert werden (Abb. 3.16a). Daraus lässt sich schließen, dass B10 durch elektrostatische Interaktionen an Heparin bindet. Um das Resultat der Heparin-Chromatographie zu verifizieren, wurde die Interaktion von B10AP und Heparin mit isothermaler Titrationskalorimetrie untersucht (Abb. 3.16b). Bei der Zugabe von Heparin zu B10AP konnte eine deutliche Wärmedifferenz beobachtet werden, welche eine Interaktion beider Moleküle widerspiegelt. Somit lässt sich schlussfolgern, dass B10 und Heparin miteinander interagieren.

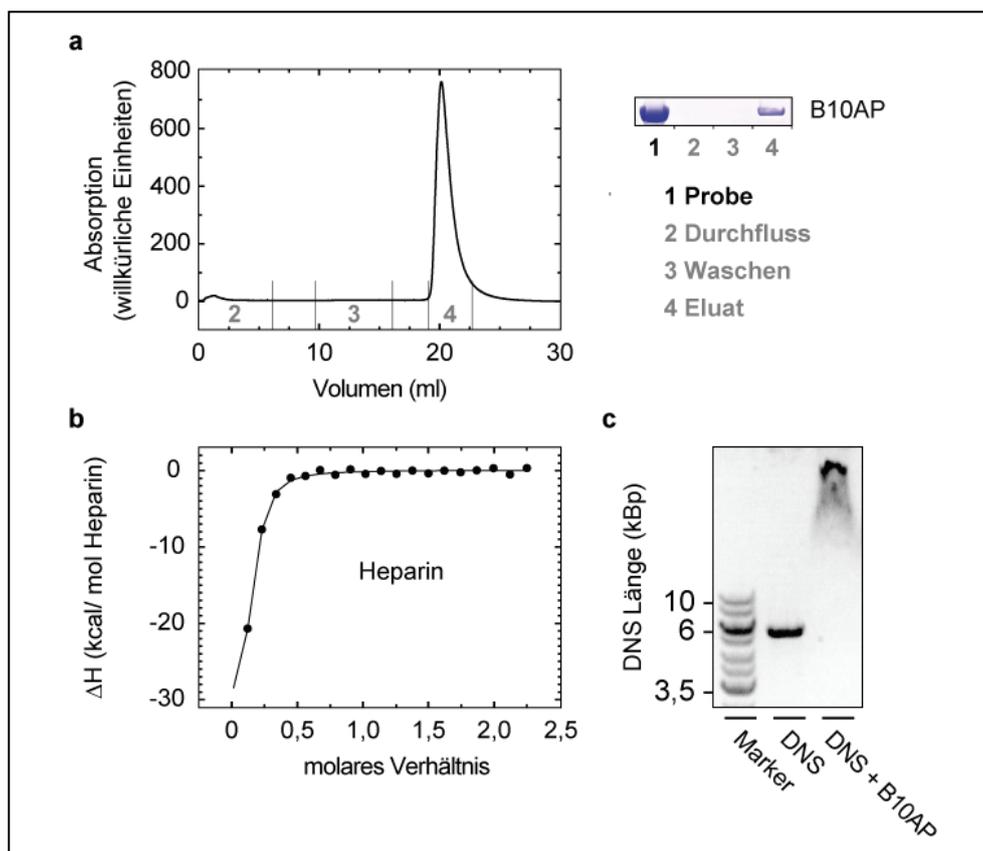


Abbildung 3.16. Interaktion von B10 mit Heparin und DNS.

(a) Nachweis der Interaktion von B10 mit Heparin durch Heparin-Chromatographie von B10AP. Das Coomassiegefärbte SDS-Gel zeigt den Verlauf der Chromatographie. Die Elution erfolgte durch Zugabe von 0,5 M NaCl. (b) Isothermale Titrationskalorimetrie zeigt die Interaktion von B10AP mit Heparin. Dargestellt ist die Enthalpieänderung ΔH gegen das molare Verhältnis von Heparin zu B10AP. (c) Eine Agarose-Gelelektrophorese nach Inkubation von B10AP mit linearisierter Plasmid-DNS (5,6 kBp) zeigt die Bindung von B10 an DNS.

In einem weiteren Experiment wurde die Bindung von B10 an DNS getestet (Abb. 3.16c). Dazu wurde eine linearisierte Plasmid-DNS mit B10AP inkubiert und anschließend mit einer Agarose-Gelelektrophorese untersucht. Die Analyse zeigt, dass die Gegenwart von B10AP zu einer deutlichen Bandenverschiebung der DNS führt (Abb. 3.16c). Daraus lässt sich schließen, dass B10AP an DNS bindet und dadurch eine Veränderung des Laufverhaltens verursacht. Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass B10 neben Amyloidfibrillen, auch an nicht-proteinöse, hoch regelmäßig organisierte, anionische Polymere, wie DNS und Heparin, bindet. Des Weiteren lässt sich schließen, dass B10 ein Epitop erkennt, welches eine hoch regelmäßige und anionische Oberflächenstruktur seiner Liganden darstellt. Ferner spiegeln die polyanionischen Eigenschaften von DNS und Heparin die Relevanz elektrostatischer Wechselwirkungen für die Bindung von B10 wider.

3.2.6. B10 zeigt signifikante Übereinstimmungen zu einem Mustererkennungsrezeptor

Eine Analyse der bisher gewonnenen Daten zu den Bindungseigenschaften von B10 offenbart signifikante Übereinstimmungen mit einem spezifischen Mustererkennungsrezeptor, der RAGE genannt wird²¹³. Mustererkennungsrezeptoren wurden ursprünglich als eine Gruppe von spezialisierten Zelloberflächen-Rezeptoren des angeborenen Immunsystems definiert²¹¹. Diese Rezeptoren zeichnen sich durch die Bindung von strukturell diversen Liganden aus, wodurch diese auch als Multiliganden-Rezeptoren²¹² bezeichnet werden. Diesbezüglich ist die Erkennung von Liganden von einer spezifischen räumlichen Anordnung chemischer Gruppen und nicht von der bloßen Präsenz einer Polypeptidsequenz oder einer chemischen Gruppe abhängig³²⁶.

In Übereinstimmung zu B10 zeichnet sich RAGE durch eine Multiliganden-Bindung aus²¹³. RAGE erkennt verschiedene Amyloidfibrillen und ist in einigen Amyloidosen involviert^{254,255}. Als weitere RAGE-Liganden sind Heparin²⁵² und DNS²⁵³ bekannt. Die Erkennung von Liganden durch RAGE geschieht hauptsächlich durch die apikale V-Domäne und ist von elektrostatischen Interaktionen abhängig^{256,257}. Diesbezüglich ist die Antigen-Bindungsstelle von RAGE mit basischen Aminosäuren angereichert^{256,257}. Ein Vergleich der Bindungsregionen von B10 und der V-Domäne zeigt in beiden Fällen ein stark positiv geladenes Oberflächenpotential (Abb. 3.17). Diese auffallenden Übereinstimmungen zwischen RAGE und B10 führten zu der Vermutung, dass beide Moleküle ähnliche Eigenschaften der Oberfläche von Fibrillen erkennen.

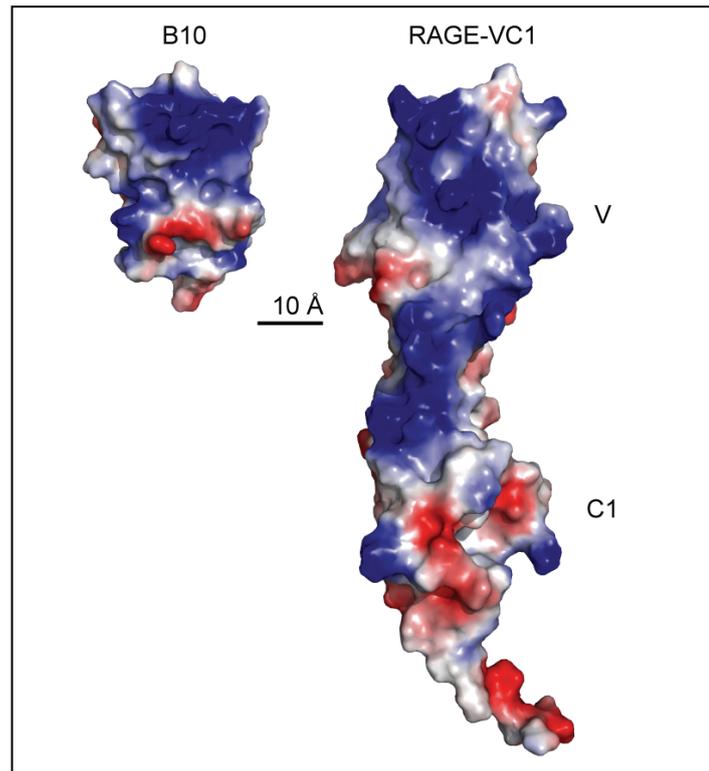


Abbildung 3.17. Vergleich des elektrostatischen Oberflächenpotentials von B10 und RAGE.

Darstellung der Ladungsoberfläche von B10 (links, 3LN9.PDB²⁹⁸) und des für die Ligandenbindung verantwortlichen VC1-Fragments von RAGE (rechts, 3CJJ.PDB²⁵⁷). Rot: negative Ladung, blau: positive Ladung.

Um die Gemeinsamkeiten von RAGE und B10 zu testen, wurde das VC1-Fragment von RAGE (zur Verfügung gestellt von G. Fritz, Freiburg) vergleichend zu B10 mit verschiedenen Techniken untersucht. Eine Analyse der Interaktion von VC1 mit A β (1-40)-Konformeren mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie zeigte, dass VC1 an A β (1-40)-Fibrillen bindet, während mit disaggregiertem A β (1-40)-Peptid keine signifikanten Interaktionen nachweisbar waren (Abb. 3.18a). Die Auswertung der Bindung mit einem *Steady State Affinity*-Modell ergab einen K_D -Wert von 41,3 nM (Abb. 3.18b). Dieses Resultat zeigt, dass RAGE und B10 eine übereinstimmende konformationelle Spezifität für A β (1-40)-Fibrillen aufweisen. Aufgrund dessen ergab sich die Fragestellung, ob B10 und VC1 an die gleiche Region von A β (1-40)-Fibrillen binden. Um dies zu untersuchen, wurde ein Konkurrenzexperiment zwischen B10AP und VC1, oder als Kontrolle zwischen B10AP und B10, durchgeführt (Abb. 3.18c). Zu diesem Zweck wurden A β (1-40)-Fibrillen mit verschiedenen Konzentrationen an B10AP vorinkubiert (molares Verhältnis von B10AP:VC1 oder B10AP:B10 von 1:1 oder 8:1) (Abb. 3.18c). Daran anschließend wurde eine konstante Menge VC1 oder B10 zu der vorinkubierten Probe gegeben. Die Bindung von VC1 oder B10 an die Fibrillen wurde mit einer

Ultrazentrifugation und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese untersucht. Die Analyse der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach der Zentrifugation zeigte, dass B10 und VC1 in Abwesenheit von B10AP komplett an die Fibrillen bindet und im Pellet erscheint (Abb. 3.18c). Dagegen führt die Zugabe von B10AP zu einer konzentrationsabhängigen Konkurrenz der Bindung von VC1 und B10 an $A\beta(1-40)$ -Fibrillen, wodurch signifikante Mengen an B10 und VC1 im Überstand zu finden sind (Abb. 3.18c). Diese Daten lassen darauf schließen, dass B10 und VC1 an die gleiche Region von $A\beta(1-40)$ -Fibrillen binden.

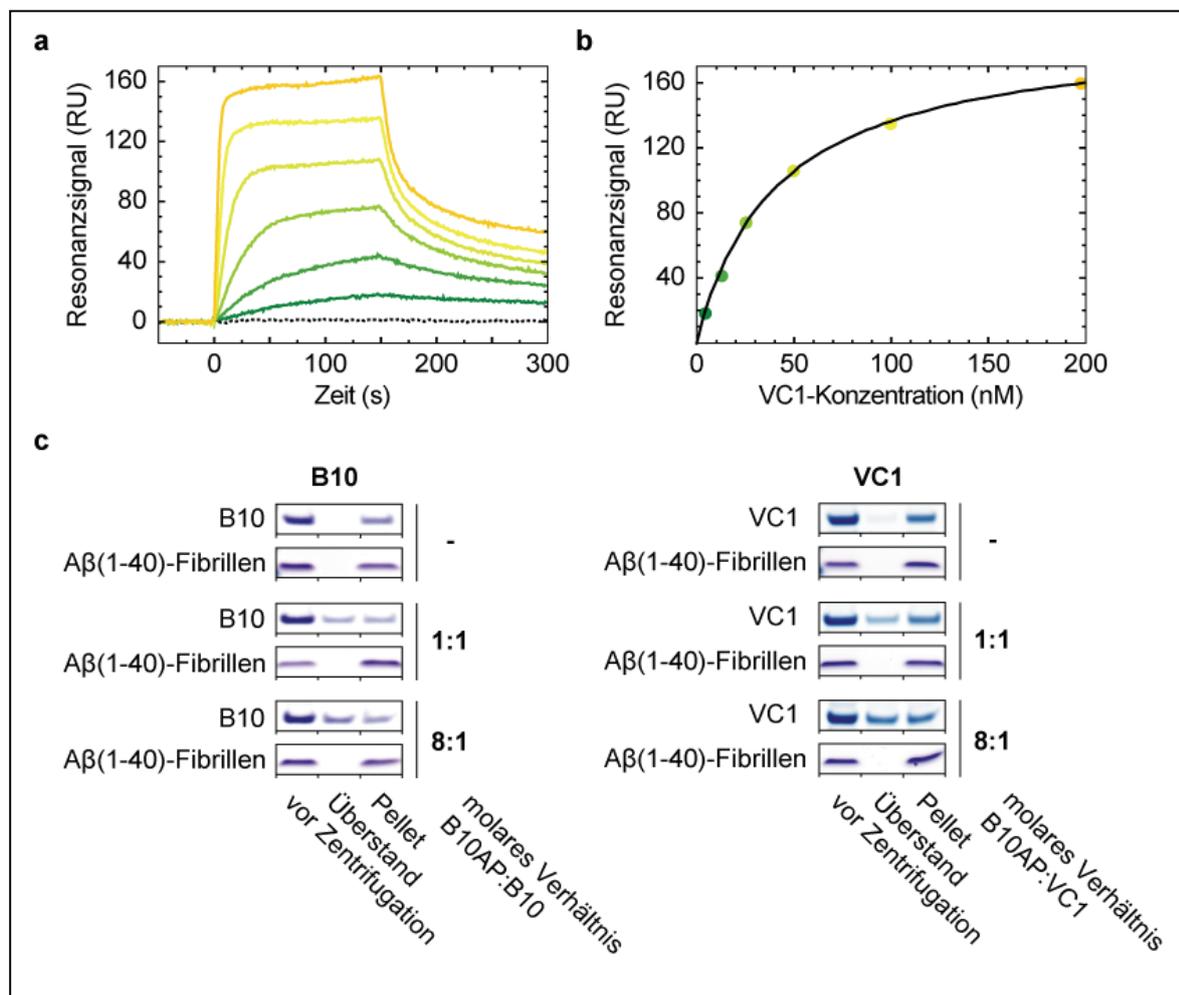


Abbildung 3.18. Vergleich der Bindungscharakteristika von B10 und RAGE.

(a) Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Sensorgramm der Interaktion von VC1 mit disaggregiertem $A\beta(1-40)$ -Peptid (gepunktete Linie) oder $A\beta(1-40)$ -Fibrillen (durchgezogene Linien). Die Farben kennzeichnen die VC1-Konzentration in der mobilen Phase von 6,25 nM (dunkelgrün) bis 200 nM (orange) oder 100 nM (schwarz). Das Experiment wurde von P. Hortschansky (HKI, Jena) durchgeführt. (b) Basierend auf der Bindung von VC1 an $A\beta(1-40)$ -Fibrillen im Fließgleichgewicht wurde der K_D -Wert mit einem *Steady State Affinity*-Modell ermittelt. (c) Konkurrenz der Bindung von B10 oder VC1 an $A\beta(1-40)$ -Fibrillen durch Vorinkubation der Fibrillen mit verschiedenen Mengen an B10AP (molares Verhältnis von B10AP:VC1 oder B10AP:B10 von 1:1 oder 8:1). Nach Zugabe von VC1 oder B10 wurden die Proben zentrifugiert und mit einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert.

Als nächstes untersuchten wir, ob B10 und RAGE ähnliche Ligandenspezifitäten in Bezug auf Amyloidfibrillen aufweisen. Dazu wurde die Bindung von VC1 an die bereits mit B10 getesteten Amyloidfibrillen mit einem Spot-Blot untersucht (Abb. 3.19). Die Analyse zeigte, dass VC1 tatsächlich an alle als B10-positiv getesteten Fibrillen bindet, während die meisten B10-negativen Fibrillen nicht von VC1 erkannt werden (Abb. 3.19). Allerdings unterscheiden sich VC1 und B10 in der Spezifität, denn VC1 bindet A β (11-25)- und A β (16-22)-Fibrillen, die keine signifikante Interaktion mit B10 zeigten. Daraus lässt sich schließen, dass B10 und RAGE geringfügige Unterschiede in der strukturellen Spezifität aufweisen. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass B10 und der Mustererkennungsrezeptor RAGE ähnliche strukturelle Eigenschaften von Liganden erkennen und somit enge funktionelle Gemeinsamkeiten aufweisen.

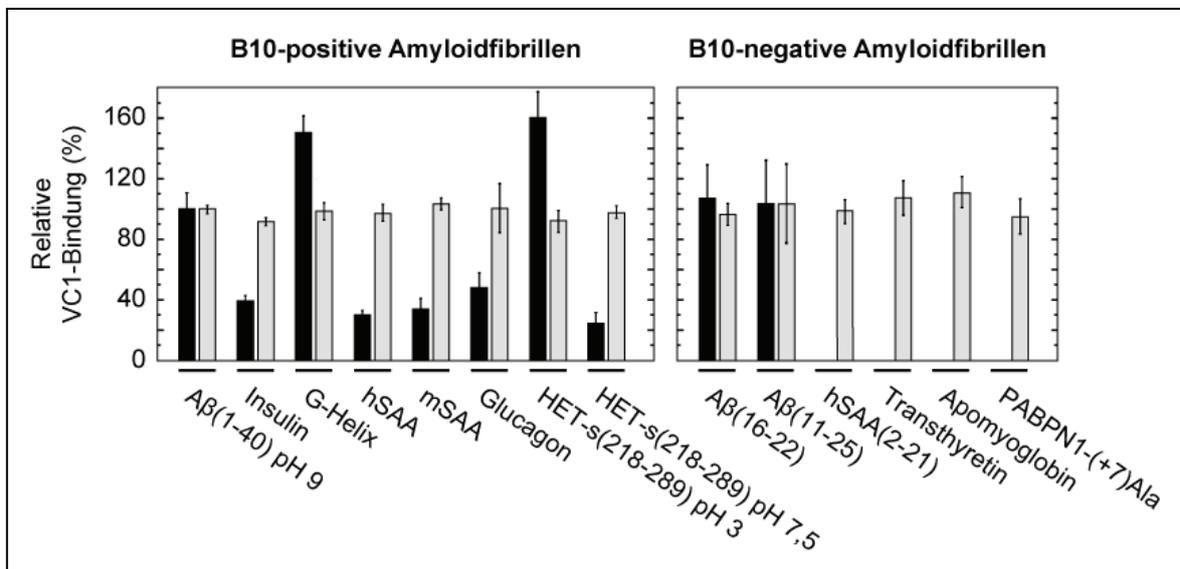


Abbildung 3.19. B10 und RAGE weisen ähnliche Ligandenspezifitäten auf.

Quantifizierte Spot-Blot-Färbung von B10-positiven und B10-negativen Fibrillen mit VC1 (schwarz). Eine gleiche Proteinbeladung der Membran wurde mit Ponceau S-Färbung nachgewiesen (grau). Als 100 % Referenz wurde das Signal von A β (1-40)-Fibrillen definiert. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung (n = 2-3).

3.2.7. Versuch der Rekonstitution eines B10-Epitops

Die bisherigen Daten legten nahe, dass B10 eine hoch regelmäßige und anionische Oberflächenstruktur bei seinen Liganden erkennt. Da die B10-positiven G-Helix-Fibrillen nur eine negativ geladene Aminosäure je Polypeptidkette enthalten (Abb. 3.14, Tab. 3.1), schlossen wir, dass ein B10-Epitop in Fibrillen aus nur einer negativen Aminosäure pro Polypeptidkette generiert werden kann. Diesbezüglich unternahmen wir den Versuch ein B10-Epitop auf der Oberfläche eines globulären Proteins zu rekonstituieren. Aus folgenden Gründen wurde dazu die Pektat-Lyase Pel-15 ausgewählt: 1. Pel-15 ist strukturell charakterisiert und besteht, wie die B10-positiven HET-s(218-289)-Fibrillen (pH 7,5), aus einer parallelen β -Helix. 2. Pel-15 ist B10-negativ. 3. Die korrekte Faltung von Pel-15 kann mit Hilfe einer enzymatischen Reaktion überprüft werden. Um eine geordnete anionische Oberflächenstruktur in Pel-15 zu generieren, entschieden wir uns entweder vier oder sechs benachbarte Glutaminsäure-Reste entlang der Längsachse der β -Helix einzuführen. Es wurden verschiedene Pel-15-Mutanten generiert (L6+, M6+, R6+, M4+), die spezifische anionische Ladungsmuster verschiedener Lage und Länge auf der Oberfläche von Pel-15 präsentieren (Abb. 3.20).

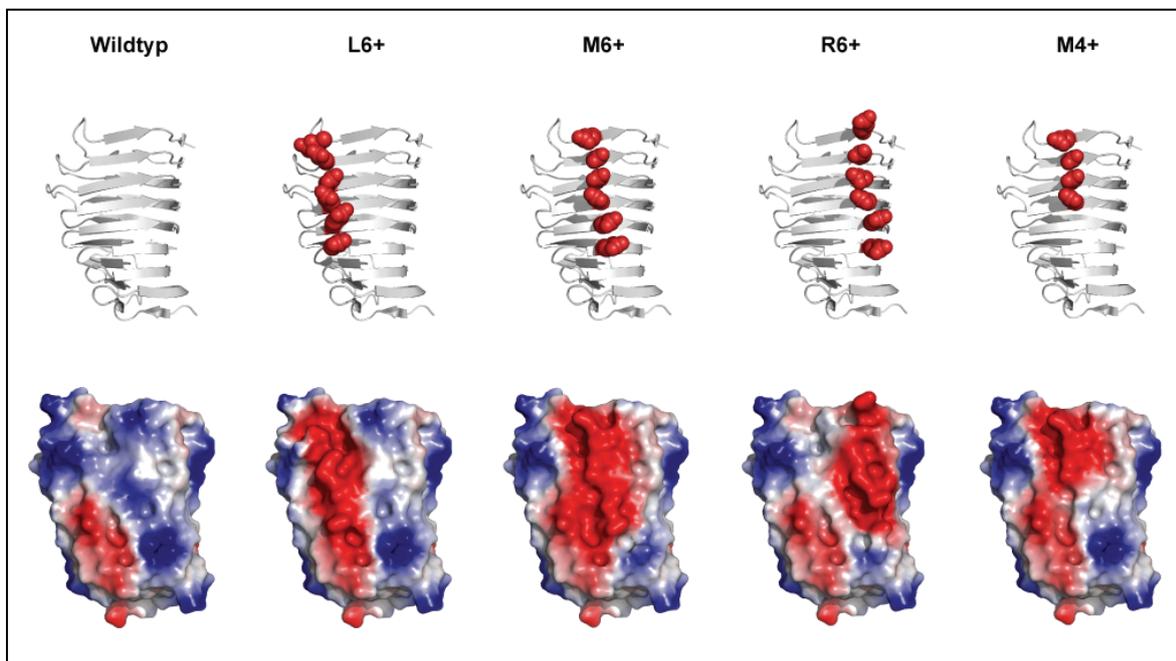


Abbildung 3.20. Vergleich der Anordnung negativer Ladungen verschiedener Pel-15 Varianten.

Darstellung der Ladungsverteilung verschiedener Pel-15-Varianten als Bändermodell (oben) oder als elektrostatische Oberfläche (unten). Durch die Einführung von vier (M4+) oder sechs Glutaminsäure-Resten (L6+, M6+, R6+) an verschiedenen Positionen der β -Helix von Pel-15 (oben) entstehen spezifische anionische Ladungsmuster auf der Oberfläche der jeweiligen Pel-15-Variante (unten). PDB-Zugangscode: 1EE6.PDB¹¹⁹.

Die Analyse der Expression der verschiedenen Varianten ergab, dass ausschließlich der Pel-15-Wildtyp als lösliches Protein exprimierbar war, während alle anderen Varianten über Isolierung von Einschlusskörpern und Rückfaltung gewonnen werden mussten. Im Folgenden soll am Beispiel der Pel-15-Variante M6+ die Aufreinigung der Pel-15-Mutanten zusammengefasst werden. Alle Pel-15-Varianten wurden mit einem His-tag exprimiert. Dadurch konnten die Pel-15-Varianten nach der Isolation der Einschlusskörper in einem ersten Schritt mit einer Ni-Chelat-Chromatographie unter denaturierenden Bedingungen gereinigt werden, wobei gleichzeitig in einem Zwischenschritt eine Rückfaltung an der Säule stattfand (Abb. 3.21a, b). Anschließend wurde das Protein in einem zweiten Reinigungsschritt mit einer Ionenaustausch-Chromatographie gereinigt, wobei nahezu alle Verunreinigungen vollständig entfernt werden konnten (Abb. 3.21c, d). Die Banden bei etwa 50 kDa und 75 kDa sind typischerweise auftretende Dimer- und Trimerbanden von Pel-15 (Abb. 3.21d). Da eine zusätzliche Gelfiltration diese Banden nicht voneinander trennen konnte, wurde bei allen anderen Varianten auf deren Einsatz verzichtet (Abb. 3.21e, f). Abschließend wurde das korrekte Molekulargewicht des Proteins mit Massenspektrometrie verifiziert.

Um die strukturelle Integrität der Pel-15-Varianten zu überprüfen, wurden diese mit 1D-¹H-NMR-Spektroskopie analysiert. In Übereinstimmung mit dem Wildtyp wiesen die NMR-Spektren der Varianten R6+ und M6+ disperse Signale in der aliphatischen (-1 bis 1 ppm) und der Amid-Region (7 bis 10 ppm) auf (Abb. 3.22). Diese Signale deuten auf ein entsprechend gefaltetes Protein hin³²⁷. Im Gegensatz dazu weisen die Spektren der Varianten L6+ und M4+ auf signifikante strukturelle Veränderungen oder eine Aggregation der Proteine hin (Abb. 3.22, Pfeile). Konsistent damit war eine sichtbare Aggregation der Variante L6+ nach Ende der NMR-Messung feststellbar. Um diese Ergebnisse zu verifizieren, wurden die Varianten mit einem enzymatischen Aktivitätstest untersucht. Bei diesem Test wird die Fähigkeit der Pektat-Lyase genutzt, die α -1,4 glykosidische Bindung in Polygalakturonsäure zu spalten. Dabei entsteht ein ungesättigtes Produkt, welches absorptionsspektroskopisch gemessen werden kann. In Übereinstimmung zu den NMR-Daten zeigt die Variante R6+ eine dem Wildtyp entsprechende Enzymaktivität (Abb. 3.23a). Dagegen weisen die anderen Varianten eine signifikant reduzierte Aktivität auf. Für die lösliche Fraktion von L6+ konnte keine Enzymaktivität nachgewiesen werden. Dementsprechend wurde L6+ von nachfolgenden Untersuchungen ausgeschlossen. Diese Resultate lassen darauf schließen, dass die Variante R6+ als eine globulär gefaltete Polypeptidkette vorliegt, welche eine dem Wildtyp

entsprechende Struktur aufweist und damit ein geordnetes anionisches Ladungsmuster auf der Oberfläche präsentiert. Bei den übrigen Pel-15-Varianten lässt sich annehmen, dass die Einführung der negativen Ladungen zu einer signifikanten Veränderung der Struktur geführt hat und daher das Ladungsmuster nicht in der erwarteten Form vorliegt.

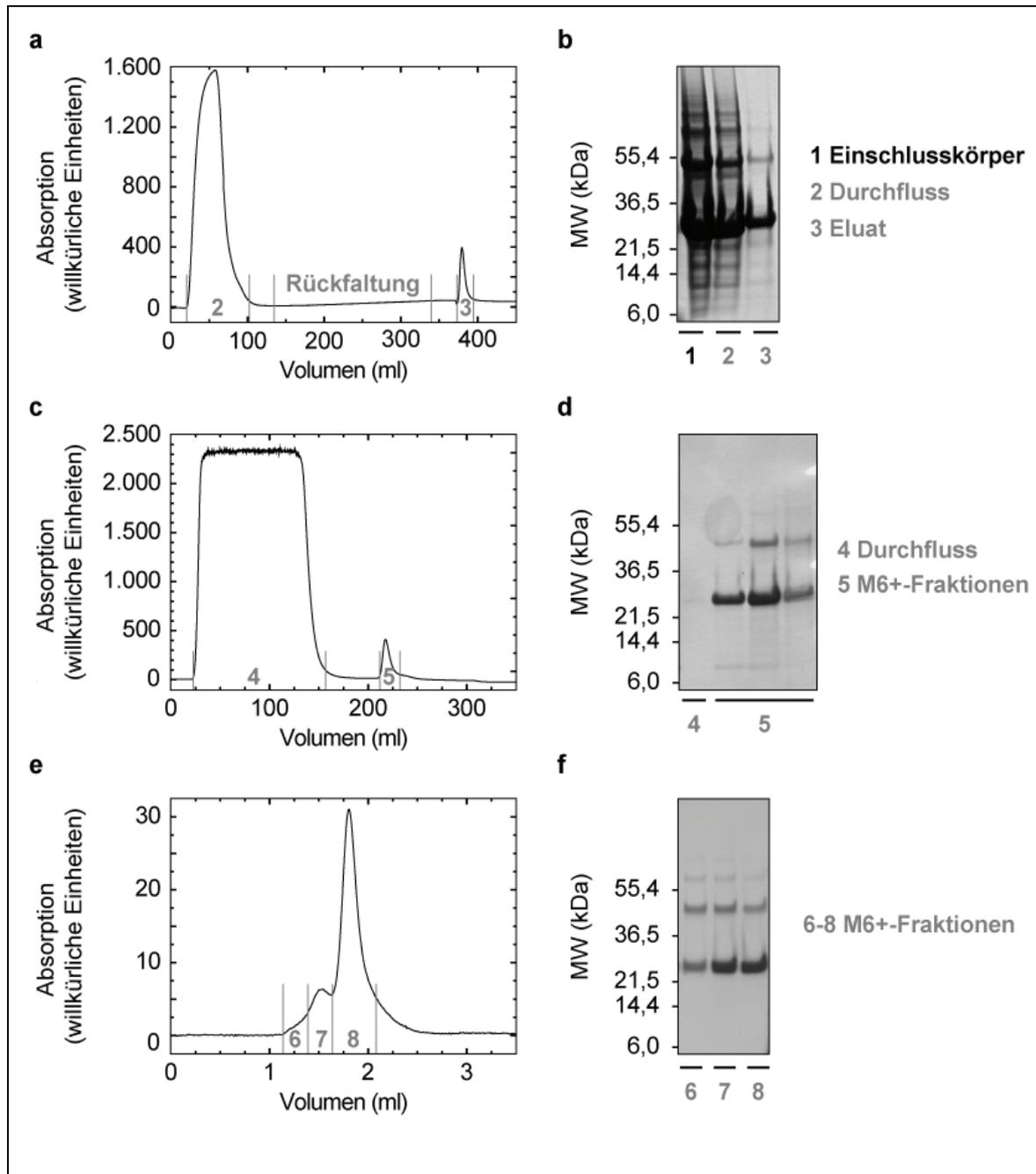


Abbildung 3.21. Aufreinigung der Pel-15-Mutante M6+.

Die Aufreinigung der Pel-15-Variante M6+ erfolgte in einem ersten Schritt durch eine Ni-Chelat-Chromatographie unter denaturierenden Bedingungen (a, b). Danach wurde das Protein mit einer Ionenaustausch-Chromatographie (c, d) und einer Gelfiltration (e, f) isoliert. Die Coomassie-gefärbten SDS-Proteingele (b, d, f) dokumentieren den Verlauf der Reinigung. MW: Molekulargewicht.

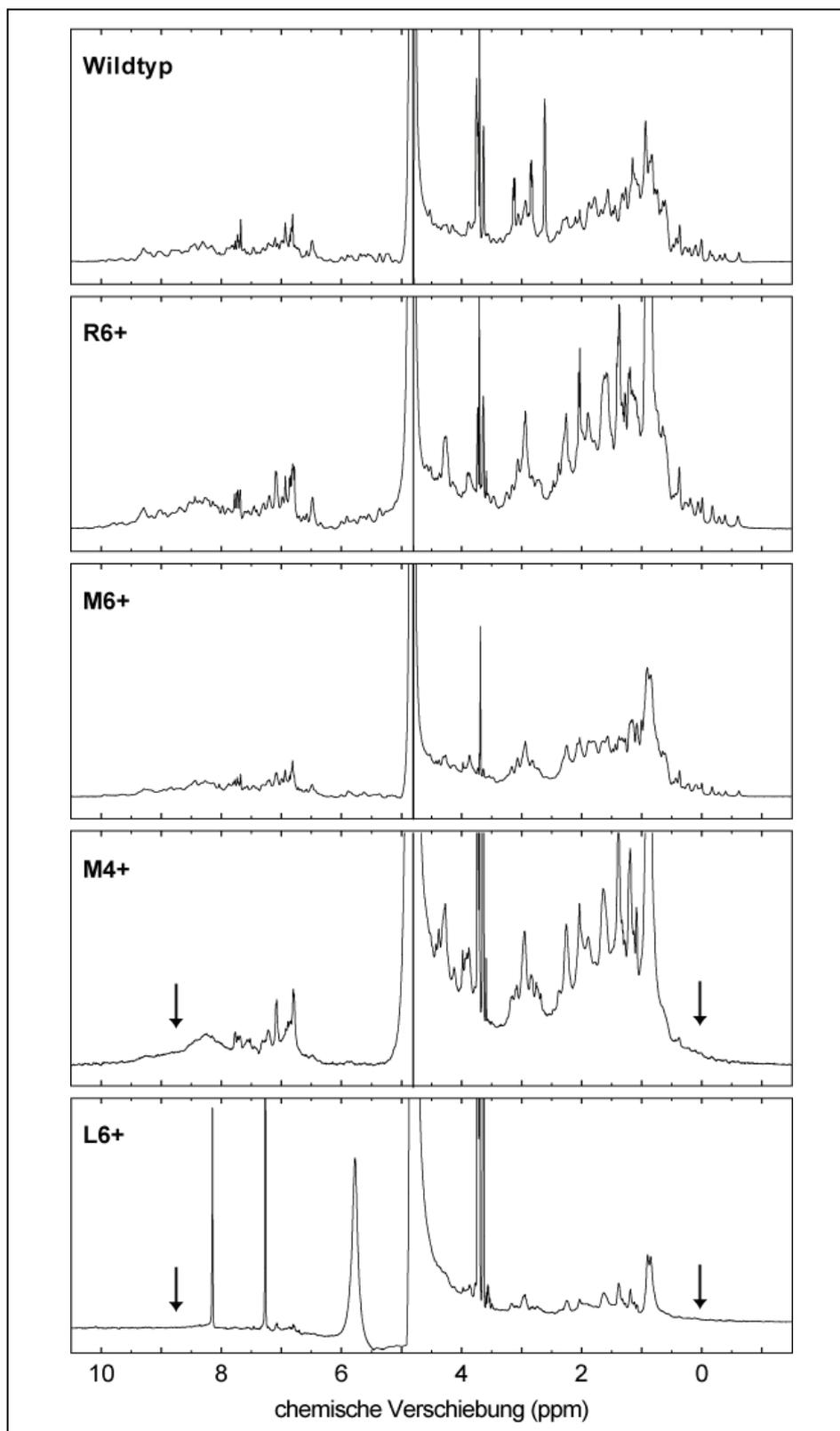


Abbildung 3.22. 1D- ^1H -NMR-Spektren verschiedener Pel-15-Varianten.

(a) 1D- ^1H -NMR-Spektren verschiedener Pel-15-Varianten. Die Pfeile geben eine fehlende Signal-Dispersion in der aliphatischen (-1 bis 1 ppm) und Amid-Region (7-10 ppm) im Vergleich zum Wildtyp an. Die NMR-Messung wurde von C. Lücke (MPF, Halle (Saale)) durchgeführt.

Um zu überprüfen, ob die generierten Pel-15-Varianten durch B10 gebunden werden, wurde deren Interaktion mit B10AP durch einen Spot-Blot, sowie mit isothermaler Titrationskalorimetrie untersucht. Beide Techniken zeigten übereinstimmend, dass für keine der getesteten Varianten (R6+, M6+, M4+) eine Interaktion mit B10AP nachweisbar war (Abb. 3.23b, c). Somit präsentiert keine der Pel-15-Varianten ein Epitop, das von B10 erkannt wird. Daraus lässt sich schließen, dass das präsentierte anionische Oberflächenmuster der Variante R6+ nicht ausreicht, um eine B10-Bindung zu ermöglichen.

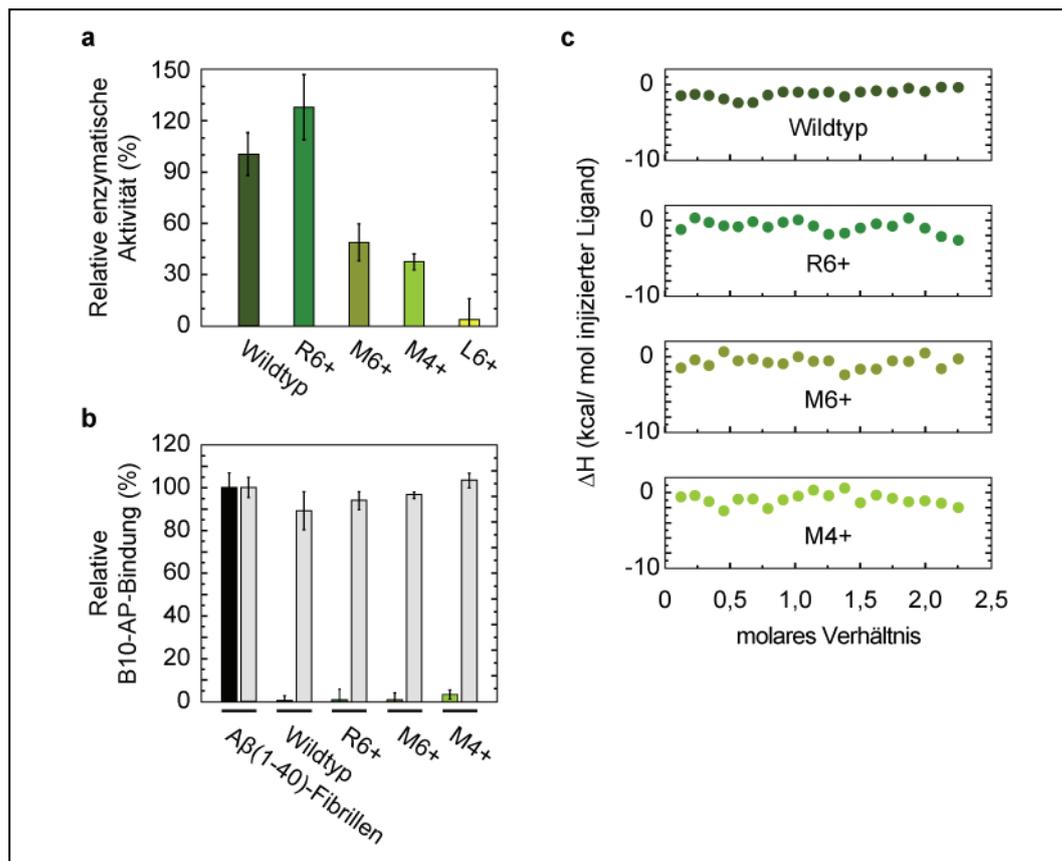


Abbildung 3.23. B10 zeigt keine Interaktion mit den untersuchten Pel-15-Varianten.

a) Messung der enzymatischen Aktivität der Pel-15-Varianten, basierend auf dem Umsatz von Polygalakturonsäure zu einem UV-aktiven Produkt. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung ($n = 3$). **(b)** Quantifizierte Spot-Blot-Färbung der Pel-15-Varianten mit B10AP (schwarz). Eine gleiche Proteinbeladung der Membran wurde mit Ponceau S-Färbung nachgewiesen (grau). Als 100 % Referenz wurde das Signal von A β (1-40)-Fibrillen definiert. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung ($n = 2-3$). **(c)** Isothermale Titrationskalorimetrie zeigt, dass B10 nicht mit den verschiedenen Pel-15-Varianten interagiert. Darstellung der Enthalpieänderung ΔH gegen das molare Verhältnis von Ligand zu B10AP.

3.3. Funktionelle Untersuchungen zu B10

3.3.1. Das B10-Epitop entsteht bevor sich ThT-positive A β (1-40)-Fibrillen bilden

Um zu untersuchen, zu welchem Zeitpunkt sich das B10-Epitop im Laufe einer Aggregationsreaktion bildet, wurde disaggregiertes A β (1-40)-Peptid in einer gepufferten Lösung inkubiert und diese Reaktion mit drei verschiedenen Techniken untersucht. Stündlich wurde ein Aliquot der Lösung entnommen und gleichzeitig mit ThT, TEM und einer Spot-Blot-Analyse mit B10AP analysiert (Abb. 3.24). In Übereinstimmung mit einer nukleationsabhängigen Polymerisationsreaktion zeigte die ThT-Analyse der Inkubation einen sigmoidalen Kurvenverlauf (Abb. 3.24a). Diesbezüglich ist eine anfängliche *Lag*-Phase (Bildung von Aggregationskeimen) von einer exponentiellen Wachstumsphase (Wachstum der Keime zu Fibrillen) unterscheidbar¹⁵³ (Abb. 3.24a). Während dieses Vorganges bilden sich zwischenzeitlich instabile und kurzlebige nicht-fibrilläre und fibrilläre Intermediate, wie Oligomere oder Protofibrillen⁶¹. Die Messung mit ThT ergab eine *Lag*-Phase von 7,3 h für die Aggregation (Abb. 3.24a). Im Vergleich dazu ergab die Untersuchung mit Spot-Blot und B10AP ebenfalls einen sigmoidalen Kurvenverlauf, allerdings mit einer signifikant kürzeren *Lag*-Phase von 3,5 h (Abb. 3.24a). Diese Daten deuten darauf hin, dass die Bildung des B10-Epitops signifikant früher erfolgt, als die Bildung von ThT-positiven Fibrillen. Die Analyse mit TEM zeigte wenige, nicht fibrilläre Aggregate nach 4 h und sowohl nicht fibrilläre, als auch kurze, unregelmäßige, fibrilläre Aggregate nach 7 h (Abb. 3.24b). In Übereinstimmung mit ThT waren zu diesen Zeitpunkten keine Amyloidfibrillen mit TEM nachweisbar. Im weiteren Verlauf der Aggregation nimmt die Menge an nicht fibrillären Aggregaten ab und nach 10 h treten in Übereinstimmung mit ThT und B10AP Amyloidfibrillen auf, die sich im Folgenden zu großen Fibrillen-Haufen zusammenlagern (18 h, Abb. 3.24b). Im Zusammenhang mit der fehlenden Interaktion mit löslichen Oligomeren lässt sich aus diesen Daten schließen, dass B10 ein Epitop erkennt, welches nicht in Oligomeren vorkommt, aber bereits vor der Entstehung von ThT-positiven Amyloidfibrillen gebildet wird.

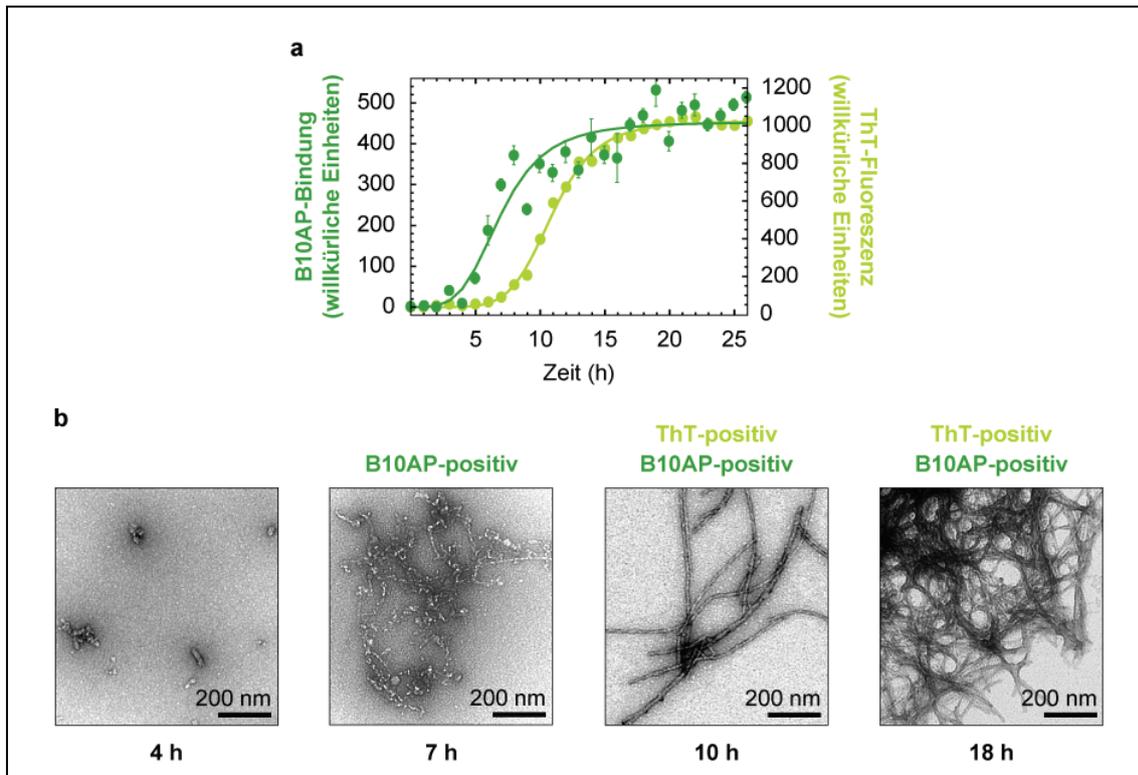


Abbildung 3.24. Das B10-Epitop entsteht bevor ThT-positive A β (1-40)-Fibrillen nachweisbar sind.

(a) Verfolgung einer Aggregationskinetik von A β (1-40) mit ThT-Fluoreszenz (hellgrün) und quantifizierter Spot-Blot-Färbung mit B10AP (dunkelgrün). Eine A β (1-40)-Fibrillenlösung diente als Standard für die Spot-Blot-Analyse. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung ($n=3$). Die Daten wurden mit einem sigmoidalen Modell (Hill-Funktion, Origin) angepasst. (b) TEM-Analyse der Aggregationskinetik in (a) zu den angegebenen Zeitpunkten. Dieses Experiment wurde in Zusammenarbeit mit G. Habicht (HKI, Jena) durchgeführt.

3.3.2. B10 inhibiert die Bildung von A β (1-40)-Amyloidfibrillen

Für verschiedene Antikörper wurde ein inhibitorischer Effekt auf die Bildung von Amyloidfibrillen gezeigt³²⁸⁻³³². In diesem Zusammenhang untersuchten wir, ob B10 ebenfalls einen Einfluss auf die Aggregationsreaktion hat. Zu diesem Zweck wurde disaggregiertes A β (1-40)-Peptid mit verschiedenen Konzentrationen an B10AP inkubiert und die Bildung von A β (1-40)-Fibrillen mit ThT und TEM untersucht. Die ThT-Analyse zeigte, dass sich die *Lag*-Phase der Kinetik mit steigender B10AP-Konzentration deutlich verlängert und das ThT-Signal reduziert (Abb. 3.25a-d). Bei einem molaren Verhältnis von 1:10 (B10:A β) inhibiert B10AP wirksam die Bildung von ThT-positiven Amyloidfibrillen (Abb. 3.25d). In Übereinstimmung dazu zeigt die TEM-Analyse nach 96 h (▼) und 160 h (∇) Inkubation einen deutlichen Effekt von B10AP auf die fibrilläre Struktur der Aggregate (Abb. 3.25a-d). In Abwesenheit von B10AP bilden sich regelmäßige und lange A β (1-40)-Fibrillen (Abb. 3.25a). Mit zunehmender B10AP-Konzentration verzögert sich die Bildung von A β (1-40)-Amyloidfibrillen und ihre Häufigkeit nimmt ab (Abb. 3.25a-d). Schließlich treten bei einem molaren Verhältnis von 1:10 (B10:A β) zu keinem Zeitpunkt A β (1-40)-Amyloidfibrillen auf (Abb. 3.25d). Stattdessen bilden sich unregelmäßige, kurze, gebogene Fibrillen, welche Aggregaten ähneln, die in der Literatur als Protofibrillen definiert wurden (vgl. Abb. 3.25a-d)^{166,167}. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass B10 die Bildung von A β (1-40)-Amyloidfibrillen inhibiert und stattdessen ThT-negative Aggregate stabilisiert, welche eine Protofibrillen-ähnliche Erscheinung aufweisen. Des Weiteren lässt sich schließen, dass bei einem molaren Verhältnis von 1:10 (B10:A β) alle B10-Bindungsstellen besetzt sind. Somit stimmt dieses Resultat mit der molaren Stöchiometrie überein, die sich aus der Messung der Bindung von B10 an A β (1-40)-Amyloidfibrillen mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie ergibt (Kap. 1.10.4).

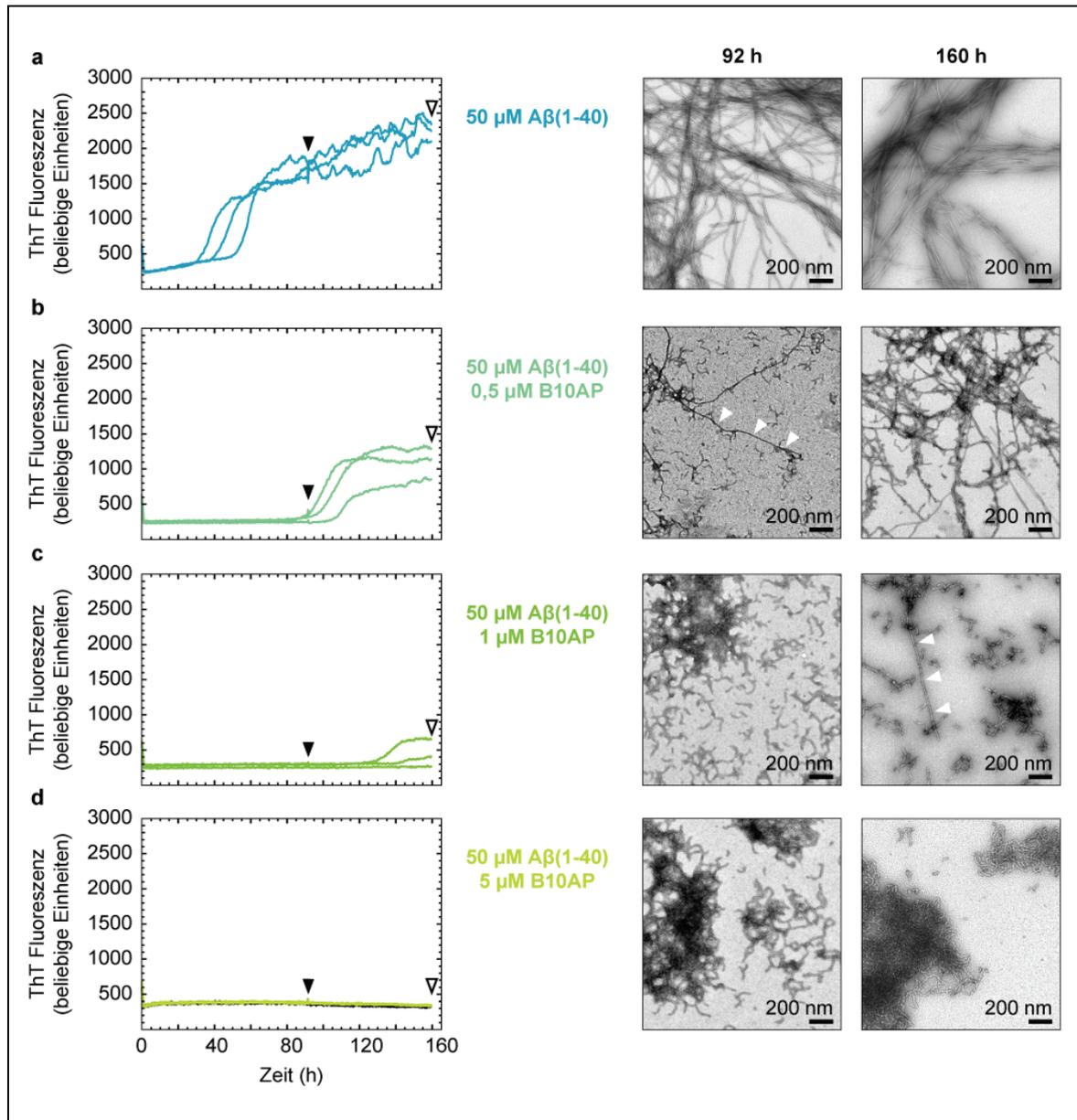


Abbildung 3.25. B10AP verhindert die Bildung von A β (1-40)-Fibrillen.

(a-d) Verfolgung der Aggregationskinetik von A β (1-40) in Abwesenheit (a) und in Gegenwart von 0,5 μ M (b), 1 μ M (c) oder 5 μ M (d) B10AP mit ThT (links) und TEM (rechts). Die schwarze Kurve in (d) stellt 5 μ M B10AP ohne A β (1-40) dar. Nach 92 h (\blacktriangledown) und 160 h (\blacktriangledown) wurden Proben für die Analyse mit TEM entnommen. Die gefüllten weißen Dreiecke veranschaulichen das Auftreten einzelner Amyloidfibrillen.

3.3.3. B10AP-stabilisierte Aggregate weisen die Charakteristika von Protofibrillen auf

Als unmittelbare Folge der letztgenannten Resultate stellte sich die Frage nach der Identität der B10AP-stabilisierten Aggregate. Um deren strukturelle Eigenschaften zu untersuchen wurde disaggregiertes A β (1-40)-Peptid mit B10AP in einem molaren Verhältnis von 1:10 (B10:A β) inkubiert und die resultierenden Aggregate mit verschiedenen Techniken charakterisiert. Die Analyse mit TEM zeigte, dass B10AP-stabilisierte Aggregate eine kurze, unregelmäßige, gebogene und fibrilläre Struktur aufweisen (Abb. 3.26a). Dagegen treten A β (1-40)-Fibrillen als lange und regelmäßige, fibrilläre Strukturen auf (Abb. 3.26a). Somit weisen B10AP-stabilisierte Aggregate eine fibrilläre Struktur auf, welche ähnlich zu der von Protofibrillen ist^{166,167}. Eine Analyse mit Röntgenbeugung offenbarte charakteristische Abstände einer amyloid-ähnlichen Struktur mit Reflexionen von $4,62 \pm 0,02$ Å und $9,88 \pm 0,05$ Å (Abb. 3.26b). In Übereinstimmung dazu zeigte die Untersuchung mit FTIR-Spektroskopie, dass B10AP-stabilisierte Aggregate ein Amid-I-Maximum bei 1624 cm^{-1} in der für Amyloidfibrillen typischen Region aufweisen (Abb. 3.26c). Zusätzlich zeigen diese Daten, dass B10AP-stabilisierte Aggregate eine β -Faltblatt-reiche Struktur aufweisen und darin mit Protofibrillen und Amyloidfibrillen übereinstimmen (Abb. 3.26c)¹⁸². Trotz der amyloidähnlichen Eigenschaften unterscheiden sich B10AP-stabilisierte Aggregate signifikant von Amyloidfibrillen. B10AP-stabilisierte Aggregate interagieren, im Unterschied zu Amyloidfibrillen, nur sehr schwach mit amyloidspezifischen Farbstoffen, wie ThT (Abb. 3.25) oder KR (Abb. 3.26d). Diese schwachen Interaktionen stimmen mit den Eigenschaften von ursprünglich definierten Protofibrillen überein^{124,179,186}. Des Weiteren sind B10AP-stabilisierte Aggregate leichter proteolytisch verdaubar als Amyloidfibrillen, allerdings stabiler als disaggregiertes A β (1-40)-Peptid (Abb. 3.26e). Während B10AP-stabilisierte Aggregate nach 3,5 h komplett verdaut sind, zeigen A β (1-40)-Fibrillen auch nach 3,5 h eine signifikante Menge an unverdaulichem Peptid (Abb. 3.26e). Dies deutet darauf hin, dass die Struktur von B10AP-stabilisierten Aggregaten, im Vergleich zu Amyloidfibrillen weniger kompakt ist und somit eher Protofibrillen ähnelt^{177,333}. All diese Resultate zeigen, dass B10AP-stabilisierte Aggregate signifikante Übereinstimmungen mit den Charakteristika von Protofibrillen aufweisen. Daraus lässt sich ableiten, dass B10AP die Bildung von A β (1-40)-Amyloidfibrillen durch die Stabilisierung von Protofibrillen inhibiert. Außerdem lässt sich daraus schließen, dass das B10-Epitop bereits bei

Protofibrillen vorhanden ist. In Übereinstimmung dazu wird das B10-Epitop vor der Entstehung von ThT-positiven Amyloidfibrillen gebildet (Kap. 3.3.1) und fehlt bei löslichen Oligomeren (Kap. 3.1.1).

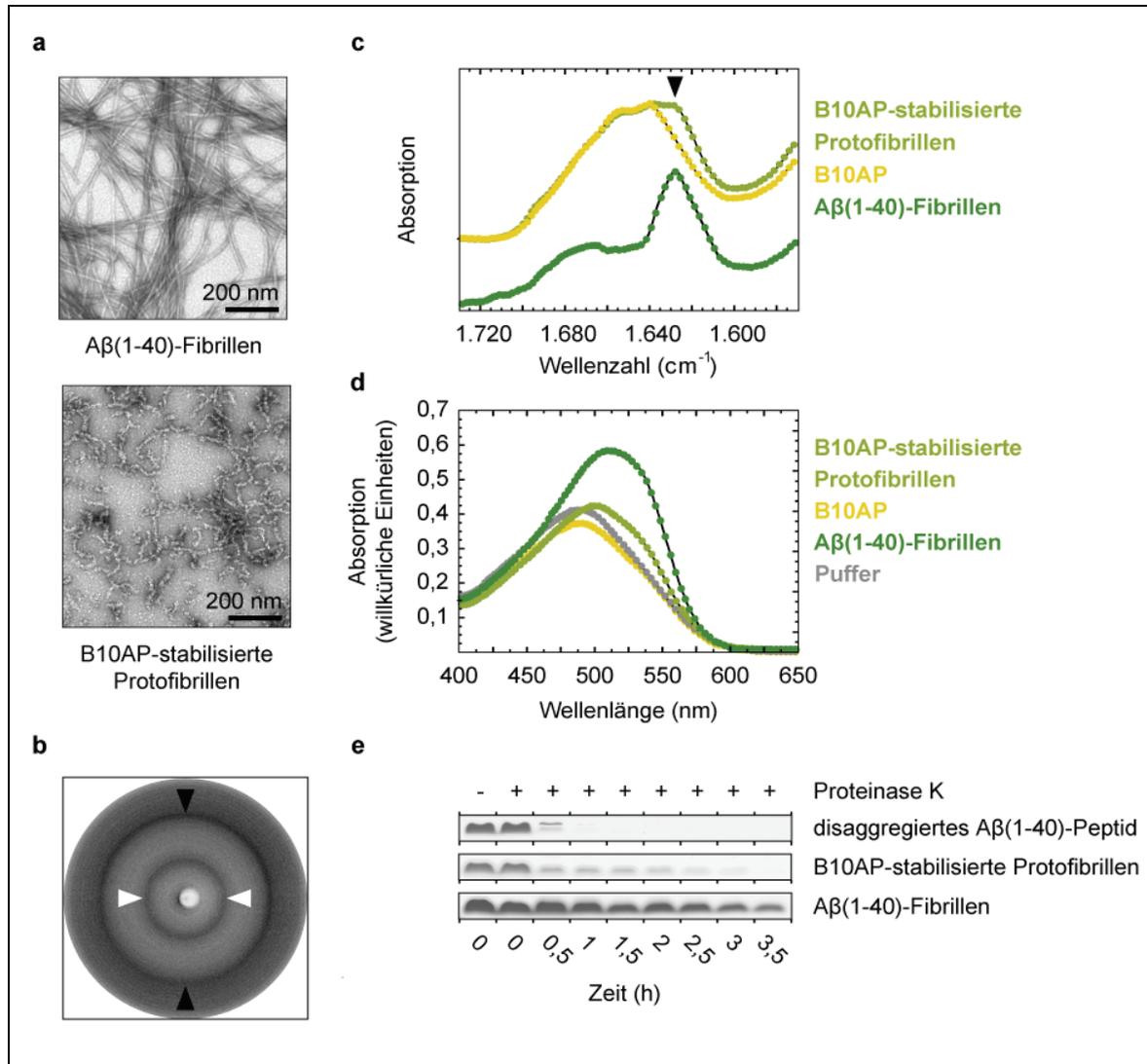


Abbildung 3.26. B10AP stabilisierte Aggregate weisen die Charakteristika von Protofibrillen auf.

(a) TEM-Analyse einer Präparation von Aβ(1-40)-Fibrillen und B10AP-stabilisierten Protofibrillen (molares Verhältnis B10:Aβ 1:10). (b) Röntgenbeugungsmuster hydratisierter, B10AP-stabilisierter Protofibrillen. Die Reflexionen bei 4,62 Å (schwarze Dreiecke) und 9,88 Å (weiße Dreiecke) sind charakteristisch für amyloid-ähnliche β-Faltblatt-Strukturen. Das Experiment wurde in Zusammenarbeit mit D. Röser (FLI, Jena) durchgeführt. (c) FTIR-Spektren von Aβ(1-40)-Fibrillen, B10AP und B10AP-stabilisierten Protofibrillen. Das schwarze Dreieck zeigt das Amid-I-Maximum von B10AP-stabilisierten Protofibrillen bei 1624 cm⁻¹ an. (d) KR-Absorptionsspektren in Gegenwart von Puffer, Aβ(1-40)-Fibrillen, B10AP und B10AP-stabilisierten Protofibrillen. (e) Proteolytischer Verdau von disaggregiertem Aβ(1-40)-Peptid, B10AP-stabilisierten Protofibrillen und Aβ(1-40)-Fibrillen mit Proteinase K. Das mit Coomassie gefärbte SDS-Gel dokumentiert die Degradation der Aβ(1-40)-Bande.

3.3.4. B10 bindet A β (1-40)-Fibrillen an einer anderen Stelle als KR oder ThT

Um festzustellen, ob die fehlenden Interaktionen der B10AP-stabilisierten Aggregate mit ThT und KR durch sterische Behinderungen seitens B10 verursacht werden, untersuchten wir den Einfluss von B10AP auf die Interaktion von A β (1-40)-Fibrillen mit beiden Farbstoffen. Zu diesem Zweck wurden A β (1-40)-Fibrillen mit B10AP dekoriert und im Vergleich zu nicht dekorierten Fibrillen mit KR und ThT untersucht. Die Analyse zeigte, dass sowohl nicht dekorierte, als auch dekorierte A β (1-40)-Fibrillen eine signifikante Interaktion mit beiden Farbstoffen aufweisen (Abb. 3.27b, c). Demzufolge kann die fehlende Interaktion von B10AP-stabilisierten Aggregaten mit KR oder ThT nicht durch sterische Behinderungen seitens B10 erklärt werden. In einem weiteren Kontrollexperiment überprüften wir, ob der Längenunterschied zwischen B10AP-stabilisierten Aggregaten und A β (1-40)-Fibrillen eine Erklärung für die fehlende Interaktion mit ThT und KR liefert. Zu diesem Zweck wurden fragmentierte und intakte

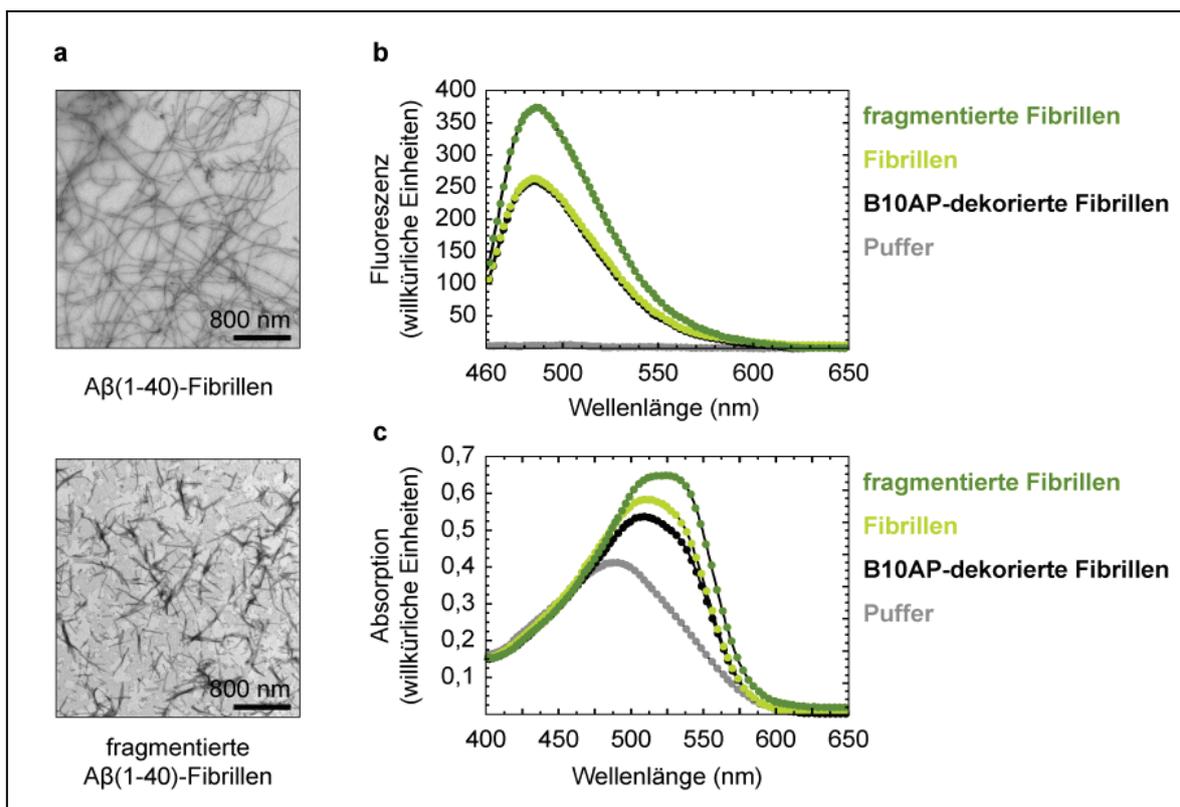


Abbildung 3.27. B10 bindet A β (1-40)-Fibrillen an einer anderen Stelle als KR oder ThT.

(a) TEM-Analyse von A β (1-40)-Fibrillen vor (oben) und nach (unten) Fragmentierung durch einmaliges Einfrieren, Auftauen und vortexen. (b, c) Interaktion von ThT (b) und KR (c) mit Puffer, intakten, fragmentierten oder B10AP-dekorierten A β (1-40)-Fibrillen (molares Verhältnis B10:A β 1:10).

Amyloidfibrillen vergleichend mit beiden Farbstoffen untersucht. Die Analyse zeigte, dass sowohl intakte, als auch fragmentierte A β (1-40)-Fibrillen signifikante Signale mit ThT und KR liefern (Abb. 3.27a-c). Diese Resultate deuten darauf hin, dass der Längenunterschied zwischen B10AP-stabilisierten Aggregaten und A β (1-40)-Fibrillen keine Erklärung für die fehlende Interaktion mit ThT und KR liefert. Daraus lässt sich schließen, dass die fehlende Interaktion von B10AP-stabilisierten Aggregaten mit ThT und KR nicht durch sterische Behinderungen oder die Länge der Fibrillen erklärt werden kann. Demzufolge liefern diese Daten weitere Unterstützung für die Annahme, dass B10AP die Bildung von A β (1-40)-Fibrillen durch die Stabilisierung von Protofibrillen inhibiert. Ferner lässt sich schließen, dass B10 an einer anderen Stelle der A β (1-40)-Fibrille als ThT und KR bindet und somit alternative strukturelle Bestandteile von A β (1-40)-Fibrillen nutzt.

3.3.5. B10 führt nicht zur Auflösung von bereits gebildeten A β (1-40)-Fibrillen

Neben der Inhibition der Bildung von Amyloidfibrillen wird für einige Antikörper auch eine Auflösung von Amyloidfibrillen oder Plaques diskutiert^{269,334-341}. Um zu untersuchen, ob B10 ebenfalls einen destabilisierenden Effekt auf Amyloidfibrillen hat, wurden bereits gebildete A β (1-40)-Fibrillen für eine Woche mit B10AP bei einem molaren Verhältnis von 1:10 (B10:A β) inkubiert. Danach wurde die Lösung mit TEM, sowie Ultrazentrifugation und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese untersucht. Die Analyse des SDS-Gels nach der Zentrifugation zeigte, dass die Anwesenheit von B10AP nicht zu einer signifikanten Reduzierung der Menge an A β (1-40)-Fibrillen im Pellet führt (Abb. 3.28a). In Übereinstimmung dazu waren keine offensichtlichen Unterschiede zwischen der Probe ohne und mit B10AP im TEM zu erkennen (Abb. 3.28b). Daraus lässt sich ableiten, dass B10 keine funktionelle Aktivität bezüglich der Auflösung von bereits gebildeten Fibrillen zeigt. Damit unterscheidet sich B10 in Bezug auf oben genannte Antikörper.

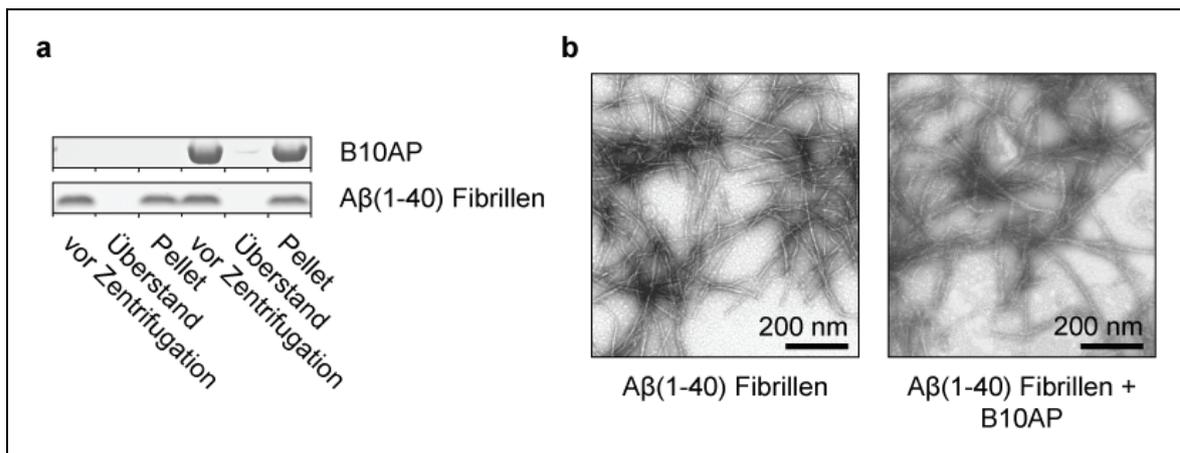


Abbildung 3.28. B10AP führt nicht zur Auflösung bereits gebildeter A β (1-40)-Fibrillen.

(a) Coomassie-gefärbtes SDS-Gel von A β (1-40)-Fibrillen nach einer Woche Inkubation mit und ohne B10AP und anschließender Ultrazentrifugation. (b) TEM-Aufnahme von bereits gebildeten A β (1-40)-Amyloidfibrillen nach einer Woche Inkubation ohne und mit B10AP (molares Verhältnis B10:A β 1:10).

4. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die konformationssensitive Bindung von Amyloidfibrillen durch Antikörper zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde die konformationssensitive VHH-Domäne B10 strukturell und funktionell analysiert.

4.1. Die konformationelle Spezifität von B10

4.1.1. Protofibrillen und Amyloidfibrillen weisen eine ähnliche Oberflächenstruktur auf

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bindungsspezifität von B10 durch die Untersuchung verschiedener konformationeller Zustände von Polypeptidketten analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass B10 verschiedene Konformere des A β (1-40)-Peptides unterscheidet. B10 erkennt spezifisch die Konformation des A β (1-40)-Peptides in Amyloidfibrillen, jedoch nicht wenn es als disaggregiertes Peptid (Abb. 3.2a) oder in löslichen Oligomeren vorliegt (Abb. 3.1). Damit belegt B10, in Übereinstimmung zu Ergebnissen von anderen Antikörpern, wie den fibrillenspezifischen Antikörpern OC und LOC²⁶⁸, oder dem oligomerspezifischen Antikörper A11¹⁴⁹, dass lösliche Oligomere und Amyloidfibrillen separate strukturelle Zustände des A β (1-40)-Peptides darstellen. Dies ist mit den beobachteten strukturellen Unterschieden von löslichen Oligomeren und Amyloidfibrillen konsistent (Abb. 3.1). Daneben unterscheidet B10 zwischen der Struktur von Amyloidfibrillen und der von intrinsisch ungefalteten oder globulär gefalteten Polypeptidketten (Abb. 3.2). Dies ist ebenfalls mit der Bindungsspezifität von anderen fibrillenspezifischen Antikörpern konsistent²⁶⁶. Schlussfolgernd lässt sich schließen, dass B10 eine konformationelle Spezifität für Amyloidfibrillen aufweist.

Zusätzlich verhindert B10 in Aggregationsexperimenten mit A β (1-40) die Bildung von Amyloidfibrillen und stabilisiert stattdessen Protofibrillen (Abb. 3.25, 3.26). Protofibrillen werden normalerweise als kurzlebige, instabile Aggregate angesehen, welche kinetisch den thermodynamisch stabileren Amyloidfibrillen vorausgehen^{166,167,342}. Durch die Bindung von B10 an Protofibrillen werden diese aber stabilisiert und können sich nicht in Amyloidfibrillen umwandeln (Abb. 4.1). In Übereinstimmung mit der Bindung des fibrillenspezifischen Antikörpers WO1 an stabilisierte Protofibrillen¹⁷⁹ legt dieses Ergebnis

nahe, dass Protofibrillen und Amyloidfibrillen eine ähnliche Oberflächenstruktur aufweisen und somit in grundlegenden strukturellen Aspekten übereinstimmen. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die dargestellte Bindungsspezifität von B10 eine ideale Grundlage bildet, um die konformationssensitive Bindung von Antikörpern an Amyloidfibrillen aufzuklären.

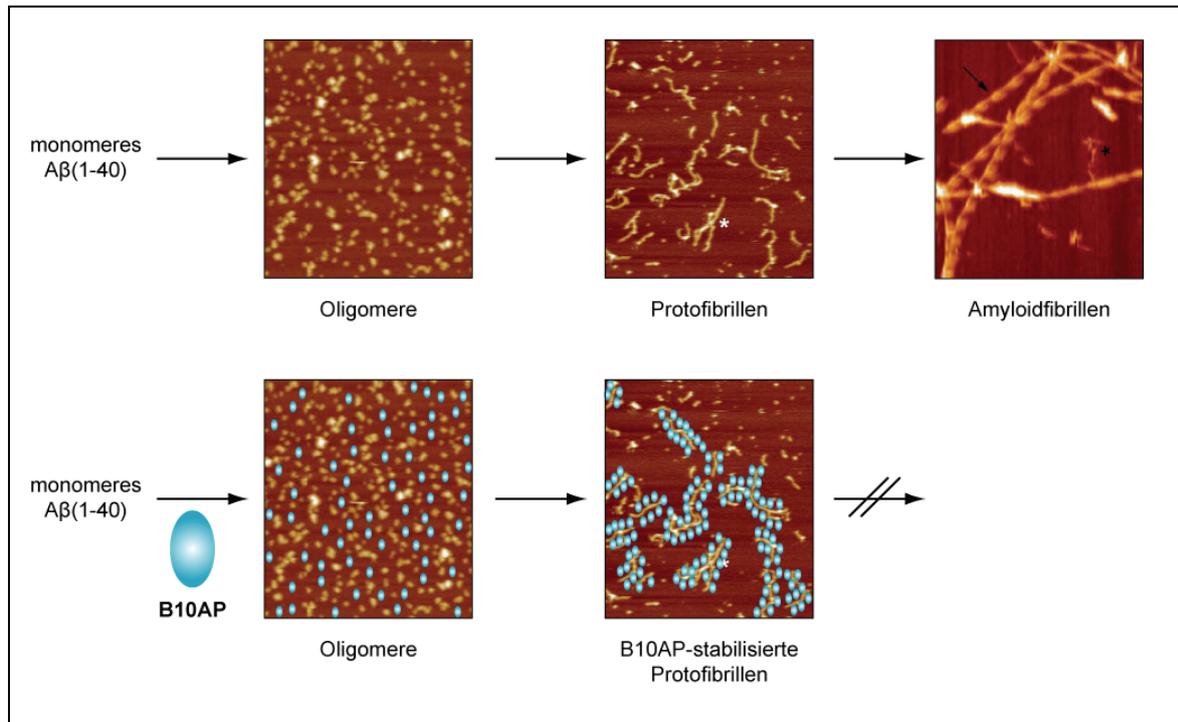


Abbildung 4.1. B10 verhindert die Bildung von Amyloidfibrillen durch Stabilisierung von Protofibrillen.

B10AP interagiert weder mit monomeren Aβ-Peptid noch mit Aβ-Oligomeren. Mit der Bildung von Protofibrillen tritt erstmals das B10-Epitop auf, wodurch Protofibrillen durch B10 gebunden werden und deren Umwandlung in Amyloidfibrillen verhindert wird. Bildquelle: Goldsbury et al. (2005)⁶¹.

4.1.2. *In vitro* und *in vivo* gebildete Amyloidfibrillen besitzen den gleichen strukturellen Aufbau

In unterschiedlichen wissenschaftlichen Fachgebieten existieren verschiedene Definitionen für Amyloidfibrillen^{4,16,30-32}. Im pathologischen Sinne sind Amyloidfibrillen *in vivo*-Ablagerungen mit einer fibrillären Erscheinung, die ein typisches Röntgenbeugungsmuster und eine Affinität für amyloidspezifische Farbstoffe aufweisen⁴. Diese Definition schließt explizit *in vitro* gebildete Fibrillen aus⁴. In einem strukturellen Sinne sind Amyloidfibrillen fadenförmige Polypeptid-Aggregate mit einer gekreuzten β-Faltblatt-Struktur^{30,31}. In dieser Definition ist der Bildungsort der Fibrille kein Kriterium und spielt daher eine untergeordnete Rolle^{30,32}. Die Untersuchung

verschiedener Fibrillen im Rahmen dieser Arbeit belegt, dass B10 sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* gebildete Amyloidfibrillen erkennt (Abb. 3.12). In Übereinstimmung dazu wurde bereits vor dieser Arbeit gezeigt, dass B10 A β (1-40)-Amyloidfibrillen unabhängig ihres Bildungsortes bindet (Abb. 1.26). Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass *in vivo* und *in vitro* gebildete Amyloidfibrillen grundsätzlich die gleiche konformationelle Organisation und Oberflächenstruktur aufweisen³⁰. Diese Schlussfolgerung liefert einen Beitrag zu der Diskussion um die Definition von Amyloidfibrillen. Die genannten Resultate unterstützen eine Definition von Amyloidfibrillen, die unabhängig von den Bedingungen der Fibrillenbildung ist und demzufolge sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* gebildete Fibrillen einschließt.

4.2. Die molekulare Grundlage der Bindung von B10

4.2.1. B10 erkennt keine generische Struktur des Polypeptid-Rückgrates in Amyloidfibrillen

Frühere Publikationen über konformationssensitive Antikörper zeigten eine Bindung aller getesteten löslichen Oligomere¹⁴⁹ oder Fibrillen^{266,268}. In diesem Kontext wurde die Hypothese aufgestellt, dass die konformationssensitive Bindung dieser Antikörper auf der direkten Interaktion mit einem generischen Strukturmotiv beruht^{149,266,271}. Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Daten widersprechen dieser Hypothese. B10 erkennt nicht alle getesteten Fibrillen und unterscheidet sich damit wesentlich von den bisherigen fibrillenspezifischen Antikörpern (Abb. 3.14). Allerdings ist dabei zu berücksichtigen, dass bisherige Publikationen nur einen Bruchteil der in dieser Arbeit getesteten Fibrillen untersucht haben^{266,268}. Demzufolge beruhte die Aufstellung dieser Hypothese möglicherweise auf der begrenzten Zahl der getesteten Fibrillen. Darüber hinaus ist zu erwähnen, dass sowohl der oligomerspezifische Antikörper A11¹⁴⁹, als auch die fibrillenspezifischen Antikörper OC und LOC²⁶⁸ polyklonale Seren darstellen und somit deren Bindung an verschiedene Fibrillen möglicherweise das Resultat einer Bindung von verschiedenen Antikörpern ist. Aus den Daten der vorliegenden Arbeit ergibt sich somit der interessante Fakt, dass B10 zwischen verschiedenen Typen von Fibrillen differenziert (Abb. 3.14). Des Weiteren erkennt B10 auch Fibrillen, die eine entgegengesetzte Rückgrat-Chiralität aufweisen, wie D- und L-SAA(1-12)-Fibrillen (Abb. 3.14, Tab. 3.1). Daher lässt sich schlussfolgernd feststellen, dass die B10-Spezifität

für Fibrillen nicht durch eine direkte Interaktion mit einer generellen Struktur des Polypeptid-Rückgrates von Fibrillen erklärbar ist.

4.2.2. B10 erkennt Liganden durch elektrostatische Interaktionen

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die konformationssensitive Erkennung von Fibrillen durch B10 auf elektrostatischen Wechselwirkungen beruht (Abb. 3.8, 3.9). Die Binderegion von B10 ist signifikant mit basischen Aminosäuren angereichert (Abb. 3.5) und impliziert daher, dass B10 mit negativen Aminosäuren in Fibrillen interagiert. In Übereinstimmung dazu konnte die Relevanz der negativ geladenen Aminosäuren in Amyloidfibrillen für die Bindung von B10 in weiteren Versuchen in der Arbeitsgruppe bestätigt werden (Abb. 4.2). Durch eine chemische Modifizierung der Carboxylgruppen von bereits gebildeten Amyloidfibrillen lässt sich die Bindung von B10 signifikant reduzieren (Abb. 4.2). Dagegen hatte eine chemische Modifikation von Aminogruppen keinen Einfluss auf die B10-Bindung. Diese Daten belegen, dass B10 mit negativ geladenen Gruppen in Amyloidfibrillen interagiert. Interessanterweise zeigen auch andere fibrillenspezifische Bindemoleküle, wie SAP (Kap. 1.8.3)²⁴⁶, RAGE (Kap. 1.8.4)²⁵⁶ oder CLAC (Kap. 1.8.5)²⁶⁵, eine besondere Bedeutung von elektrostatischen Interaktionen für die Erkennung von Fibrillen. Dieser Zusammenhang unterstreicht die Relevanz elektrostatischer Interaktionen für die Bindung B10-positiver Fibrillen. Offensichtlich weisen B10-positive Amyloidfibrillen strukturelle Besonderheiten auf, die eine konformationssensitive Erkennung mittels elektrostatischer Interaktionen ermöglichen.

In Übereinstimmung zur Relevanz elektrostatischer Interaktionen erkennt B10 die polyanionischen Polymere DNS³²⁵ und Heparin³²⁴ (Abb. 3.16), die gehäuft anionische Gruppen auf der Oberfläche präsentieren. Die CDR 1 von B10 (Abb. 3.5) entspricht exakt dem typischen B-B-X-B-B-Sequenzmotiv Heparin-bindender Proteine (B: basische Aminosäure, X: nicht basische Aminosäure)³⁴³. Interessanterweise zeigen auch die oben genannten fibrillenspezifischen Bindemoleküle in Bezug auf Heparin oder DNS überraschende Parallelen zu B10. Heparin wird von SAP²⁴³, CLAC²⁶⁵ und RAGE²⁵² gebunden, wobei CLAC, ebenso wie B10, ein typisches Sequenzmotiv Heparin-bindender Proteine aufweist. Darüber hinaus kompetitiert Heparin mit Amyloidfibrillen um die Bindung von CLAC²⁶⁵ und sowohl SAP als auch RAGE binden an DNS^{242,253}. Schlussfolgernd lässt sich feststellen, dass B10 und andere fibrillenspezifische

Bindemoleküle ihre Liganden offenbar über ähnliche Mechanismen anhand elektrostatischer Interaktionen erkennen.

Wiederum andere fibrillenspezifische Bindemoleküle nutzen wahrscheinlich alternative strukturelle Bestandteile von Amyloidfibrillen. So konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Bindung von KR und ThT nicht durch die Bindung von B10 an Amyloidfibrillen inhibiert wird (Abb. 3.27). In Übereinstimmung dazu werden für beide Moleküle andere Mechanismen für die Bindung von Amyloidfibrillen diskutiert, wie ionische und/oder hydrophobe Wechselwirkungen (KR)^{35,37,80,221}, oder eine Interaktion mit aliphatischen und aromatischen Aminosäuren (ThT)³⁸.

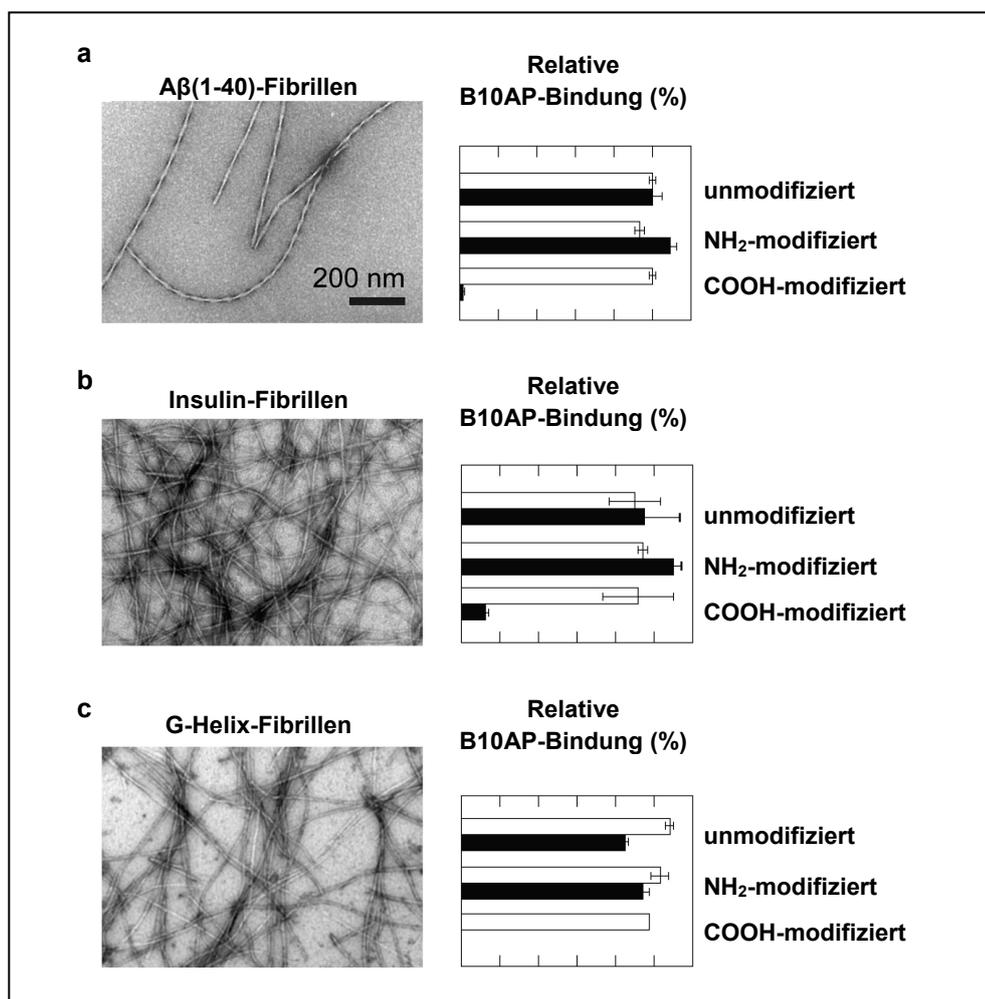


Abbildung 4.2. Bindung von B10 an chemisch modifizierte Amyloidfibrillen.

Chemische Modifikation von Aβ(1-40)- (a), Insulin- (b) und G-Helix-Fibrillen (c) an Amino- oder Carboxylgruppen. Die Fibrillen wurden mit TEM (links) und Spot-Blot (rechts) analysiert. Die Spot-Blot-Färbung der Fibrillen erfolgte mit B10AP (schwarz). Eine gleiche Proteinbeladung der Membran wurde mit Ponceau S-Färbung nachgewiesen (weiß). Als 100 % Referenz wurde das Signal von Aβ(1-40)-Fibrillen definiert. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung (n = 2-3). Dieses Experiment wurde von S. T. Kumar durchgeführt. Bildquelle: Haupt et al (2011)²⁹⁸.

4.2.3. B10 bindet Liganden aufgrund von Mustererkennung

Basierend auf den Daten in dieser Arbeit kann eine Hypothese für die sequenzunabhängige Bindung durch B10 formuliert werden, der zufolge B10 seine Liganden anhand eines spezifischen Oberflächenmusters erkennt.

Die Mustererkennung wurde ursprünglich als eine Eigenschaft von spezialisierten Rezeptoren des angeborenen Immunsystems definiert²¹¹. Diese Bindemoleküle weisen ein breites Spektrum an Liganden unterschiedlicher Stoffklassen auf, weshalb diese auch als sogenannte Multiliganden-Rezeptoren bezeichnet werden²¹². Eine Bindung von Liganden aufgrund von Mustererkennung ist nicht durch die bloße Präsenz einer einfachen Peptidsequenz oder einer chemischen Gruppe erklärbar²¹². Stattdessen ist die spezifische räumliche Organisation von bestimmten chemischen Gruppen entscheidend für eine Mustererkennung³²⁶.

B10 zeichnet sich, ebenso wie Mustererkennungsrezeptoren, durch die Fähigkeit zur Multiligandenbindung aus. Die in dieser Arbeit nachgewiesenen Liganden stammen aus unterschiedlichen Stoffklassen und umfassen Polypeptidketten, Polysaccharide und Nukleinsäuren (Abb. 3.14, 3.16). Die Relevanz elektrostatischer Interaktionen zeigt, dass B10 primär negativ geladene Gruppen der Aminosäure-Seitenketten in Amyloidfibrillen erkennt (Abb. 3.8, 3.9). Allerdings zeigt B10 keine signifikanten Interaktionen mit den getesteten globulär gefalteten Polypeptidketten, welche ebenfalls zahlreiche negativ geladene chemische Gruppen auf ihrer Oberfläche präsentieren (Abb. 3.2, 3.15). Dies impliziert, dass die bloße Präsenz von negativ geladenen Gruppen keine Erklärung für die B10-Spezifität liefert. Ebenso kann die fibrillenspezifische Erkennung durch B10 und andere Antikörper²⁶⁶ nicht durch das bloße Vorhandensein von β -Faltblatt-Strukturen erklärt werden (Kap. 3.1).

Die Basis für die Erkennung durch B10 erschließt sich durch die hoch regelmäßige, repetitive Struktur der Liganden, die dadurch charakteristische Muster auf der Oberfläche präsentieren, wie zum Beispiel eine spezifische Anordnung von chemischen Gruppen. Ein auffallendes Charakteristikum der B10-positiven Fibrillen ist die Verteilung der geladenen chemischen Gruppen. Die B10-positiven HET-s(218-289)-Fibrillen (pH 7,5)¹¹² weisen ein hoch reguläres Muster an Oberflächenladungen auf (Abb. 3.15). Diese Regularität ist ebenso in dem Strukturmodell von A β (1-42)-Fibrillen¹⁰⁴ zu erkennen (Abb. 3.15). Im Gegensatz dazu sind bei den getesteten globulär gefalteten Polypeptidketten die exponierten chemischen Gruppen unregelmäßig auf der Oberfläche verteilt (Abb. 3.15).

Eines dieser Muster präsentiert sich als hoch regelmäßiger Streifen mit negativer Ladung entlang der Fibrillenlängsachse. Im Zusammenhang mit all diesen Ergebnissen schließen wir, dass dieses anionische Ladungsmuster durch B10 erkannt wird. Des Weiteren zeigt sich, dass die Oberfläche von offensichtlich vielen, aber nicht von allen Amyloidfibrillen durch dieses Ladungsmuster gekennzeichnet ist (Abb. 3.14). Zusätzlich kann mit dieser Hypothese die Bindung von B10 an DNS und Heparin erklärt werden (Abb. 3.16).

Darüber hinaus zeigt B10 signifikante Übereinstimmungen zu einem natürlichen Mustererkennungsrezeptor namens RAGE²¹¹. RAGE bindet neben einer ganzen Reihe von glykosilierten Liganden auch die B10-Liganden Heparin²⁵², DNS²⁵³ und verschiedene Amyloidfibrillen²⁶¹. Das Spektrum an Amyloidfibrillen, das von B10 und RAGE erkannt wird ist nahezu identisch (Abb. 3.19). Des Weiteren weisen beide Bindemoleküle eine signifikante Anreicherung von basischen Aminosäuren in ihrer Binderegion auf (Abb. 3.17) und eine Abhängigkeit von elektrostatischen Wechselwirkungen^{256,257}. Ebenso kompetitieren RAGE und B10 um die Bindung von Amyloidfibrillen (Abb. 3.18). Diese signifikanten Übereinstimmungen liefern einen zusätzlichen Befund für einen Mustererkennungsmechanismus durch B10. Die minimalen Unterschiede in der Bindungsspezifität von RAGE und B10 lassen sich durch den Multidomänen-Aufbau von RAGE erklären. RAGE besteht aus drei extrazellulären Domänen (V, C1, C2), welche unterschiedliche Liganden-Spezifitäten aufweisen²⁵⁰. Diese Multidomänen-Bindung von RAGE könnte folglich die Ursache sein, dass RAGE zusätzlich zu den B10-positiven Amyloidfibrillen auch die B10-negativen Amyloidfibrillen des A β (16-22)- und A β (11-25)-Peptides erkennt (Abb. 3.19).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass alle diese Resultate das Konzept der Mustererkennung mit der konformationssensitiven Bindung von B10 an verschiedene Amyloidfibrillen verbinden. Diese Hypothese liefert eine neue Vorstellung von der konformationssensitiven Bindung eines Antikörpers an verschiedene Amyloidfibrillen. Da viele Amyloidfibrillen mit negativ geladenen Molekülen, wie Heparin oder Glykosaminoglykanen interagieren²⁹, wurde vermutet, dass Fibrillen ausgeprägte positiv geladene Oberflächeneigenschaften aufweisen. Darüber hinaus gab es bisher, neben den Strukturmodellen von A β -Fibrillen, die auf die Ausbildung einer negativ geladenen Oberflächenstruktur hindeuten^{104,130}, keine Hinweise, dass es während der Bildung von Amyloidfibrillen zu einer Anreicherung von negativ geladenen Aminosäuren kommt. Für einige Moleküle, beispielsweise für synthetische verzweigte Polyamine³⁴⁴, SAP²⁴⁵, CLAC²⁶⁵ oder Apolipoprotein E³⁴⁵, wurde vermutet, dass diese an negativ geladene

Bereiche von Amyloidfibrillen binden. Zusammen mit den Daten der vorliegenden Arbeit sprechen diese Beobachtungen für die Existenz einer ausgeprägten negativen Oberflächeneigenschaft in vielen Amyloidfibrillen, welche deren konformationssensitive Erkennung durch Bindemoleküle ermöglicht.

4.2.4 Strukturelle Grundlagen für die Präsentation spezifischer Oberflächenmuster in Amyloidfibrillen

Die Ausbildung und Präsentation eines spezifischen Oberflächenmusters in Amyloidfibrillen hängt von mehreren Faktoren ab:

- (a) Die strukturellen Gegebenheiten der gekreuzten β -Faltblatt-Struktur und des Polypeptid-Rückgrates
- (b) Die Sequenz der Polypeptidkette
- (c) Die unterschiedliche Organisation von β -Faltblättern
- (d) Die Anzahl und Anordnung der Protofilamente

Diese Faktoren erklären, warum globulär gefaltete Polypeptidketten oder einige Amyloidfibrillen kein entsprechendes Epitop präsentieren, das von B10 erkannt wird.

(a) Obwohl die chemischen Gruppen primär durch die Aminosäure-Seitenketten gebildet werden, hängt die Ausbildung eines Ladungsmusters in Amyloidfibrillen zwangsläufig von den strukturellen Gegebenheiten der gekreuzten β -Faltblatt-Struktur und des Polypeptid-Rückgrates ab, wie dem 4,7 Å-Abstand zwischen benachbarten β -Strängen⁴⁶ oder dem 6,5 Å- bis 7 Å-Abstand der Seitenketten entlang des Polypeptid-Rückgrates (Abb. 4.3a)³⁴⁶. Daher bildet die Struktur des Polypeptid-Rückgrates ein Gerüst, das die Aminosäuren und ihre chemischen Gruppen in ein flaches dreidimensionales Gitter platziert. Diese strukturelle Gegebenheit spiegelt sich in einer hoch regelmäßigen und in spezifischen Abständen wiederholenden Anordnung der Aminosäure-Seitenketten wider (Abb. 4.3a). Aufgrund dieser Periodizität präsentieren Amyloidfibrillen verschiedene geordnete Ladungsmuster auf der Oberfläche entlang der Fibrillenlängsachse^{104,347}.

Die Daten der vorliegenden Arbeit sprechen dafür, dass viele Amyloidfibrillen ein hoch geordnetes anionisches Muster auf ihrer Oberfläche präsentieren, welches durch B10 erkannt wird (Abb. 3.14, 3.15). Des Weiteren zeigen die Daten, dass sich die Oberfläche

von globulär gefalteten Polypeptidketten deutlich von der Oberfläche von Amyloidfibrillen unterscheidet. Globulär gefaltete Polypeptidketten weisen eine ungeordnete Verteilung von positiven, negativen und ungeladenen chemischen Gruppen auf (Abb. 3.15). Demzufolge präsentieren globulär gefaltete Polypeptidketten keine regelmäßigen Ladungsmuster auf der Oberfläche (Abb. 3.15). Dieser Zusammenhang erklärt, warum B10 eine konformationelle Spezifität für Amyloidfibrillen aufweist und nicht mit intrinsisch ungefalteten und globulär gefalteten Polypeptidketten interagiert (Abb. 3.2).

Des Weiteren kommt es infolge der regelmäßigen Organisation der Seitenketten in Amyloidfibrillen zur Ausbildung einer relativ flachen Fibrillenoberfläche (Abb. 4.3b). Im Gegensatz dazu erscheint die Oberfläche von globulär gefalteten Polypeptidketten unregelmäßig und gefurcht (Abb. 3.15). Diesbezüglich lässt sich schließen, dass die flache Oberfläche von Fibrillen eine bevorzugte Antigenoberfläche für die ebenfalls flache Binderegion von B10 darstellt (Abb. 3.4).

Aufgrund dieser Daten lässt sich schlussfolgern, dass die spezifischen Eigenschaften der gekreuzten β -Faltblatt-Struktur und die Struktur des Polypeptid-Rückgrates eine Grundlage für die konformationelle Spezifität von B10 für Amyloidfibrillen liefern.

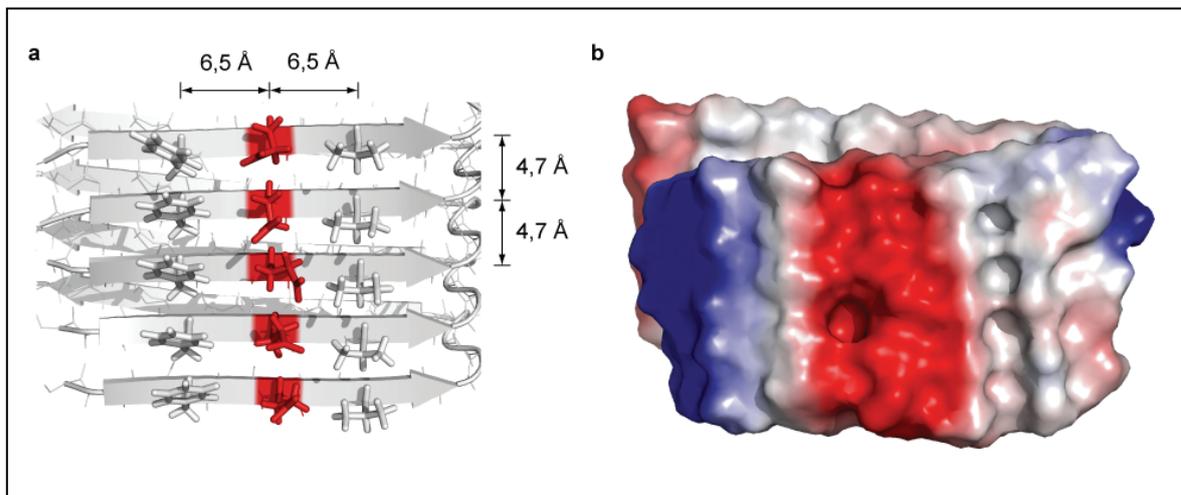


Abbildung 4.3. Abhängigkeit von spezifischen Ladungsmustern von den strukturellen Grundlagen von Amyloidfibrillen.

Beruhend auf den Abständen zwischen Seitenketten entlang des Polypeptid-Rückgrates (6,5 Å) und der Abstände zwischen benachbarten β -Strängen (4,7 Å), ergibt sich eine hoch regelmäßige Anordnung von chemischen Gruppen. Rot: negativ geladen, blau: positiv geladen. PDB-Zugangscode: 2BEG.PDB¹⁰⁴.

(b) Verschiedene Amyloidfibrillen bestehen aus Polypeptidketten, die sich in Bezug auf ihre Aminosäuresequenz grundlegend unterscheiden und daher auch im Anteil und der Verteilung von negativen, positiven und ungeladenen Aminosäuren differieren³. Deshalb präsentieren verschiedene Amyloidfibrillen diverse chemische Gruppen an unterschiedlichen Positionen der Oberfläche. Dadurch variieren die unmittelbaren Umgebungsbedingungen von chemischen Gruppen zwangsläufig, in Abhängigkeit von der zugrunde liegenden Polypeptidsequenz. Außerdem gibt es Amyloidfibrillen, denen aufgrund ihrer Polypeptidsequenz bestimmte chemische Gruppen fehlen, wie beispielsweise A β (34-42)-Fibrillen, die keine geladenen Reste aufweisen³⁴⁸.

Die in dieser Arbeit untersuchten Fibrillen, bestehen aus Polypeptidketten, die sich in ihrer Aminosäuresequenz signifikant voneinander unterscheiden (Anhang Kap. 8.2) und mindestens eine negativ geladene Aminosäure enthalten (Tab. 3.1). Trotz der Sequenzunterschiede der zugrunde liegenden Polypeptidketten und den damit zu erwartenden unterschiedlichen Oberflächenmustern bindet B10 viele, aber nicht alle der getesteten Amyloidfibrillen (Abb. 3.12, 3.14). Im Zusammenhang mit der fehlenden Interaktion mit globulär gefalteten Polypeptidketten zeigen die Daten, dass die bloße Präsenz von negativ geladenen Aminosäuren in der zugrunde liegenden Polypeptidkette nicht die Bindung von B10 erklären kann. Vielmehr ist ein spezifisches räumliches Muster der negativ geladenen Aminosäuren der Polypeptidketten in Amyloidfibrillen für die Bindung von B10 notwendig. Dieses Muster tritt offensichtlich bei der Mehrheit der untersuchten Fibrillen auf (Abb. 3.12, 3.14). Besonders interessant ist die Bindung von B10 an Fibrillen der G-Helix-Polypeptidkette, welche einen amidierten C-Terminus aufweist und somit nur eine negativ geladene chemische Gruppe je Polypeptidkette besitzt (Abb. 3.14, Tab. 3.1). Die chemische Modifizierung der jeweils einen Carboxylgruppe der Polypeptidketten von G-Helix-Fibrillen führt zu einer kompletten Reduktion der Bindung von B10AP (Abb. 4.2). Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass bereits eine negativ geladene Aminosäure pro Polypeptidkette ausreicht, um ein B10-Epitop in Amyloidfibrillen zu präsentieren. Im Zusammenhang mit der Erkennung der meisten getesteten Amyloidfibrillen durch B10 und der Bindung von DNS und Heparin, welche aus nicht-proteinösen Grundeinheiten aufgebaut sind, lässt sich ableiten, dass B10 Fibrillen relativ unabhängig von deren zugrunde liegender Polypeptidsequenz bindet.

Durch den unterschiedlichen Anteil an negativ geladenen Aminosäuren in den verschiedenen Polypeptidketten unterscheidet sich ebenfalls die Anzahl an potentiellen anionischen Ladungsmustern auf der Oberfläche von verschiedenen Amyloidfibrillen. Damit korrespondiert sowohl die Menge, als auch die Dichte an B10-Epitopen auf der Oberfläche. Dieser Sachverhalt liefert eine Erklärung für die zu beobachtenden Unterschiede in der B10-Bindung der verschiedenen B10-positiven Fibrillen (Abb. 3.14).

Abschließend lässt sich feststellen, dass die einer Fibrille zugrunde liegende Polypeptidsequenz insofern einen Einfluss auf die Bindung von B10 hat, als das eine negativ geladene Aminosäure enthalten sein muss, um ein B10-Epitop auf der Fibrillenoberfläche präsentieren zu können. Darüber hinaus ist offenbar der direkte Einfluss der Sequenz der Polypeptidkette auf die Präsentation eines von B10 erkannten Ladungsmusters in Amyloidfibrillen von untergeordneter Bedeutung.

(c) Die Organisation der gekreuzten β -Faltblätter kann sich zwischen verschiedenen Amyloidfibrillen unterscheiden. Während einige Amyloidfibrillen eine parallele β -Faltblatt-Struktur aufweisen, bestehen andere Fibrillen aus antiparallelen β -Faltblättern (Tab. 3.1)¹³⁴. Deckungsgleich organisierte, parallele β -Faltblätter sind bekannt für eine Wiederholung identischer Aminosäuren im Abstand von 4,7 Å entlang der Fibrillenlängsachse, während bei antiparallelen β -Faltblättern die Abstände etwa dem doppelten Wert entsprechen (Abb. 4.4)³⁴⁹. Dadurch werden bei deckungsgleichen, parallelen β -Faltblättern homogene Ladungsmuster entlang der Fibrillenlängsachse präsentiert (Abb. 4.4a), während bei antiparallelen β -Faltblättern durch die alternierende Abfolge von zwei Aminosäuren inhomogene Ladungsmuster entlang der Fibrillenlängsachse auftreten können (Abb. 4.4b). Somit unterscheiden sich die Oberflächenmuster von beiden Organisationen signifikant voneinander.

Das Vorhandensein von deckungsgleichen, parallelen β -Faltblättern könnte eine mögliche strukturelle Voraussetzung für die Erkennung von Fibrillen durch B10 sein. So zeigen die Resultate dieser Arbeit, dass die B10-Interaktion mit Fibrillen aus Peptidfragmenten sich vollkommen von der Interaktion mit Fibrillen aus Vollängen-Polypeptidketten unterscheiden kann (Abb. 3.14, Tab. 3.1). Für B10 waren keine signifikanten Interaktionen mit A β (16-22)- oder A β (11-25)-Fibrillen zu beobachten (Abb. 3.14). Dagegen binden Fibrillen aus Vollängen-A β (1-40) und -A β (1-42) sehr stark an B10 (Abb. 3.14). In diesem Kontext lassen Daten aus Festkörper-NMR-Experimenten schließen, dass die genannten Fibrillen signifikante strukturelle Unterschiede aufweisen.

Während für A β (11-25)- und A β (16-22)-Fibrillen eine antiparallele β -Faltblatt-Organisation diskutiert wird, sind A β (1-40) und A β (1-42)-Fibrillen vermutlich aus parallelen β -Faltblättern organisiert^{96,104} (Tab. 3.1). Dementsprechend ist anzunehmen, dass sich deren präsentierte Ladungsmuster signifikant voneinander unterscheiden. Zusätzlich impliziert FTIR-Spektroskopie von PABPN1-(+7)Ala-Fibrillen und A β (1-40)-Oligomeren, dass diese eine antiparallele β -Faltblatt-Organisation aufweisen (Abb. 3.1, Tab. 3.1). Beide Aggregate werden nicht durch B10 erkannt (Abb. 3.1, 3.14). Diese Daten lassen vermuten, dass B10 deckungsgleiche, parallele und antiparallele β -Faltblätter unterscheiden kann. In Übereinstimmung dazu werden HETs(218-289)-Fibrillen (pH 7,5) durch B10 erkannt (Abb. 3.14), welche ebenfalls deckungsgleiche, parallele β -Faltblätter aufweisen (Tab. 3.1)¹¹².

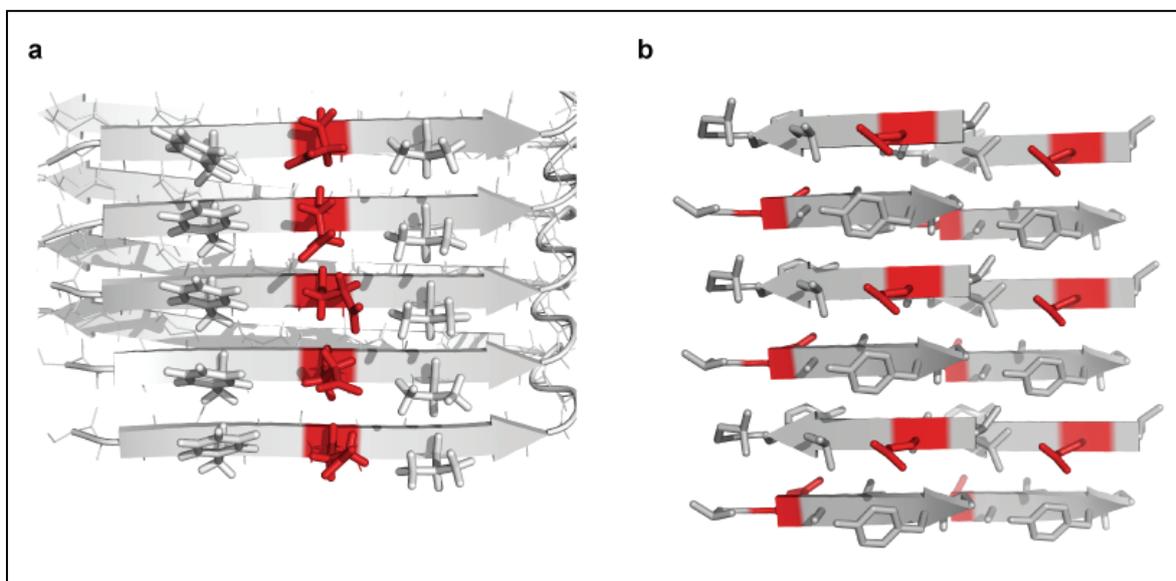


Abbildung 4.4. Vergleich von paralleler und antiparalleler β -Faltblatt-Organisation in Amyloidfibrillen.

Darstellung einer deckungsgleichen parallelen (a) und antiparallelen β -Faltblatt-Organisation (b). Die Anordnung der negativ geladenen Aminosäuren (rot) und damit das Ladungsmuster auf der Oberfläche unterscheiden sich zwischen beiden strukturellen Organisationen signifikant voneinander. PDB-Zugangscode: 2BEG.PDB¹⁰⁴, 2OMQ.PDB⁴⁴.

Eine Einschränkung dieser Schlussfolgerung ergibt sich durch das Fehlen von atomaren Strukturen fast aller zurzeit bekannten Amyloidfibrillen. Dadurch basiert diese Hypothese auf der Grundlage von sehr wenigen strukturellen Informationen über die getesteten Fibrillen. Des Weiteren ist mit FTIR-Spektroskopie offenbar keine eindeutige Interpretation für eine antiparallele β -Faltblatt-Organisation möglich (Kap. 1.4.4)^{88,89,92}. So weisen in manchen Fällen Amyloidfibrillen mit einer parallelen β -Faltblatt-Struktur ein zusätzliches Amid-I-Maximum bei etwa 1690 cm^{-1} auf, wie beispielsweise HET-s(218-289)-Fibrillen (pH 7,5)^{112,133}. Somit werden für einen eindeutigen Nachweis

einer Präferenz von B10 für deckungsgleiche, parallele β -Faltblätter in Amyloidfibrillen weitere Daten mit spezifischen Strukturen benötigt, wie beispielsweise die Untersuchung der Interaktion von B10 mit Mikrokristallen. Schlussfolgernd würde eine mögliche Spezifität von B10 gegenüber deckungsgleichen, parallelen β -Faltblatt-Strukturen in Amyloidfibrillen ein weiteres Argument für die Erkennung eines spezifischen Musters seitens B10 sein.

(d) Die fibrilläre Gesamtstruktur von verschiedenen Amyloidfibrillen kann unter anderem aufgrund verschiedener Anzahlen und Anordnungen von Protofilamenten differieren (Kap. 1.4.1). In Abhängigkeit von diesen Parametern unterscheiden sich sowohl die exponierte Oberfläche, als auch die exponierten Oberflächenmuster. Dadurch kann es zu signifikanten Unterschieden in der Anzahl von präsentierten Epitopen oder sogar zur vollständigen Maskierung von Epitopen kommen. Da alle untersuchten Amyloidfibrillen in dieser Arbeit potentiell ein B10-Epitop präsentieren können (alle Polypeptidketten enthalten negativ geladene Aminosäuren), liefert dieser Zusammenhang eine alternative Erklärung, warum nicht alle Amyloidfibrillen durch B10 erkannt werden (Abb. 3.14). Möglicherweise bestehen einige B10-negative Amyloidfibrillen aus mehreren Protofilamenten, die ein B10-Epitop auf der Oberfläche präsentieren, welches jedoch durch die Anordnung der Protofilamente in der Fibrille maskiert ist. Darüber hinaus ist die Abhängigkeit der präsentierten Ladungsmuster von der Anzahl und der Anordnung der Protofilamente konsistent mit der Beobachtung, dass sich die B10-positiven Fibrillen in der B10-Färbung unterscheiden (Abb. 3.14).

4.2.5 Strukturelle Studien zur Charakterisierung des B10-Epitops

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass B10 ein hoch regelmäßiges, anionisches Ladungsmuster entlang der Längsachse von Amyloidfibrillen erkennt (Abb. 3.15). Im Zusammenhang damit legte die Polypeptidsequenz der B10-positiven G-Helix-Fibrillen nahe, dass dieses Epitop aus der regelmäßigen Abfolge von nur einer negativ geladenen Aminosäure gebildet werden kann (Abb. 3.14, Tab. 3.1). Um das B10-Epitop in A β (1-40)-Fibrillen zu lokalisieren, wurde eine ortsspezifische Mutagenese des A β (1-40)-Peptides durchgeführt (Abb. 3.11). Die Mutagenese führte jedoch zu strukturellen Veränderungen der Fibrillen und ließ somit keine eindeutige Lokalisation des B10-Epitops zu. Allerdings zeigten die Daten, dass der

Austausch einer negativ geladenen Aminosäure im A β (1-40)-Peptid zu einer Reduktion von maximal 50 % der B10-Bindung von Wildtyp-Fibrillen führt (Abb. 3.11). Diese Beobachtung lässt die Vermutung zu, dass mehrere negativ geladene Aminosäuren eines A β (1-40)-Peptides an der Bildung von mehreren anionischen Ladungsmustern an verschiedenen Positionen der Fibrilloberfläche beteiligt sind. Diese Hypothese ist konsistent mit der Annahme, dass bereits eine negativ geladene Aminosäure je Polypeptidkette ausreicht, um ein B10-positives Ladungsmuster zu präsentieren.

Des Weiteren versuchten wir ein B10-Epitop auf der Oberfläche des globulären β -Helix-Proteins Pektat-Lyase Pel-15 zu rekonstituieren (Kap. 3.2.7). Dazu wurde ein homogenes, anionisches Muster aus vier oder sechs Glutaminsäuren entlang der Längsachse der β -Helix von Pel-15 eingeführt (Abb. 3.20). Dieser Ansatz führte im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht zu einer Bindung von B10 an eine der Pel-15-Varianten (Abb. 3.23). Eine Erklärung dafür könnte die Länge des eingeführten Musters liefern. Im Idealfall deckt ein B10-Molekül etwa sieben A β (1-40)-Peptide entlang der Längsachse von A β (1-40)-Fibrillen ab (Kap. 1.10.4). Sowohl aus den Bindungsdaten von B10 an A β (1-40)-Fibrillen (Kap. 1.10.4), als auch aus der Aggregationskinetik von B10 mit A β (Kap. 3.3.2) konnte eine molare Stöchiometrie der Bindung von 1:10 (B10:A β) ermittelt werden. Im Gegensatz dazu überspannt das anionische Ladungsmuster in den generierten Pel-15-Varianten eine Fläche von maximal sechs β -Faltblättern (Abb. 3.20), was in etwa sechs A β -Peptiden entlang einer A β (1-40)-Fibrille entspricht. Somit reicht möglicherweise die Länge der generierten anionischen Muster nicht aus, um eine stabile Bindung von B10 zu ermöglichen.

In weiterführenden strukturellen Studien zur Charakterisierung des B10-Epitops in A β (1-40)-Fibrillen könnten Festkörper-NMR-Untersuchungen wichtige Hinweise auf die Binderegion von B10 liefern. Entsprechend den Modellen von A β (1-40)- oder A β (1-42)-Fibrillen liegt der N-Terminus eines Teils oder aller Polypeptidketten in diesen Amyloidfibrillen als eine flexible Zufallsknäuel-Struktur vor, während die zentralen Aminosäuren der Polypeptidketten in stabileren Strukturbereichen, wie beispielsweise den β -Faltblatt-Regionen liegen (Abb. 1.9, 1.10)^{62,63,100,104}. Der flexible N-Terminus umfasst in etwa die ersten 10-12 Aminosäuren des A β -Peptides^{100,123,130}. Dieses weist insgesamt sechs negativ geladene Aminosäuren auf, wobei vier davon in dem wahrscheinlich strukturell flexiblen N-Terminus der Polypeptidketten in A β -Fibrillen liegen. Um zu analysieren, ob B10 an diesen Bereich der Fibrille bindet, könnte beispielsweise Festkörper-NMR eingesetzt werden. Damit konnten bereits strukturell flexible von stabileren Bereichen in

Amyloidfibrillen unterschieden^{100,350,351} oder die Stabilisierung von strukturell flexiblen Bereichen durch eine Bindung von Antikörpern beobachtet werden³⁵². Dementsprechend würde man bei einer Bindung von B10 an den Bereich der Fibrille, der durch die flexiblen N-Termini der Polypeptidketten gebildet wird, Unterschiede in der Stabilität bei An- und Abwesenheit von B10 erwarten. Darüber hinaus könnte Flüssigphasen-NMR-Spektroskopie kombiniert mit Wasserstoffaustausch^{53,102-104} von Amyloidfibrillen in An- und Abwesenheit von B10 bei der Lokalisierung dessen Epitops in A β (1-40)-Fibrillen helfen.

Von einer ganzen Reihe unterschiedlicher Peptidfragmente ist die Bildung von Mikrokristallen bekannt^{44,135}. Diese weisen die typischen Charakteristika von Amyloidfibrillen auf und zeigen eine große Diversität in Bezug auf Strukturen und Sequenzen^{44,135,353}. Der große Vorteil von Mikrokristallen ist die Anwendbarkeit von Röntgenkristallisation und damit die Auflösung der atomaren Struktur. Mikrokristalle erfüllen somit grundlegende Kriterien, die für eine erfolgreiche Bestimmung des Epitops von B10 nötig sind. Nach einer Analyse verschiedenster Mikrokristalle auf Bindung von B10, könnte eine Ko-Kristallisation oder ein Tränken von bereits gebildeten Kristallen mit B10 zu einer erfolgreichen Antikörper-Liganden-Struktur führen.

4.3. Die funktionelle Aktivität von B10

4.3.1. Der Mechanismus der Aggregation

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss B10 auf die Bildung von Amyloidfibrillen hat. Die Analyse der Aggregation von A β (1-40) zeigte, dass sich das von B10 erkannte Epitop bereits vor dem Auftreten von ThT-positiven Amyloidfibrillen bildet (Abb. 3.24). In Übereinstimmung dazu verhindert B10 in Aggregationsexperimenten mit A β (1-40) die Bildung von Amyloidfibrillen und stabilisiert stattdessen fibrilläre Strukturen, welche als Protofibrillen bezeichnet werden (Abb. 3.25, 3.26). Diese wurden ursprünglich als die ersten fibrillären Intermediate der Aggregationsreaktion definiert und werden gewöhnlich als die direkten Vorläufer von Amyloidfibrillen angesehen^{61,166,167,342}. Ob Amyloidfibrillen primär durch eine Verlängerung von Protofibrillen (Elongation), durch deren laterale Assoziation oder durch eine strukturelle Reorganisation nach deren sekundärer Dissoziation gebildet werden ist nicht geklärt (Abb. 4.5)^{61,167,182,342,354}. Im Einklang mit den genannten Mechanismen kann

die Stabilisierung von Protofibrillen durch B10 mit einer Behinderung der Bildung von Amyloidfibrillen erklärt werden (Abb. 4.1). Diesbezüglich lassen die in dieser Arbeit gewonnenen Daten vermuten, dass B10 die Bildung von Amyloidfibrillen durch die Inhibition einer sekundären Dissoziation oder einer lateralen Assoziation von Protofibrillen verhindert (Abb. 4.5). B10 weist keine Interaktion mit monomeren Polypeptidketten auf (Abb. 3.2) und bindet aufgrund der Lage und Beschaffenheit seines konformationellen Epitops (Abb. 3.15) wahrscheinlich nicht an die freien Enden von Protofibrillen. Daher ist zu vermuten, dass eine Elongation von Protofibrillen durch eine Assoziation von monomeren Polypeptidketten oder anderen Protofibrillen an deren freien Enden in diesem Fall nicht der vorherrschende Mechanismus der Umwandlung von Protofibrillen zu Amyloidfibrillen ist (Abb. 4.5). Vielmehr ist anzunehmen, dass die seitliche Bindung von B10 an der Fibrille die Dissoziation einzelner oder mehrerer Polypeptidketten von der Protofibrille oder eine laterale Assoziation der Protofibrillen verhindert (Abb. 4.5). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass B10 die Bildung von Amyloidfibrillen wahrscheinlich durch die Inhibition einer Dissoziation oder lateralen Assoziation von Protofibrillen unterbindet.

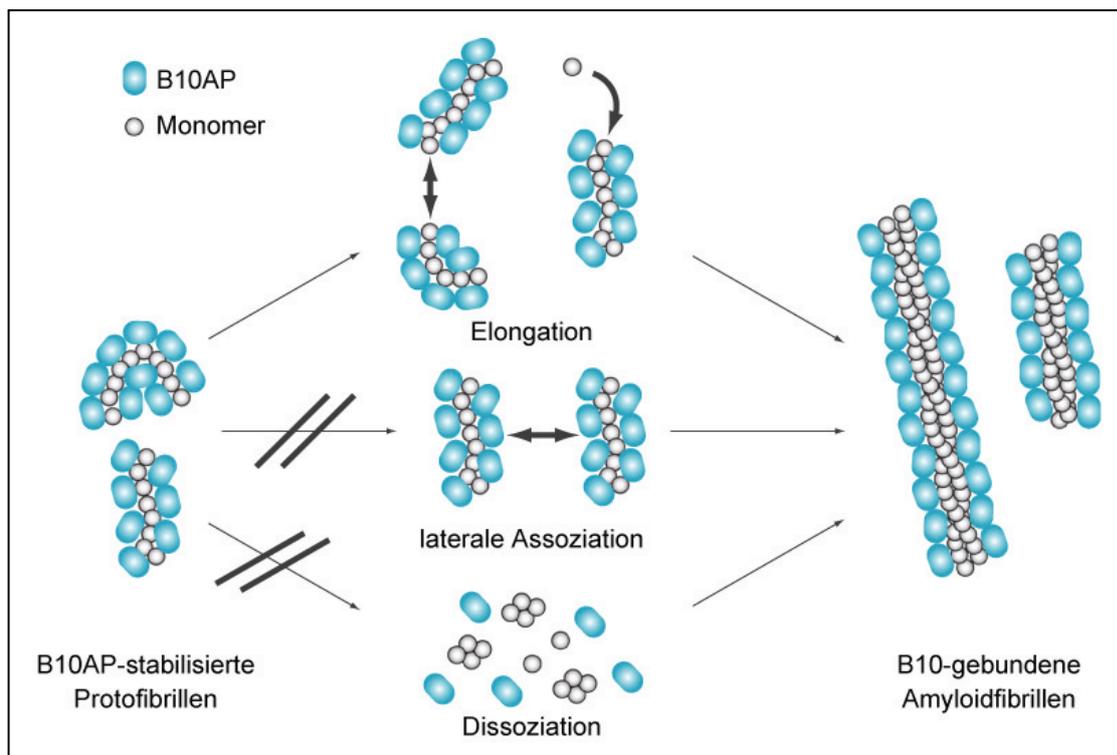


Abbildung 4.5. Einfluss von B10AP auf die Mechanismen der Bildung von Amyloidfibrillen aus Protofibrillen.

Die Umwandlung von Protofibrillen zu Amyloidfibrillen wird durch B10 verhindert, da dieser vermutlich mit einer lateralen Assoziation oder einer sekundären Dissoziation von Protofibrillen konkurriert. Dagegen ist anzunehmen, dass B10 keinen Einfluss auf die Elongation von Protofibrillen hat. Bildquelle: Scheidt et al (2011)³⁵⁵.

4.3.2. Strukturelle Studien zu B10AP-stabilisierten Protofibrillen

Intermediäre Aggregationspezies zeichnen sich durch eine große Heterogenität, Instabilität und Kurzlebigkeit aus^{3,154}. Das erschwert deren Identifizierung, Isolierung und Charakterisierung. In seltenen Fällen ermöglichten spezifische Lösungsbedingungen oder Moleküle die Stabilisierung von Intermediaten. So können zum Beispiel durch 10 % HFIP lösliche Oligomere¹⁴⁹ oder durch Calmidazoliumchlorid A β (1-40)-Protofibrillen¹⁷⁹ stabilisiert werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass B10 A β (1-40)-Protofibrillen über einen längeren Zeitraum stabilisiert (Kap. 3.3.2). Damit bietet B10 die einzigartige Möglichkeit mit A β (1-40)-Protofibrillen ein kurzlebige Intermediat der Aggregation strukturell zu analysieren. Auf dieser Grundlage konnten wir die Protofibrillen beispielsweise mit Röntgenbeugung untersuchen und nachweisen, dass diese eine amyloidähnliche β -Faltblatt-Struktur aufweisen (Abb. 3.26). Trotzdem zeigen sie signifikante Unterschiede zu Amyloidfibrillen, wie zum Beispiel eine schwache Interaktion mit ThT oder KR und eine geringere proteolytische Stabilität (Abb. 3.25, 3.26). Zusammen mit der Tatsache, dass sowohl Protofibrillen als auch Amyloidfibrillen durch B10 erkannt werden deuten diese Daten darauf hin, dass beide Aggregate in grundlegenden strukturellen Eigenschaften übereinstimmen, sich allerdings in spezifischen Merkmalen unterscheiden.

Detailliertere Untersuchungen von B10AP-stabilisierten Protofibrillen können unter anderem mit Festkörper-NMR durchgeführt werden. Diesbezüglich lieferten bereits erste Untersuchungen an selektiv markierten B10AP-stabilisierten Protofibrillen weitere Erkenntnisse zu den strukturellen Unterschieden von Protofibrillen und Amyloidfibrillen³⁵⁵. Die Analyse zeigte, dass die β -Faltblätter in Protofibrillen und Amyloidfibrillen zwar durch die gleichen Bereiche der A β (1-40)-Polypeptidketten gebildet werden, die β -Faltblätter in Amyloidfibrillen allerdings deutlich mehr Aminosäuren beinhalten. Diese und weitere Daten lassen schließen, dass eine strukturelle Reorganisation der β -Faltblätter bei der Umwandlung von Protofibrillen zu Amyloidfibrillen stattfindet^{3,333,355}. Die in der vorliegenden Arbeit dokumentierten Unterschiede zwischen Amyloidfibrillen und Protofibrillen sind mit dieser Schlussfolgerung konsistent (Kap. 3.3.3). Interessanterweise zeigen B10AP-stabilisierte Protofibrillen einen signifikanten Anstieg der strukturellen Stabilität (Ordnungsparameter S) der beiden N-terminalen Aminosäuren (Abb. 4.6)³⁵⁵. Im Zusammenhang mit der negativ geladenen Seitenkette der ersten Aminosäure, lässt sich mutmaßen, dass deren Stabilität durch die

Bindung von B10 in dieser Region hervorgerufen wird³⁵⁵. Dies könnte ein erster Hinweis auf eine Binderegion von B10 in Protofibrillen und möglicherweise auch in Amyloidfibrillen sein. Allerdings sind diesbezüglich weitere Untersuchungen nötig.

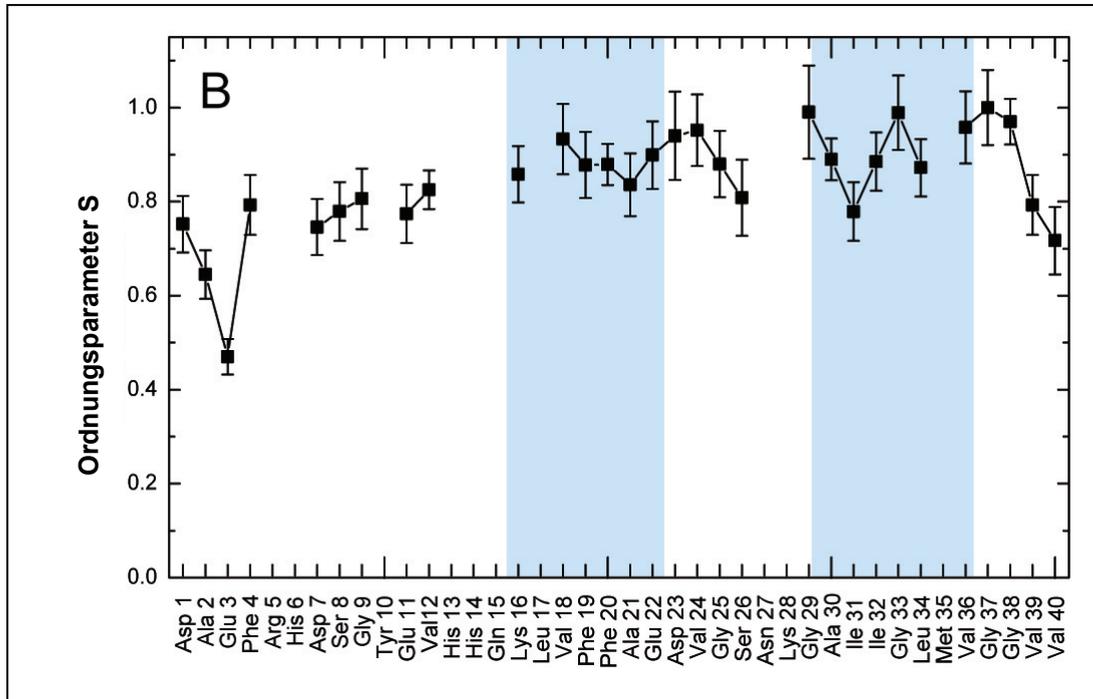


Abbildung 4.6. Strukturelle Flexibilität der A β (1-40)-Polypeptidkette in B10AP-stabilisierten Protofibrillen.

Darstellung der strukturellen Flexibilität (ausgedrückt als Ordnungparameter S) der A β (1-40)-Polypeptidketten in B10AP-stabilisierten Protofibrillen. Je größer S ist, desto strukturell stabiler ist eine Region. Die blauen Balken stellen die β -Faltblatt-Regionen dar. Bildquelle: Scheidt et al. (2011)³⁵⁵.

4.3.3. Studien zur funktionellen Aktivität von B10

Die Relevanz unterschiedlicher Aggregate für die Pathogenese von Amyloidosen ist nicht vollständig geklärt und wird kontrovers diskutiert^{3,14,23,147,148}. Während einige Studien dafür sprechen, dass primär Amyloidfibrillen eine zytotoxische Wirkung aufweisen^{20,21,186,187,189}, gibt es zunehmend Hinweise, dass primär die intermediären Aggregate, wie zum Beispiel lösliche Oligomere oder Protofibrillen, eine toxische Wirkung auf Zellen haben^{24,147-152}. Diesbezüglich bleibt festzustellen, dass nicht generell eine Spezies von Aggregaten die Ursache für pathologische Veränderungen sein muss und die krankheitsverursachenden Aggregate vermutlich von Krankheit zu Krankheit differieren^{23,147,189}. Daneben wird das Zusammenspiel mehrerer pathologischer Ereignisse, die gleichzeitig durch verschiedene Aggregate hervorgerufen werden können, ebenfalls als eine Ursache für zelluläre Fehlfunktion und Zelltod diskutiert^{147,190,195}. Im Rahmen dieser

Arbeit konnte gezeigt werden, dass B10 ein einzigartiges Proteinwerkzeug darstellt, das es erlaubt, einen spezifischen Schritt im A β -Aggregationsprozess anzusteuern (Kap. 3.3.2, 3.3.3). Damit ist die Grundlage geschaffen, um in weiteren Versuchen die Bedeutung von Protofibrillen oder Amyloidfibrillen und des Aggregationsprozesses für die Pathogenese von Amyloidosen zu untersuchen.

In Studien mit Antikörpern konnten unter anderem folgende Effekte auf den Aggregationsprozess oder die pathologische Wirkung von Aggregaten beobachtet werden: (1.) die direkte Disaggregation von Fibrillen^{329,332,337,338,340}, (2.) die Neutralisierung der Zytotoxizität^{149,276,330,336,356-359}, (3.) der *Peripheral Sink*-Mechanismus³⁶⁰⁻³⁶², (4.) die Stimulation der Phagozytose durch Mikroglia^{269,334,335,339}.

(1.) Von sequenzspezifischen und konformationssensitiven Antikörpern, die spezifisch den nativen Zustand der Polypeptidkette stabilisieren, wurde gezeigt, dass diese die Disaggregation von bereits gebildeten Amyloidfibrillen induzieren können^{329,332,337,338,340}. Dagegen ist im Zusammenhang mit fibrillenspezifischen Antikörpern anzunehmen, dass diese Amyloidfibrillen eher stabilisieren, als deren Disaggregation herbeizuführen. In Übereinstimmung dazu konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass B10 nicht zu einer signifikanten Disaggregation von bereits gebildeten Amyloidfibrillen führt (Abb. 3.28). Somit unterscheidet sich B10 von den oben genannten Antikörpern und zeigt im Zusammenhang mit diesem Mechanismus keine funktionelle Aktivität.

(2.) Als ein pathologischer Mechanismus der Zytotoxizität von Aggregaten wird eine Interaktion mit Membranen diskutiert, wodurch wahrscheinlich vor allem eine Permeabilisierung der Membran hervorgerufen wird^{22,24,25,196-198,363}. Daneben werden aber auch Interaktionen mit Rezeptoren diskutiert^{24,204-206}, wobei unter anderem Mustererkennungsrezeptoren eine Rolle in der Pathogenese von Amyloidosen zugeschrieben wird^{213,215}. Durch die Bindung von B10 an Protofibrillen oder Amyloidfibrillen könnten die für den pathologischen Mechanismus relevanten Bereiche maskiert und damit für eine Interaktion mit Zellmembranen oder Rezeptoren unzugänglich gemacht werden. Diesbezüglich konnten in der vorliegenden Arbeit bereits erste Hinweise auf einen Effekt von B10 erbracht werden. Wir konnten zeigen, dass B10 signifikante Übereinstimmungen mit dem Mustererkennungsrezeptor RAGE aufweist und mit diesem um die Bindung von Amyloidfibrillen kompetitiert (Kap. 3.6.2). RAGE ist in Phagozyten, Neuronen und Endothel-Zellen bei Patienten mit Alzheimer-Krankheit und einigen systemischen Amyloidosen überexprimiert^{254,255,258,259}. In diesem Kontext induziert RAGE

vermutlich oxidativen Stress²⁵⁴ oder aktiviert NF- κ B²⁵⁴ und die Expression des Makrophagen-Kolonie-Stimulationsfaktors²⁶⁰. Dies führt unter anderem zur Aktivierung von Makrophagen oder zur Induktion von Apoptose in Neuronen^{255,261}. Somit eröffnet sich durch B10 die Möglichkeit, die Effekte der Interaktion von Amyloidfibrillen mit Rezeptoren am Beispiel von RAGE zu untersuchen. Zusätzlich kann die Interaktion von B10 mit Protofibrillen und Amyloidfibrillen bei der Suche und Identifizierung von spezifischen Rezeptoren für diese Aggregate helfen. Darüber hinaus ist die Konkurrenz von B10 und RAGE um Amyloidfibrillen auch aus immuntherapeutischer Sicht interessant. Für die extrazelluläre Liganden-Bindedomäne von RAGE (sRAGE) wurde gezeigt, dass diese mit RAGE um die Bindung von Amyloidfibrillen kompetitiert und zu einer Reduktion von Amyloidablagerungen führt²¹³. In diesem Zusammenhang ist ein ähnlicher Effekt von B10 denkbar.

(3.) Die *Peripheral Sink*-Hypothese geht davon aus, dass die Bindung von im Blut zirkulierendem A β zu einem Netto-Ausstrom von A β aus dem Gehirn in das Blut führt. Dadurch kommt es zu einer Erniedrigung der Konzentration an gelöstem A β im Gehirn und damit zu einer indirekten Auflösung von Amyloidfibrillen. Aufgrund der fehlenden Interaktion mit disaggregiertem A β -Peptid und A β -Oligomeren ist im Zusammenhang mit diesem Mechanismus kein Erkenntnisgewinn durch B10 zu erwarten.

(4.) Die Phagozytose von Aggregaten durch Mikroglia wird mit einer rezeptorvermittelten Stimulation durch Antikörper mit einem intakten Fc-Teil in Verbindung gebracht^{335,362,364-366}. Diese Zellen können mit dem sogenannten Fc-Rezeptor an den Fc-Teil von Antikörpern binden (Kap. 1.9), wodurch eine inflammatorische Reaktion in den Zellen induziert wird²⁸⁰. In Übereinstimmung dazu konnten Antikörperfragmente ohne Fc-Teil keine Stimulation von Mikroglia oder eine Auflösung von Amyloidablagerungen induzieren³³⁹. Durch Kopplung von B10 an einen Fc-Teil wäre dieser vermutlich in der Lage, die Phagozytose von Protofibrillen und Amyloidfibrillen zu induzieren. Dadurch könnten mit B10 der Einfluss von Protofibrillen und Amyloidfibrillen auf die Pathogenese von Amyloidosen untersucht werden. Zusätzlich könnte dieser Ansatz potentiell relevant für die Immuntherapie sein. Die vorliegende Arbeit zeigte, dass B10-gebundene Protofibrillen leichter proteolytisch verdaut werden als Amyloidfibrillen (Abb. 3.26). Daher ist anzunehmen, dass die Degradationsmechanismen von Zellen B10-gebundene Protofibrillen leichter beseitigen können als Amyloidfibrillen. Somit könnte B10 durch die Inhibition der Bildung von Amyloidfibrillen und der gleichzeitigen Stabilisierung von Protofibrillen die zellulären Abbaumechanismen unterstützen.

Allerdings kann aufgrund der zytotoxischen Eigenschaften von Protofibrillen nicht angenommen werden, dass deren Stabilisierung ein wünschenswerter Zustand ist.

Schlussfolgernd lässt sich feststellen, dass B10 aufgrund seiner funktionellen Aktivität einen Beitrag zur Aufklärung der pathologischen Mechanismen von Protofibrillen und Amyloidfibrillen liefern kann. Dabei könnten Erkenntnisse zu den Interaktionen der beiden Aggregate mit Zellmembranen oder Mustererkennungsrezeptoren und deren Einfluss auf die Pathogenese von Amyloidosen gewonnen werden. Darüber hinaus beinhalten diese Beiträge gleichzeitig eine immuntherapeutische Relevanz der funktionellen Aktivität von B10.

5. Zusammenfassung

Die Bildung von fibrillären Aggregaten, die als Amyloidfibrillen bezeichnet werden, ist eine intrinsische Eigenschaft von Polypeptidketten. Das gemeinsame strukturelle Merkmal aller Amyloidfibrillen ist die sogenannte gekreuzte β -Faltblatt-Struktur. Diese spezifische β -Faltblatt-Konformation unterscheidet Amyloidfibrillen von nativ gefalteten Polypeptidketten. Das Auftreten von Amyloidfibrillen im menschlichen Körper ist mit einer Reihe schwerwiegender Krankheiten verbunden, wie beispielsweise der Alzheimer-Krankheit, Diabetes mellitus Typ 2 oder der Kreuzfeldt-Jakob-Krankheit. Die klinische Diagnose von Amyloidosen und die Entwicklung von therapeutischen Strategien beruhen auf der Grundlage der Erkennung von Amyloidfibrillen, oder ihren strukturellen Vorläufern, oder der Inhibition der Bildung von Amyloidfibrillen durch spezifische Moleküle. Für die Entwicklung und Anwendung von Immunotherapien spielen insbesondere Antikörper eine wichtige Rolle. Allerdings sind die molekularen Grundlagen der spezifischen Erkennung von Amyloidfibrillen durch Antikörper bislang kaum untersucht. Die vorliegende Arbeit trägt zur Klärung dieser Frage am Beispiel der kameliden Antikörperdomäne B10 bei.

B10 wurde mit einer Reihe komplementärer biochemischer und biophysikalischer Methoden strukturell und funktionell analysiert. B10 unterscheidet Amyloidfibrillen des Alzheimer A β -Peptides von löslichen A β -Oligomeren und disaggregiertem A β -Peptid. Die konformationelle Spezifität von B10 beruht auf elektrostatischen Wechselwirkungen und lässt sich nicht durch strukturelle Charakteristika erklären, die in globulär gefalteten oder intrinsisch ungefalteten Polypeptidketten auftreten. Interessanterweise bindet B10 neben A β -Fibrillen eine ganze Reihe weiterer Amyloidfibrillen, sowie die polyanionischen Biopolymere Heparin und DNS. Zusätzlich weist B10 enge funktionelle Gemeinsamkeiten zu natürlichen Mustererkennungsrezeptoren auf. Diese Zusammenhänge führen zur Formulierung einer Hypothese, die die Bindung von B10 und möglicherweise von anderen konformationssensitiven Antikörpern an Amyloidfibrillen erklärt. Demzufolge erkennt B10 seine Liganden aufgrund eines hoch geordneten und regelmäßigen anionischen Musters auf der Oberfläche. Dieses Muster findet sich bei vielen, aber nicht allen Amyloidfibrillen und reflektiert die zugrunde liegende regelmäßige und hoch geordnete Struktur dieser Biopolymere. Die Antigenspezifität von B10 beruht also auf einem Mustererkennungs-Mechanismus. Diese Resultate eröffnen eine ganze Reihe weiterer

Experimente zur Klärung des molekularen Mechanismus der Bildung von Amyloidfibrillen, deren Struktur und der Erkennung von Amyloidfibrillen durch konformationssensitive Antikörper.

B10 zeigt eine funktionelle Aktivität, die sich in einer Inhibition der Bildung von A β -Amyloidfibrillen durch Stabilisierung von fibrillären Vorläuferaggregaten, sogenannten A β -Protofibrillen, äußert. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass B10 potentiell für die Diagnose und Therapie von Amyloidosen interessant ist, wie zum Beispiel durch die Modulation der Bildung von Amyloidfibrillen. Ebenso weist die enge funktionelle Gemeinsamkeit zu natürlichen Mustererkennungsrezeptoren auf einen immuntherapeutisch nutzbaren Effekt hin, der auf einer Unterbindung der Interaktion zwischen Amyloidfibrillen und spezifischen Zelloberflächenrezeptoren beruht.

6. Abstract

The formation of fibrillar aggregates, referred to as amyloid fibrils, is an intrinsic property of polypeptide chains. The unifying structural feature of amyloid fibrils is the so called cross- β structure. This specific β -sheet conformation differentiates amyloid fibrils from natively folded polypeptide chains. The occurrence of amyloid fibrils inside the human body is associated with several debilitating disorders, including Alzheimer's disease, type II diabetes or Creutzfeldt-Jakob disease. Clinical diagnosis of amyloid diseases and the development of therapeutic strategies rely on the recognition of amyloid fibrils, or their structural precursors, or the inhibition of their formation, using specific molecules. Antibodies represent a particularly important class of such molecules, underlying current developments and applications in amyloid immunotherapy. However, the molecular basis by which amyloid fibrils are recognized by fibril-specific antibodies has remained largely unclear. This thesis contributes to the clarification of this question by using the camelid antibody domain B10.

B10 was structurally and functionally characterized with a range of complementary biochemical and biophysical techniques. B10 differentiates A β amyloid fibrils from soluble A β oligomers or disaggregated A β peptide. This conformational specificity of B10 depends on electrostatic interactions and cannot be explained by structural properties of globular folded or intrinsically unfolded polypeptide chains. Interestingly B10 recognizes, in addition to A β fibrils, a range of different amyloid fibrils as well as the polyanionic biopolymers heparin and DNA. Furthermore B10 shows close functional similarities to natural pattern recognition receptors. These data establish a hypothesis for the binding of B10 and maybe other conformation sensitive antibodies to amyloid fibrils. B10 binds its ligands by the recognition of an highly ordered and regular anionic surface pattern. This pattern is presented by many but not all amyloid fibrils and reflects the highly ordered and regular structure of these biopolymers. Therefore the antigen specificity of B10 is based on a pattern recognition mechanism. These results enable a broad range of further studies on the molecular mechanism of amyloid fibril formation, their structure and the targeting of amyloid fibrils by conformation sensitive antibodies.

B10 possesses a functional activity in preventing the formation of amyloid fibrils by stabilizing fibrillar precursor aggregates, so called protofibrils. These data suggest possible applications of B10 in diagnosis and therapy of amyloid diseases, for example in

the modulation of amyloid fibril formation. Furthermore, the close similarity to natural pattern recognition receptors suggests a potential immunotherapeutic effect in targeting the interactions between amyloid fibrils and specific cellular receptors.

7. Referenzen

- 1 C. M. Dobson, *Nature* **426** (6968), 884-890 (2003).
- 2 P. J. Thomas, B. H. Qu & P. L. Pedersen, *Trends Biochem. Sci.* **20** (11), 456-459 (1995).
- 3 F. Chiti & C. M. Dobson, *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 333-366 (2006).
- 4 P. Westermark et al., *Amyloid* **14** (3), 179-183 (2007).
- 5 M. J. Schleiden, *Ann. Physik* **119** (2), 391-398 (1838).
- 6 R. Virchow, *Virchows Arch. Pathol. Anat. Physiol. Klin. Med.* **6** (3), 416-426 (1854).
- 7 R. Virchow, *Virchows Arch. Pathol. Anat. Physiol. Klin. Med.* **6** (1), 135-138 (1854).
- 8 R. Virchow, *Virchows Arch. Pathol. Anat. Physiol. Klin. Med.* **6** (2), 268-271 (1854).
- 9 N. Friedreich & A. Kekule, *Virchows Arch. Pathol. Anat. Physiol. Klin. Med.* **16**, 50-65 (1859).
- 10 J. W. Kelly, *Nat. Struct. Biol.* **9** (5), 323-325 (2002).
- 11 F. E. Cohen & J. W. Kelly, *Nature* **426** (6968), 905-909 (2003).
- 12 C. Röcken & A. Shakespeare, *Virchows Arch.* **440** (2), 111-122 (2002).
- 13 C. Röcken et al., *Dtsch. Med. Wochenschr.* **131** (27 Suppl 2), 45-66 (2006).
- 14 M. B. Pepys, *Annu. Rev. Med.* **57**, 223-241 (2006).
- 15 J. D. Sipe, *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 947-975 (1992).
- 16 C. Röcken & M. Eriksson, *Pathologe* **30** (3), 182-192 (2009).
- 17 B. Häggqvist et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96** (15), 8669-8674 (1999).
- 18 B. Stix et al., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **46** (4), 1133-1139 (2005).
- 19 M. B. Pepys, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **356** (1406), 203-211 (2001).
- 20 C. J. Pike, A. J. Walencewicz, C. G. Glabe & C. W. Cotman, *Brain Res.* **563** (1-2), 311-314 (1991).
- 21 A. Lorenzo & B. A. Yankner, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91** (25), 12243-12247 (1994).
- 22 R. P. Friedrich et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107** (5), 1942-1947 (2010).
- 23 C. Haass & D. J. Selkoe, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8** (2), 101-112 (2007).
- 24 B. Caughey & P. T. Lansbury, *Annu. Rev. Neurosci.* **26**, 267-298 (2003).

- 25 C. G. Glabe, *Neurobiol. Aging* **27** (4), 570-575 (2006).
- 26 H. A. Lashuel et al., *Nature* **418** (6895), 291 (2002).
- 27 G. P. Gellermann et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102** (18), 6297-6302 (2005).
- 28 S. R. Nelson et al., *Biochem. J.* **275**, 67-73 (1991).
- 29 R. Kisilevsky, *J. Struct. Biol.* **130** (2-3), 99-108 (2000).
- 30 M. Fändrich, *Cell. Mol. Life Sci.* **64** (16), 2066-2078 (2007).
- 31 R. Kodali & R. Wetzel, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **17** (1), 48-57 (2007).
- 32 C. M. Dobson, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **356** (1406), 133-145 (2001).
- 33 A. J. Howie & D. B. Brewer, *Micron* **40** (3), 285-301 (2009).
- 34 G. T. Westermark, K. H. Johnson & P. Westermark, in *Methods Enzymol.*, edited by R. Wetzel (Academic Press, San Diego, USA, 1999), Vol. 309, pp. 3-25.
- 35 R. Khurana, V. N. Uversky, L. Nielsen & A. L. Fink, *J. Biol. Chem.* **276** (25), 22715-22721 (2001).
- 36 R. Khurana et al., *J. Struct. Biol.* **151** (3), 229-238 (2005).
- 37 P. Frid, S. V. Anisimov & N. Popovic, *Brain Res. Rev.* **53** (1), 135-160 (2007).
- 38 M. Biancalana & S. Koide, *Biochim. Biophys. Acta* **1804** (7), 1405-1412 (2010).
- 39 M. Fändrich & C. M. Dobson, *EMBO J.* **21** (21), 5682-5690 (2002).
- 40 M. Fändrich, M. A. Fletcher & C. M. Dobson, *Nature* **410** (6825), 165-166 (2001).
- 41 M. Stefani & C. M. Dobson, *J. Mol. Med.* **81** (11), 678-699 (2003).
- 42 L. Goldschmidt, P. K. Teng, R. Riek & D. Eisenberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107** (8), 3487-3492 (2010).
- 43 R. Nelson et al., *Nature* **435** (7043), 773-778 (2005).
- 44 M. R. Sawaya et al., *Nature* **447** (7143), 453-457 (2007).
- 45 P. K. Teng & D. Eisenberg, *Protein Eng. Des. Sel.* **22** (8), 531-536 (2009).
- 46 C. Sachse et al., *J. Mol. Biol.* **362** (2), 347-354 (2006).
- 47 L. Wang et al., *PLoS Biol.* **6** (8), e195 (2008).
- 48 C. Wasmer et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **48** (26), 4858-4860 (2009).
- 49 A. L. Fink, *Fold. Des.* **3** (1), R9-23 (1998).
- 50 J. Schnabel, *Nature* **464** (7290), 828-829 (2010).
- 51 C. P. Maury, *J. Intern. Med.* **265** (3), 329-334 (2009).
- 52 S. K. Maji et al., *Science* **325** (5938), 328-332 (2009).
- 53 C. Ritter et al., *Nature* **435** (7043), 844-848 (2005).
- 54 M. R. Chapman et al., *Science* **295** (5556), 851-855 (2002).

- 55 M. Sunde & C. C. Blake, *Q. Rev. Biophys.* **31** (1), 1-39 (1998).
- 56 A. S. Cohen & E. Calkins, *Nature* **183** (4669), 1202-1203 (1959).
- 57 C. M. Dobson, *Trends Biochem. Sci.* **24** (9), 329-332 (1999).
- 58 J. D. Sipe & A. S. Cohen, *J. Struct. Biol.* **130** (2-3), 88-98 (2000).
- 59 J. L. Jimenez et al., *EMBO J.* **18** (4), 815-821 (1999).
- 60 J. L. Jimenez et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99** (14), 9196-9201 (2002).
- 61 C. Goldsbury et al., *J. Mol. Biol.* **352** (2), 282-298 (2005).
- 62 C. Sachse, M. Fändrich & N. Grigorieff, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105** (21), 7462-7466 (2008).
- 63 M. Schmidt et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106** (47), 19813-19818 (2009).
- 64 C. S. Goldsbury et al., *J. Struct. Biol.* **119** (1), 17-27 (1997).
- 65 A. K. Chamberlain et al., *Biophys. J.* **79** (6), 3282-3293 (2000).
- 66 N. M. Kad et al., *J. Mol. Biol.* **330** (4), 785-797 (2003).
- 67 C. Chothia, *J. Mol. Biol.* **75** (2), 295-302 (1973).
- 68 J. D. Harper, C. M. Lieber & P. T. Lansbury, Jr., *Chem. Biol.* **4** (12), 951-959 (1997).
- 69 H. Wadai et al., *Biochemistry* **44** (1), 157-164 (2005).
- 70 N. Rubin et al., *J. Am. Chem. Soc.* **130** (14), 4602-4603 (2008).
- 71 N. Rubin et al., *J. Am. Chem. Soc.* **132** (12), 4242-4248 (2010).
- 72 M. Vilar et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105** (25), 8637-8642 (2008).
- 73 M. Fändrich, J. Meinhardt & N. Grigorieff, *Prion* **3** (2), 89-93 (2009).
- 74 M. Sunde et al., *J. Mol. Biol.* **273** (3), 729-739 (1997).
- 75 L. C. Serpell et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97** (9), 4897-4902 (2000).
- 76 O. S. Makin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102** (2), 315-320 (2005).
- 77 W. T. Astbury & S. Dickinson, *Biochem. J.* **29** (10), 2351-2360 (1935).
- 78 H. LeVine, 3rd, *Amyloid* **2** (1), 1-6 (1995).
- 79 H. Puchtler, F. Sweat & M. Levine, *J. Histochem. Cytochem.* **10** (3), 355-364 (1962).
- 80 W. E. Klunk, J. W. Pettegrew & D. J. Abraham, *J. Histochem. Cytochem.* **37** (8), 1273-1281 (1989).
- 81 H. LeVine, 3rd, in *Methods Enzymol.*, edited by R. Wetzel (Academic Press, San Diego, USA, 1999), Vol. 309, pp. 274-284.
- 82 H. Naiki, K. Higuchi, M. Hosokawa & T. Takeda, *Anal. Biochem.* **177** (2), 244-249 (1989).

- 83 M. Bouchard et al., *Protein Sci.* **9** (10), 1960-1967 (2000).
- 84 G. Zandomenighi, M. R. Krebs, M. G. McCammon & M. Fändrich, *Protein Sci.* **13** (12), 3314-3321 (2004).
- 85 M. Calero & M. Gasset, *Methods Mol. Biol.* **299**, 129-151 (2005).
- 86 S. Krimm & J. Bandekar, *Adv. Protein Chem.* **38**, 181-364 (1986).
- 87 C. Toniolo & M. Palumbo, *Biopolymers* **16** (1), 219-224 (1977).
- 88 T. Miyazawa & E. R. Blout, *J. Am. Chem. Soc.* **83** (3), 712-719 (1961).
- 89 H. Susi & D. M. Byler, *Arch. Biochem. Biophys.* **258** (2), 465-469 (1987).
- 90 J. Kubelka & T. A. Keiderling, *J. Am. Chem. Soc.* **123** (48), 12048-12058 (2001).
- 91 A. Barth & C. Zscherp, *Q. Rev. Biophys.* **35** (4), 369-430 (2002).
- 92 J. Zurdo, J. I. Gujjarro & C. M. Dobson, *J. Am. Chem. Soc.* **123** (33), 8141-8142 (2001).
- 93 H. L. Monaco, M. Rizzi & A. Coda, *Science* **268** (5213), 1039-1041 (1995).
- 94 O. S. Makin & L. C. Serpell, *Methods Mol. Biol.* **299**, 67-80 (2005).
- 95 H. A. Lashuel & J. S. Wall, *Methods Mol. Biol.* **299**, 81-101 (2005).
- 96 R. Tycko, *Q. Rev. Biophys.* **39** (1), 1-55 (2006).
- 97 U. Baxa, *Curr. Alzheimer Res.* **5** (3), 308-318 (2008).
- 98 A. T. Petkova et al., *J. Mol. Biol.* **335** (1), 247-260 (2004).
- 99 C. P. Jaroniec et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101** (3), 711-716 (2004).
- 100 A. T. Petkova et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99** (26), 16742-16747 (2002).
- 101 K. Iwata et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103** (48), 18119-18124 (2006).
- 102 M. Hoshino et al., *Nat. Struct. Biol.* **9** (5), 332-336 (2002).
- 103 A. Olofsson et al., *J. Biol. Chem.* **279** (7), 5699-5707 (2004).
- 104 T. Lührs et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102** (48), 17342-17347 (2005).
- 105 I. Kheterpal et al., *Biochemistry* **40** (39), 11757-11767 (2001).
- 106 P. Polverino de Laureto et al., *J. Mol. Biol.* **334** (1), 129-141 (2003).
- 107 S. L. Myers, N. H. Thomson, S. E. Radford & A. E. Ashcroft, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **20** (11), 1628-1636 (2006).
- 108 N. Ferguson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103** (44), 16248-16253 (2006).
- 109 R. Wetzel, *Acc. Chem. Res.* **39** (9), 671-679 (2006).
- 110 F. Chiti et al., *EMBO J.* **19** (7), 1441-1449 (2000).
- 111 T. Chiba et al., *J. Biol. Chem.* **278** (47), 47016-47024 (2003).
- 112 C. Wasmer et al., *Science* **319** (5869), 1523-1526 (2008).
- 113 J. T. Nielsen et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **48** (12), 2118-2121 (2009).

- 114 A. V. Efimov, *FEBS Lett.* **224** (2), 372-376 (1987).
- 115 J. Hennetin, B. Jullian, A. C. Steven & A. V. Kajava, *J. Mol. Biol.* **358** (4), 1094-1105 (2006).
- 116 P. Lengar, N. V. Joshi & P. Balaram, *Structure* **14** (3), 529-542 (2006).
- 117 J. Jenkins & R. Pickersgill, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **77** (2), 111-175 (2001).
- 118 S. Steinbacher et al., *Science* **265** (5170), 383-386 (1994).
- 119 M. Akita et al., *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **57** (12), 1786-1792 (2001).
- 120 A. T. Petkova, W. M. Yau & R. Tycko, *Biochemistry* **45** (2), 498-512 (2006).
- 121 J. J. Balbach et al., *Biochemistry* **39** (45), 13748-13759 (2000).
- 122 R. Wetzel, S. Shivaprasad & A. D. Williams, *Biochemistry* **46** (1), 1-10 (2007).
- 123 A. T. Petkova et al., *Science* **307** (5707), 262-265 (2005).
- 124 C. S. Goldsbury et al., *J. Struct. Biol.* **130** (2-3), 217-231 (2000).
- 125 J. Meinhardt et al., *J. Mol. Biol.* **386** (3), 869-877 (2009).
- 126 J. L. Jimenez, G. Tennent, M. Pepys & H. R. Saibil, *J. Mol. Biol.* **311** (2), 241-247 (2001).
- 127 H. H. Bauer et al., *J. Struct. Biol.* **115** (1), 1-15 (1995).
- 128 J. S. Pedersen et al., *J. Mol. Biol.* **355** (3), 501-523 (2006).
- 129 W. Dzwolak, V. Smirnovas, R. Jansen & R. Winter, *Protein Sci.* **13** (7), 1927-1932 (2004).
- 130 A. K. Paravastu, R. D. Leapman, W. M. Yau & R. Tycko, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105** (47), 18349-18354 (2008).
- 131 R. Tycko, K. L. Sciarretta, J. P. Orgel & S. C. Meredith, *Biochemistry* **48** (26), 6072-6084 (2009).
- 132 J. S. Pedersen & D. E. Otzen, *Protein Sci.* **17** (1), 2-10 (2008).
- 133 R. Sabate et al., *J. Mol. Biol.* **370** (4), 768-783 (2007).
- 134 R. Tycko, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14** (1), 96-103 (2004).
- 135 J. J. Wiltzius et al., *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16** (9), 973-978 (2009).
- 136 C. B. Anfinsen, *Science* **181** (96), 223-230 (1973).
- 137 A. I. Bartlett & S. E. Radford, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16** (6), 582-588 (2009).
- 138 F. U. Hartl & M. Hayer-Hartl, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16** (6), 574-581 (2009).
- 139 B. Seilheimer et al., *J. Struct. Biol.* **119** (1), 59-71 (1997).
- 140 R. Diaz-Avalos et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102** (29), 10165-10170 (2005).
- 141 A. K. Paravastu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106** (18), 7443-7448 (2009).
- 142 K. Yamaguchi et al., *J. Mol. Biol.* **352** (4), 952-960 (2005).

- 143 C. Wasmer et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **47** (31), 5839-5841 (2008).
- 144 B. H. Toyama, M. J. Kelly, J. D. Gross & J. S. Weissman, *Nature* **449** (7159), 233-237 (2007).
- 145 G. C. Telling et al., *Science* **274** (5295), 2079-2082 (1996).
- 146 R. B. Wickner, H. K. Edskes, F. Shewmaker & T. Nakayashiki, *Nat. Rev. Microbiol.* **5** (8), 611-618 (2007).
- 147 P. T. Lansbury & H. A. Lashuel, *Nature* **443** (7113), 774-779 (2006).
- 148 C. G. Glabe & R. Kaye, *Neurology* **66** (2 Suppl 1), 74-78 (2006).
- 149 R. Kaye et al., *Science* **300** (5618), 486-489 (2003).
- 150 F. Rahimi, A. Shanmugam & G. Bitan, *Curr. Alzheimer Res.* **5** (3), 319-341 (2008).
- 151 J. Janson et al., *Diabetes* **48** (3), 491-498 (1999).
- 152 J. R. Silveira et al., *Nature* **437** (7056), 257-261 (2005).
- 153 J. D. Harper & P. T. Lansbury, Jr., *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 385-407 (1997).
- 154 V. H. Finder & R. Glockshuber, *Neurodegener. Dis.* **4** (1), 13-27 (2007).
- 155 P. Hortschansky et al., *Protein Sci.* **14** (7), 1753-1759 (2005).
- 156 T. Christopeit et al., *Protein Sci.* **14** (8), 2125-2131 (2005).
- 157 F. Chiti et al., *Nature* **424** (6950), 805-808 (2003).
- 158 A. M. Fernandez-Escamilla, F. Rousseau, J. Schymkowitz & L. Serrano, *Nat. Biotechnol.* **22** (10), 1302-1306 (2004).
- 159 K. Klement et al., *J. Mol. Biol.* **373** (5), 1321-1333 (2007).
- 160 H. Naiki et al., *Amyloid* **4** (4), 223-232 (1997).
- 161 J. C. Rochet & P. T. Lansbury, Jr., *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10** (1), 60-68 (2000).
- 162 K. A. Conway, J. D. Harper & P. T. Lansbury, Jr., *Biochemistry* **39** (10), 2552-2563 (2000).
- 163 E. Frare et al., *J. Mol. Biol.* **387** (1), 17-27 (2009).
- 164 M. Bucciantini et al., *Nature* **416** (6880), 507-511 (2002).
- 165 C. Ionescu-Zanetti et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96** (23), 13175-13179 (1999).
- 166 D. M. Walsh et al., *J. Biol. Chem.* **272** (35), 22364-22372 (1997).
- 167 J. D. Harper, S. S. Wong, C. M. Lieber & P. T. Lansbury, Jr., *Chem. Biol.* **4** (2), 119-125 (1997).
- 168 R. Kaye et al., *J. Biol. Chem.* **279** (45), 46363-46366 (2004).
- 169 S. Lesne et al., *Nature* **440** (7082), 352-357 (2006).
- 170 G. M. Shankar et al., *Nat. Med.* **14** (8), 837-842 (2008).

- 171 G. Bitan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100** (1), 330-335 (2003).
- 172 M. P. Lambert et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95** (11), 6448-6453 (1998).
- 173 S. Barghorn et al., *J. Neurochem.* **95** (3), 834-847 (2005).
- 174 C. G. Glabe, *J. Biol. Chem.* **283** (44), 29639-29643 (2008).
- 175 M. Ahmed et al., *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17** (5), 561-567 (2010).
- 176 L. Yu et al., *Biochemistry* **48** (9), 1870-1877 (2009).
- 177 I. Kheterpal et al., *Biochemistry* **42** (48), 14092-14098 (2003).
- 178 S. Chimon et al., *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14** (12), 1157-1164 (2007).
- 179 A. D. Williams et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102** (20), 7115-7120 (2005).
- 180 D. P. Hong, A. L. Fink & V. N. Uversky, *J. Mol. Biol.* **383** (1), 214-223 (2008).
- 181 K. Ono, M. M. Condrón & D. B. Teplow, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106** (35), 14745-14750 (2009).
- 182 D. M. Walsh et al., *J. Biol. Chem.* **274** (36), 25945-25952 (1999).
- 183 A. J. Modler, K. Gast, G. Lutsch & G. Damaschun, *J. Mol. Biol.* **325** (1), 135-148 (2003).
- 184 E. Cerf et al., *Biochem. J.* **421** (3), 415-423 (2009).
- 185 A. Orte et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105** (38), 14424-14429 (2008).
- 186 D. M. Hartley et al., *J. Neurosci.* **19** (20), 8876-8884 (1999).
- 187 M. Meyer-Luehmann et al., *Nature* **451** (7179), 720-724 (2008).
- 188 C. Geula et al., *Nat. Med.* **4** (7), 827-831 (1998).
- 189 W. F. Xue et al., *J. Biol. Chem.* **284** (49), 34272-34282 (2009).
- 190 A. L. Gharibyan et al., *J. Mol. Biol.* **365** (5), 1337-1349 (2007).
- 191 V. Novitskaya, O. V. Bocharova, I. Bronstein & I. V. Baskakov, *J. Biol. Chem.* **281** (19), 13828-13836 (2006).
- 192 J. Hardy & D. J. Selkoe, *Science* **297** (5580), 353-356 (2002).
- 193 S. Campioni et al., *Nat. Chem. Biol.* **6** (2), 140-147 (2010).
- 194 S. Treusch, D. M. Cyr & S. Lindquist, *Cell Cycle* **8** (11), 1668-1674 (2009).
- 195 L. Pieri et al., *J. Biol. Chem.* **281** (22), 15337-15344 (2006).
- 196 E. Sparr et al., *FEBS Lett.* **577** (1-2), 117-120 (2004).
- 197 M. F. Engel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105** (16), 6033-6038 (2008).
- 198 A. Quist et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102** (30), 10427-10432 (2005).
- 199 H. A. Lashuel, *Sci. Aging Knowl. Environ.* **2005** (38), pe28 (2005).
- 200 A. Demuro et al., *J. Biol. Chem.* **280** (17), 17294-17300 (2005).
- 201 N. Reixach et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101** (9), 2817-2822 (2004).

- 202 M. Hashimoto, E. Rockenstein, L. Crews & E. Masliah, *Neuromolecular Med.* **4** (1-2), 21-36 (2003).
- 203 N. Gosavi et al., *J. Biol. Chem.* **277** (50), 48984-48992 (2002).
- 204 Y. Verdier & B. Penke, *Curr. Protein Pept. Sci.* **5** (1), 19-31 (2004).
- 205 F. M. LaFerla, K. N. Green & S. Oddo, *Nat. Rev. Neurosci.* **8** (7), 499-509 (2007).
- 206 B. Caughey & G. S. Baron, *Nature* **443** (7113), 803-810 (2006).
- 207 J. Lauren et al., *Nature* **457** (7233), 1128-1132 (2009).
- 208 W. Q. Zhao et al., *FASEB J.* **22** (1), 246-260 (2008).
- 209 B. Caughey, G. S. Baron, B. Chesebro & M. Jeffrey, *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 177-204 (2009).
- 210 A. Salminen et al., *Prog. Neurobiol.* **87** (3), 181-194 (2009).
- 211 C. A. Janeway, Jr. & R. Medzhitov, *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 197-216 (2002).
- 212 M. Krieger & D. M. Stern, *J. Clin. Invest.* **108** (5), 645-647 (2001).
- 213 A. M. Schmidt, S. D. Yan, S. F. Yan & D. M. Stern, *J. Clin. Invest.* **108** (7), 949-955 (2001).
- 214 A. Plüddemann, C. Neyen & S. Gordon, *Methods* **43** (3), 207-217 (2007).
- 215 J. El Khoury et al., *Nature* **382** (6593), 716-719 (1996).
- 216 L. Khemtourian, J. A. Killian, J. W. Hoppener & M. F. Engel, *Exp. Diabetes Res.* **2008**, 421287 (2008).
- 217 K. P. Nilsson, *FEBS Lett.* **583** (16), 2593-2599 (2009).
- 218 G. G. Glenner, E. D. Eanes & D. L. Page, *J. Histochem. Cytochem.* **20** (10), 821-826 (1972).
- 219 L. W. Jin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100** (26), 15294-15298 (2003).
- 220 D. B. Carter & K. C. Chou, *Neurobiol. Aging* **19** (1), 37-40 (1998).
- 221 C. Wu et al., *J. Am. Chem. Soc.* **129** (5), 1225-1232 (2007).
- 222 W. E. Klunk, M. L. Debnath & J. W. Pettegrew, *Neurobiol. Aging* **15** (6), 691-698 (1994).
- 223 W. E. Klunk et al., *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **61** (9), 797-805 (2002).
- 224 W. E. Klunk, M. L. Debnath & J. W. Pettegrew, *Neurobiol. Aging* **16** (4), 541-548 (1995).
- 225 N. A. Dezutter et al., *Amyloid* **8** (3), 202-214 (2001).
- 226 M. Sadowski et al., *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **63** (7), 775-784 (2004).
- 227 C. D. Link et al., *Neurobiol. Aging* **22** (2), 217-226 (2001).

- 228 H. I. Sair, P. M. Doraiswamy & J. R. Petrella, *Neuroradiology* **46** (2), 93-104 (2004).
- 229 C. A. Mathis et al., *J. Med. Chem.* **46** (13), 2740-2754 (2003).
- 230 V. Heiser et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97** (12), 6739-6744 (2000).
- 231 B. Caughey & R. E. Race, *J. Neurochem.* **59** (2), 768-771 (1992).
- 232 M. R. Krebs, E. H. Bromley & A. M. Donald, *J. Struct. Biol.* **149** (1), 30-37 (2005).
- 233 M. Groenning et al., *J. Struct. Biol.* **158** (3), 358-369 (2007).
- 234 C. A. Mathis et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12** (3), 295-298 (2002).
- 235 Y. Wang et al., *J. Mol. Neurosci.* **19** (1-2), 11-16 (2002).
- 236 W. E. Klunk et al., *Ann. Neurol.* **55** (3), 306-319 (2004).
- 237 A. Nordberg, J. O. Rinne, A. Kadir & B. Langstrom, *Nat. Rev. Neurol.* **6** (2), 78-87 (2010).
- 238 J. O. Rinne et al., *Lancet Neurol.* **9** (4), 363-372 (2010).
- 239 M. B. Pepys et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91** (12), 5602-5606 (1994).
- 240 M. B. Pepys et al., *Clin. Exp. Immunol.* **38** (2), 284-293 (1979).
- 241 A. Agrawal et al., *Adv. Exp. Med. Biol.* **653**, 98-116 (2009).
- 242 J. Emsley et al., *Nature* **367** (6461), 338-345 (1994).
- 243 H. Hamazaki, *J. Biol. Chem.* **262** (4), 1456-1460 (1987).
- 244 S. E. Kolstoe et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106** (18), 7619-7623 (2009).
- 245 D. Thompson, M. B. Pepys, I. Tickle & S. Wood, *J. Mol. Biol.* **320** (5), 1081-1086 (2002).
- 246 M. B. Pepys et al., *Amyloid* **4** (4), 274-295 (1997).
- 247 P. N. Hawkins, *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **11** (6), 649-655 (2002).
- 248 M. B. Pepys et al., *Nature* **417** (6886), 254-259 (2002).
- 249 G. A. Tennent, L. B. Lovat & M. B. Pepys, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92** (10), 4299-4303 (1995).
- 250 E. Leclerc, G. Fritz, S. W. Vetter & C. W. Heizmann, *Biochim. Biophys. Acta* **1793** (6), 993-1007 (2009).
- 251 B. M. Dattilo et al., *Biochemistry* **46** (23), 6957-6970 (2007).
- 252 K. M. Myint et al., *Diabetes* **55** (9), 2510-2522 (2006).
- 253 G. P. Sims et al., *Annu. Rev. Immunol.* **28**, 367-388 (2010).
- 254 S. D. Yan et al., *Nature* **382** (6593), 685-691 (1996).
- 255 S. D. Yan et al., *Nat. Med.* **6** (6), 643-651 (2000).
- 256 S. Matsumoto et al., *Biochemistry* **47** (47), 12299-12311 (2008).

- 257 M. Koch et al., *Structure* **18** (10), 1342-1352 (2010).
- 258 R. Deane et al., *Nat. Med.* **9** (7), 907-913 (2003).
- 259 N. Sasaki et al., *Brain Res.* **888** (2), 256-262 (2001).
- 260 S. D. Yan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94** (10), 5296-5301 (1997).
- 261 A. M. Schmidt, S. D. Yan, S. F. Yan & D. M. Stern, *Biochim. Biophys. Acta* **1498** (2-3), 99-111 (2000).
- 262 T. Hashimoto et al., *EMBO J.* **21** (7), 1524-1534 (2002).
- 263 L. Söderberg et al., *J. Biol. Chem.* **280** (2), 1007-1015 (2005).
- 264 H. Kakuyama et al., *Biochemistry* **44** (47), 15602-15609 (2005).
- 265 Y. Osada et al., *J. Biol. Chem.* **280** (9), 8596-8605 (2005).
- 266 B. O'Nuallain & R. Wetzelschöffer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99** (3), 1485-1490 (2002).
- 267 C. Hock et al., *Nat. Med.* **8** (11), 1270-1275 (2002).
- 268 R. Kaye et al., *Mol. Neurodegen.* **2**, 18 (2007).
- 269 R. Hrnčić et al., *Am. J. Pathol.* **157** (4), 1239-1246 (2000).
- 270 C. G. Glabe, *Trends Biochem. Sci.* **29** (10), 542-547 (2004).
- 271 M. Dumoulin & C. M. Dobson, *Biochimie* **86** (9-10), 589-600 (2004).
- 272 A. Solomon, D. T. Weiss & J. S. Wall, *Clin. Cancer Res.* **9** (10 Pt 2), 3831S-3838S (2003).
- 273 A. L. Clos et al., *Exp. Dermatol.* **19** (10), 904-911 (2010).
- 274 J. S. Wall et al., *J. Nucl. Med.* **47** (12), 2016-2024 (2006).
- 275 J. S. Wall et al., *Blood* **116** (13), 2241-2244 (2010).
- 276 S. Oddo et al., *J. Biol. Chem.* **281** (3), 1599-1604 (2006).
- 277 N. B. Chauhan, *J. Neurosci. Res.* **85** (2), 451-463 (2007).
- 278 S. Muyltermans, C. Cambillau & L. Wyns, *Trends Biochem. Sci.* **26** (4), 230-235 (2001).
- 279 P. Holliger & P. J. Hudson, *Nat. Biotechnol.* **23** (9), 1126-1136 (2005).
- 280 J. M. Woof & D. R. Burton, *Nat. Rev. Immunol.* **4** (2), 89-99 (2004).
- 281 S. Muyltermans, *J. Biotechnol.* **74** (4), 277-302 (2001).
- 282 C. Hamers-Casterman et al., *Nature* **363** (6428), 446-448 (1993).
- 283 K. B. Vu, M. A. Ghahroudi, L. Wyns & S. Muyltermans, *Mol. Immunol.* **34** (16-17), 1121-1131 (1997).
- 284 E. De Genst, D. Saerens, S. Muyltermans & K. Conrath, *Dev. Comp. Immunol.* **30** (1-2), 187-198 (2006).

- 285 M. M. Harmsen & H. J. De Haard, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **77** (1), 13-22 (2007).
- 286 G. Habicht et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104** (49), 19232-19237 (2007).
- 287 H. R. Hoogenboom, *Nat. Biotechnol.* **23** (9), 1105-1116 (2005).
- 288 A. Plückthun, *Immunol. Rev.* **130**, 151-188 (1992).
- 289 H. R. Hoogenboom et al., *Immunotechnology* **4** (1), 1-20 (1998).
- 290 S. Chen & R. Wetzel, *Protein Sci.* **10** (4), 887-891 (2001).
- 291 P. Lindner et al., *Biotechniques* **22** (1), 140-149 (1997).
- 292 H. LeVine, 3rd, *Protein Sci.* **2** (3), 404-410 (1993).
- 293 W. E. Klunk et al., *Life Sci.* **69** (13), 1471-1484 (2001).
- 294 S. Kawatake et al., *Biol. Pharm. Bull.* **29** (5), 927-932 (2006).
- 295 M. H. Mohajeri et al., *J. Biol. Chem.* **277** (36), 33012-33017 (2002).
- 296 G. P. Gellermann et al., *J. Mol. Biol.* **360** (2), 251-257 (2006).
- 297 K. J. Halbhuber et al., *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* **40** (8), 1077-1096 (1994).
- 298 C. Haupt et al., *J. Mol. Biol.* **405**, 341-348 (2011).
- 299 R. Maurer, B. Meyer & M. Ptashne, *J. Mol. Biol.* **139** (2), 147-161 (1980).
- 300 A. G. Murzin, S. E. Brenner, T. Hubbard & C. Chothia, *J. Mol. Biol.* **247** (4), 536-540 (1995).
- 301 R. A. Laskowski et al., *Trends Biochem. Sci.* **22** (12), 488-490 (1997).
- 302 X. Duan & F. A. Quioco, *Biochemistry* **41** (3), 706-712 (2002).
- 303 M. A. Walsh et al., *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **54** (4), 522-546 (1998).
- 304 T. R. Transue et al., *Biochemistry* **43** (10), 2829-2839 (2004).
- 305 G. D. Smith, W. A. Pangborn & R. H. Blessing, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **59** (3), 474-482 (2003).
- 306 C. Röcken et al., *J. Pathol.* **210** (4), 478-487 (2006).
- 307 P. Westermark, *FEBS J.* **272** (23), 5942-5949 (2005).
- 308 M. Skinner, T. Shirahama, A. S. Cohen & C. L. Deal, *Prep. Biochem.* **12** (5), 461-476 (1982).
- 309 E. U. Allmen, M. Koch, G. Fritz & D. F. Legler, *Prostate* **68** (7), 748-758 (2008).
- 310 U. Horn et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46** (5-6), 524-532 (1996).
- 311 S. R. Herron et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97** (16), 8762-8769 (2000).
- 312 D. Hanahan, *J. Mol. Biol.* **166** (4), 557-580 (1983).
- 313 S. C. Gill & P. H. von Hippel, *Anal. Biochem.* **182** (2), 319-326 (1989).
- 314 J. R. Harris, *Methods Mol. Biol.* **369**, 107-142 (2007).

- 315 R. C. Burghardt & R. Droleskey, in *Current Protocols in Microbiology*, edited by R. Coico, T. Kowalik, J. Quarles et al. (John Wiley, New York, 2006), pp. 33.
- 316 G. S. Basi et al., *J. Biol. Chem.* **285** (5), 3417-3427 (2010).
- 317 S. Miller, B. Schuler & R. Seckler, *Protein Sci.* **7** (10), 2223-2232 (1998).
- 318 A. S. Gardberg et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104** (40), 15659-15664 (2007).
- 319 L. A. Miles et al., *J. Mol. Biol.* **377** (1), 181-192 (2008).
- 320 B. J. Bennion & V. Daggett, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100** (9), 5142-5147 (2003).
- 321 A. D. Williams, S. Shivaprasad & R. Wetzel, *J. Mol. Biol.* **357** (4), 1283-1294 (2006).
- 322 A. Paivio et al., *J. Mol. Biol.* **339** (1), 145-159 (2004).
- 323 T. Scheuermann et al., *Protein Sci.* **12** (12), 2685-2692 (2003).
- 324 N. S. Gunay & R. J. Linhardt, *Planta Med.* **65** (4), 301-306 (1999).
- 325 J. D. Watson & F. H. Crick, *Nature* **171** (4356), 737-738 (1953).
- 326 E. P. McGreal, *Adv. Exp. Med. Biol.* **653**, 139-161 (2009).
- 327 T. Rehm, R. Huber & T. A. Holak, *Structure* **10** (12), 1613-1618 (2002).
- 328 B. Solomon, R. Koppel, E. Hanan & T. Katzav, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93** (1), 452-455 (1996).
- 329 B. Solomon, R. Koppel, D. Frankel & E. Hanan-Aharon, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94** (8), 4109-4112 (1997).
- 330 J. McLaurin et al., *Nat. Med.* **8** (11), 1263-1269 (2002).
- 331 M. Dumoulin et al., *Nature* **424** (6950), 783-788 (2003).
- 332 J. Legleiter et al., *J. Mol. Biol.* **335** (4), 997-1006 (2004).
- 333 I. Kheterpal, M. Chen, K. D. Cook & R. Wetzel, *J. Mol. Biol.* **361** (4), 785-795 (2006).
- 334 D. Schenk et al., *Nature* **400** (6740), 173-177 (1999).
- 335 F. Bard et al., *Nat. Med.* **6** (8), 916-919 (2000).
- 336 D. Frenkel, B. Solomon & I. Benhar, *J. Neuroimmunol.* **106** (1-2), 23-31 (2000).
- 337 B. J. Bacskai et al., *J. Neurosci.* **22** (18), 7873-7878 (2002).
- 338 P. Das et al., *J. Neurosci.* **23** (24), 8532-8538 (2003).
- 339 D. M. Wilcock et al., *Neurobiol. Dis.* **15** (1), 11-20 (2004).
- 340 Y. Tamura et al., *Neurobiol. Dis.* **20** (2), 541-549 (2005).
- 341 N. Moretto et al., *J. Biol. Chem.* **282** (15), 11436-11445 (2007).

- 342 J. D. Harper, S. S. Wong, C. M. Lieber & P. T. Lansbury, Jr., *Biochemistry* **38** (28), 8972-8980 (1999).
- 343 J. R. Fromm et al., *Arch. Biochem. Biophys.* **343** (1), 92-100 (1997).
- 344 S. Supattapone et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96** (25), 14529-14534 (1999).
- 345 M. J. Gunzburg, M. A. Perugini & G. J. Howlett, *J. Biol. Chem.* **282** (49), 35831-35841 (2007).
- 346 L. Pauling & R. B. Corey, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **37** (11), 729-740 (1951).
- 347 Y. Yoshiike, T. Akagi & A. Takashima, *Biochemistry* **46** (34), 9805-9812 (2007).
- 348 T. T. Ashburn, H. Han, B. F. McGuinness & P. T. Lansbury, Jr., *Chem. Biol.* **3** (5), 351-358 (1996).
- 349 R. Tycko, *Biochemistry* **42** (11), 3151-3159 (2003).
- 350 M. Sackewitz et al., *J. Am. Chem. Soc.* **130** (23), 7172-7173 (2008).
- 351 J. J. Helmus, K. Surewicz, W. K. Surewicz & C. P. Jaroniec, *J. Am. Chem. Soc.* **132** (7), 2393-2403 (2010).
- 352 S. Sharpe et al., *J. Am. Chem. Soc.* **126** (15), 4979-4990 (2004).
- 353 M. I. Ivanova et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106** (45), 18990-18995 (2009).
- 354 M. R. Nichols et al., *Biochemistry* **41** (19), 6115-6127 (2002).
- 355 H. A. Scheidt et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **50** (12), 2837-2840 (2011).
- 356 I. Klyubin et al., *Nat. Med.* **11** (5), 556-561 (2005).
- 357 E. B. Lee et al., *J. Biol. Chem.* **281** (7), 4292-4299 (2006).
- 358 Y. Gong et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100** (18), 10417-10422 (2003).
- 359 M. P. Lambert et al., *J. Neurochem.* **79** (3), 595-605 (2001).
- 360 R. B. DeMattos et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98** (15), 8850-8855 (2001).
- 361 J. C. Dodart et al., *Nat. Neurosci.* **5** (5), 452-457 (2002).
- 362 H. L. Weiner & D. Frenkel, *Nat. Rev. Immunol.* **6** (5), 404-416 (2006).
- 363 H. A. Lashuel et al., *J. Mol. Biol.* **332** (4), 795-808 (2003).
- 364 D. M. Wilcock et al., *J. Neurosci.* **23** (9), 3745-3751 (2003).
- 365 B. J. Bacsikai et al., *Nat. Med.* **7** (3), 369-372 (2001).
- 366 J. Koenigsknecht-Talboo et al., *J. Neurosci.* **28** (52), 14156-14164 (2008).
- 367 E. Gasteiger et al., in *The Proteomics Protocols Handbook* edited by J. M. Walker (Humana Press, Totowa, 2005), pp. 571-607.
- 368 O. N. Antzutkin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97** (24), 13045-13050 (2000).
- 369 M. Fändrich et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100** (26), 15463-15468 (2003).
- 370 E. Laurine et al., *J. Biol. Chem.* **278** (51), 51770-51778 (2003).

8. Anhang

8.1. Analyse der aufgereinigten B10-Varianten

Tabelle 8.1. Analyse der aufgereinigten B10-Varianten.

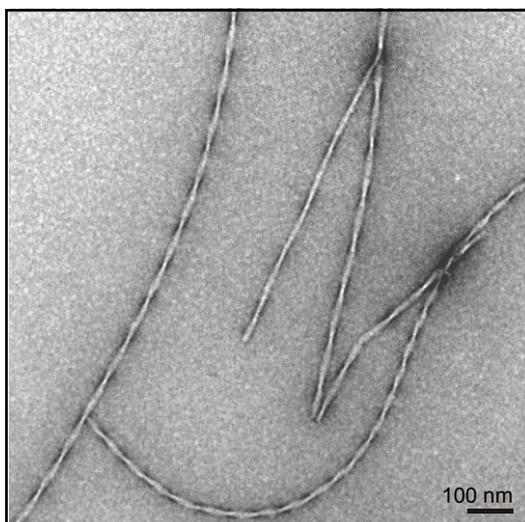
Variante	Reinheit (%)	K _D Wert (nM)
B10	98	475 ± 54
H35A	98	641 ± 49
R36A	97	823 ± 75
Y37A	98	372 ± 48
H38A	98	386 ± 46
R39A	97	2,950 ± 734
S56A	98	351 ± 44
Q57A	98	287 ± 40
S58A	98	453 ± 56
G59A	98	378 ± 43
M60A	98	394 ± 42
R61A	98	1,360 ± 166
G103A	98	324 ± 37
T104A	98	260 ± 31
R105A	98	744 ± 90
K106A	98	685 ± 95
N107A	98	334 ± 40
V108A	98	310 ± 37
W109A	98	358 ± 47
T110A	98	254 ± 33
R111A	98	813 ± 104
Q112A	98	313 ± 35
H113A	98	494 ± 53
P114A	97	331 ± 34
R39A/R61A	98	-

8.2. *In vitro*-Amyloidfibrillen

Soweit nicht anders gekennzeichnet stammen die Angaben zu den strukturellen Eigenschaften und den Amyloid-Charakteristika aus der vorliegenden Arbeit. Das angegebene Molekulargewicht und der isoelektrische Punkt entsprechen den theoretischen Werten, welche anhand der Aminosäuresequenz und dem ProtParam-Programm errechnet wurden (www.expasy.org)³⁶⁷. Die Messungen der angegebenen Fibrillenbreiten wurden mit dem Programm iTEM durchgeführt.

Tabelle 8.2. Eigenschaften von A β (1-40)-Fibrillen (pH 9).

Name	A β (1-40)	
Sequenz	DAEFRHDSGY-EVHHQKLVFF-AEDVGSNKGAIIGLMVGGVV	
Organismus	Mensch	
Quelle	rekombinant ¹⁵⁵	
Anzahl an Aminosäuren	40	
Molekulargewicht	4330 Da	
isoelektrischer Punkt	5,3	
Fibrillierungsbedingungen		Amyloid-Charakteristika
Konzentration	1 mg/ml	Röntgenbeugung (Å): 4,8 / 9,9 ⁴⁶
Lösungsmittel	50 mM Natriumborat	KR-grüne Doppelbrechung ⁴⁶
pH	9,0	ThT-Bindung ⁴⁶
Temperatur	Raumtemperatur	Amid-I-Maximum (cm ⁻¹): 1628 (H ₂ O) ⁴⁶
Zeit	7 d	



Strukturelle Charakteristika

lang
gerade
Fibrillendicke: ~ 20 nm
deutlich gewunden
Helizität: linksgängig⁴⁶

Tabelle 8.3. Eigenschaften von A β (1-40)-Fibrillen (pH 7,4).

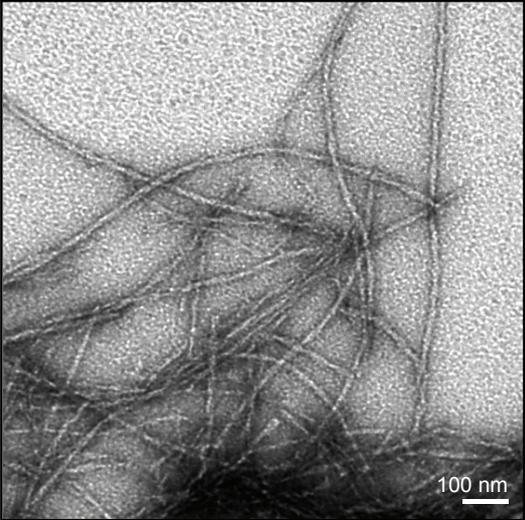
Name	A β (1-40)	
Sequenz	DAEFRHDSGY-EVHHQKLVFF-AEDVGSNKGA-I IGLMVGGVV	
Organismus	Mensch	
Quelle	rekombinant ¹⁵⁵	
Anzahl an Aminosäuren	40	
Molekulargewicht	4330 Da	
isoelektrischer Punkt	5,3	
Fibrillierungsbedingungen		
Konzentration	1 mg/ml	Amyloid-Charakteristika KR-grüne Doppelbrechung ³⁶⁸ Amid-I-Maximum (cm ⁻¹): 1636 (H ₂ O) ³⁶⁸
Lösungsmittel	Wasser	
pH	7,4	
Temperatur	Raumtemperatur	
Zeit	7 d	
		
Strukturelle Charakteristika		
lang		
gerade		
Fibrillendicke: ~ 20 nm		
meist gewunden		
β-Faltblatt: parallel (Festkörper-NMR) ¹⁰⁰		

Tabelle 8.4. Eigenschaften von A β (1-42)-Fibrillen.

Name	A β (1-42)	
Sequenz	DAEFRHDSGY-EVHHQKLVFF-AEDVGSNKGAI I IGLMVGGVV-IA	
Organismus	Mensch	
Quelle	chemische Synthese (Bachem)	
Anzahl an Aminosäuren	42	
Molekulargewicht	4514 Da	
isoelektrischer Punkt	5,3	
Fibrillierungsbedingungen		
Konzentration	1 mg/ml	
Lösungsmittel	50 mM Tris	
pH	7,4	
Temperatur	Raumtemperatur	
Zeit	2 d	

Amyloid CharakteristikaRöntgenbeugung (\AA): 4,7 / 9,7⁶³KR-grüne Doppelbrechung⁶³ThT-Bindung⁶³Amid-I-Maximum (cm^{-1}): 1628 (H_2O)⁶³**Strukturelle Charakteristika**

lang

gerade

Fibrillendicke: ~ 10 nm

deutlich gewunden

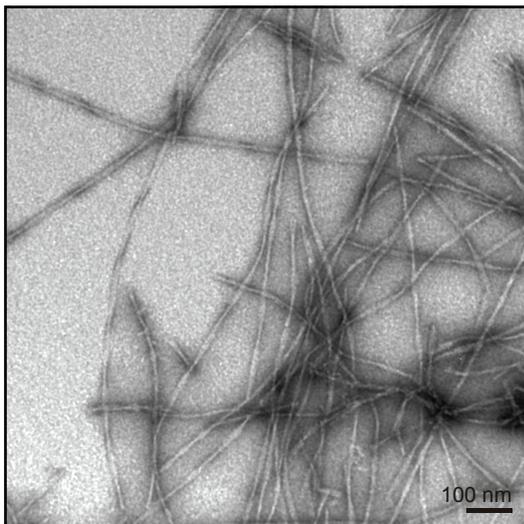
Helizität: linksgängig⁶³

Tabelle 8.5. Eigenschaften von A β (11-25)-Fibrillen.

Name		A β (11-25)	
Sequenz	EVHHQKLVFF-AEDVG		
Organismus	Mensch		
Quelle	chemische Synthese (JPT Peptide Technologies)		
Anzahl an Aminosäuren	15		
Molekulargewicht	1755 Da		
isoelektrischer Punkt	5,3		
Fibrillierungsbedingungen		Amyloid Charakteristika	
Konzentration	8,7 mg/ml	Röntgenbeugung (Å): 4,7 / 10,4 ⁹⁸	
Lösungsmittel	Wasser	Amid-I-Maximum (cm ⁻¹): 1623 (H ₂ O)	
	10 mM Natriumazid		
pH	7,4		
Temperatur	Raumtemperatur		
Zeit	10 d		
		Strukturelle Charakteristika	
		lang	
		gerade	
		Fibrillendicke: 11-31 nm	
		meist gewunden	
		β -Faltblatt: antiparallel (Festkörper-NMR) ⁹⁸	

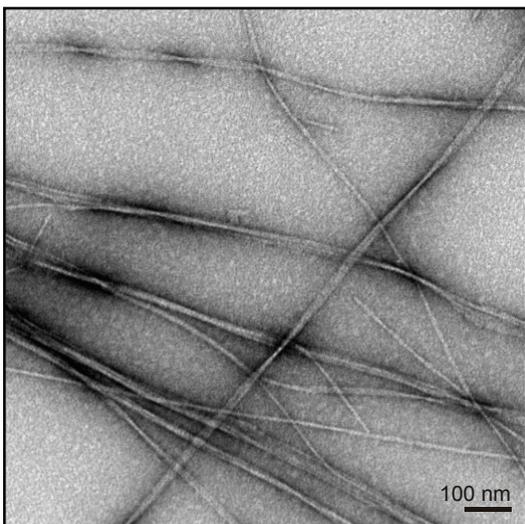
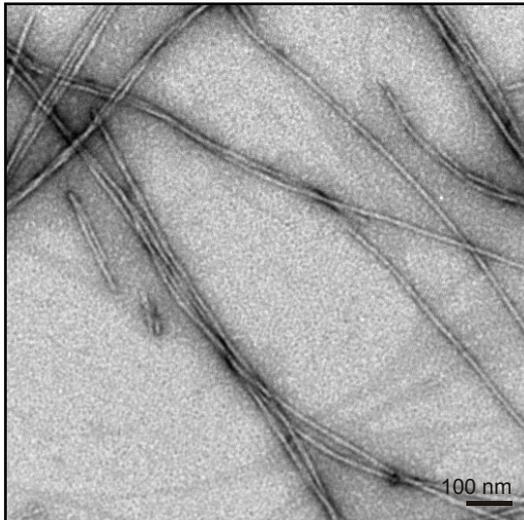


Tabelle 8.6. Eigenschaften von A β (16-22)-Fibrillen.

Name	A β (16-22)	
Sequenz	Acetyl-KLVFFAE-Amid	
Organismus	Mensch	
Quelle	chemische Synthese (JPT Peptide Technologies)	
Anzahl an Aminosäuren	7	
Molekulargewicht	894 Da	
isoelektrischer Punkt	6,2	
Fibrillierungsbedingungen		
Konzentration	0,5 mg/ml	Amyloid Charakteristika
Lösungsmittel	Wasser	
	10 mM Natriumazid	Röntgenbeugung (\AA): 4,7 / 9,9 ¹²¹
pH	7,4	KR-grüne Doppelbrechung ¹²¹
Temperatur	Raumtemperatur	Amid-I-Maximum (cm^{-1}): 1634 (H_2O) ¹²¹
Zeit	10 d	

**Strukturelle Charakteristika**

lang

gerade

Fibrillendicke: 10-24 nm

teilweise gewunden

 β -Faltblatt: antiparallel (Festkörper-NMR)¹²¹

Tabelle 8.7. Eigenschaften von Apomyoglobin-Fibrillen.

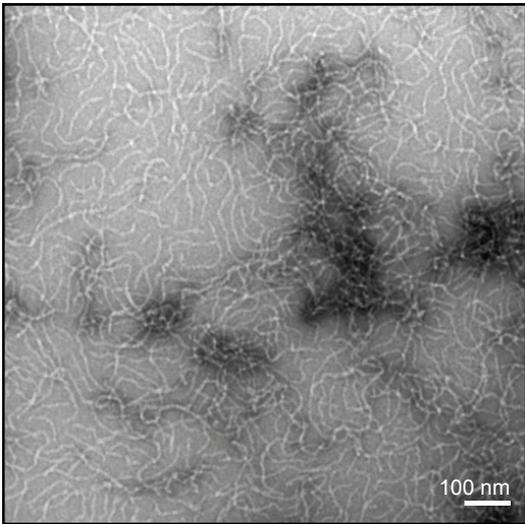
Name	Apomyoglobin	
Sequenz	GLSDGEWQQV-LNVWGKVEAD-IAGHGQEVLI-RLFTGHPETL-EKFDKFKHLK-TEAEMKASED-LKKHGTVVLT-ALGGILKKKG-HHEAELKPLA-QSHATKHKIP-IKYLEFISDA-IIHVLHSHKHP-GDFGADAQGA-MTKALELFRN-DIAAKYKELG-FQG	
Organismus	Pferd	
Quelle	rekombinant (Sigma-Aldrich)	
Anzahl an Aminosäuren	153	
Molekulargewicht	16951 Da	
isoelektrischer Punkt	7,4	
Fibrillierungsbedingungen		Amyloid Charakteristika
Konzentration	1 mg/ml	Röntgenbeugung (Å): 4,6 / 10,1 ⁴⁰
Lösungsmittel	50 mM Natriumborat	KR-Bindung ⁴⁰
pH	9,0	ThT Bindung ⁴⁰
Temperatur	65 °C	Amid-I'-Maximum (cm ⁻¹): 1617 (D ₂ O) ³⁶⁹
Zeit	7 d	
		Strukturelle Charakteristika
		kurz
		gebogen
		Fibrillendicke: ~ 11 nm
		

Tabelle 8.8. Eigenschaften von G-Helix-Fibrillen.

Name	G-Helix, Myoglobin(101-118)
------	-----------------------------

Sequenz Acetyl-IKYLEFISQA-IIHVLHSR-Amid

Organismus Pottwal

Quelle chemische Synthese (Jerini AG)

Anzahl an Aminosäuren 18

Molekulargewicht 2168 Da

isoelektrischer Punkt 8,6

Fibrillierungsbedingungen

Konzentration 1 mg/ml

Lösungsmittel 50 mM Natriumborat

pH 9,0

Temperatur 60 °C

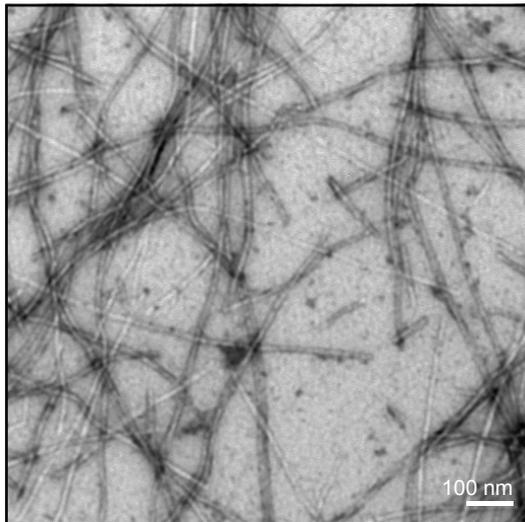
Zeit 7 d

Amyloid Charakteristika

Röntgenbeugung (Å): 4,7 / 10,9³⁶⁹

KR-grüne Doppelbrechung³⁶⁹

Amid-I'-Maximum (cm⁻¹): 1617 (D₂O)³⁶⁹



Strukturelle Charakteristika

lang

gerade

Fibrillendicke: ~ 17 nm

nicht sichtbar gewunden

Tabelle 8.9. Eigenschaften von hSAA(1-12)-Fibrillen.

Name	SAA(1-12)	
Sequenz	RSFFSFLGEA-FD (alle chiralen Aminosäuren: L-Enantiomer)	
Organismus	Mensch	
Quelle	chemische Synthese (JPT Peptide Technologies)	
Anzahl an Aminosäuren	12	
Molekulargewicht	1423 Da	
isoelektrischer Punkt	4,7	
Fibrillierungsbedingungen		
Konzentration	10 mg/ml	Amyloid Charakteristika ThT-Bindung ⁷⁰ Amid-I'-Maximum (cm ⁻¹): 1623 (D ₂ O) ⁷⁰
Lösungsmittel	10 % Essigsäure	
pH	2,0	
Temperatur	Raumtemperatur	
Zeit	1 d	
Strukturelle Charakteristika		
lang		
gerade		
Fibrillendicke: ~ 20 nm		
deutlich gewunden		
Helizität: rechtsgängig ⁷⁰		

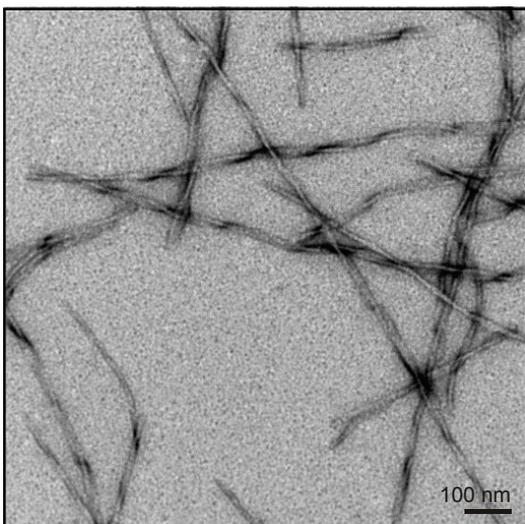


Tabelle 8.10. Eigenschaften von hSAA(1-12)-Fibrillen.

Name	SAA(1-12)
Sequenz	RSFFSFLGEA-FD (alle chiralen Aminosäuren: D-Enantiomer)
Organismus	Mensch
Quelle	chemische Synthese (JPT Peptide Technologies)
Anzahl an Aminosäuren	12
Molekulargewicht	1423 Da
isoelektrischer Punkt	4,7
Fibrillierungsbedingungen	
Konzentration	10 mg/ml
Lösungsmittel	10 % Essigsäure
pH	2,0
Temperatur	Raumtemperatur
Zeit	1 d

Amyloid CharakteristikaThT-Bindung⁷⁰Amid-I'-Maximum (cm⁻¹): 1623 (D₂O)⁷⁰**Strukturelle Charakteristika**

lang

gerade

Fibrillendicke: ~ 20 nm

deutlich gewunden

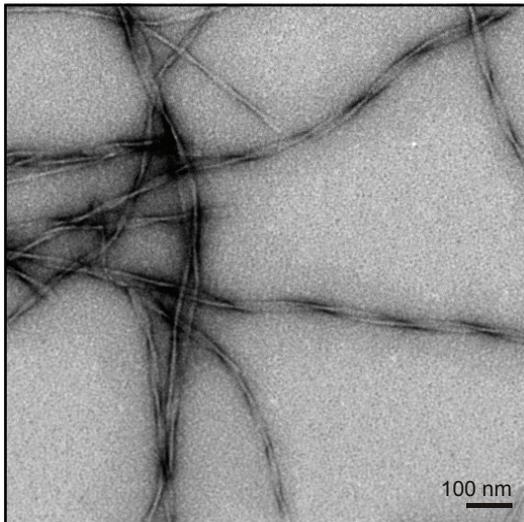
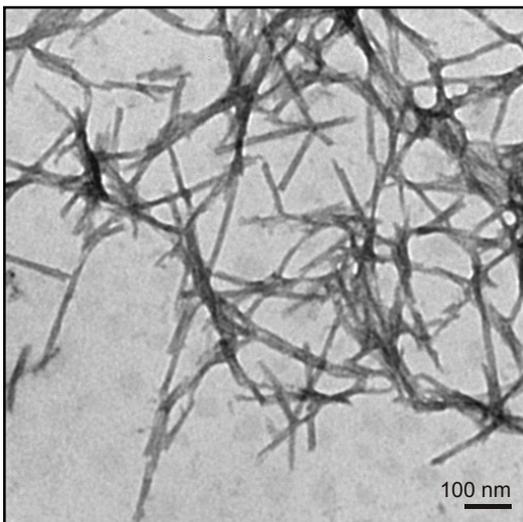
Helizität: linksgängig⁷⁰

Tabelle 8.11. Eigenschaften von hSAA(2-21)-Fibrillen.

Name	SAA(2-21)	
Sequenz	SFFSFLGEAF-DGARDMWRY	
Organismus	Mensch	
Quelle	chemische Synthese (Jerini AG)	
Anzahl an Aminosäuren	20	
Molekulargewicht	2374 Da	
isoelektrischer Punkt	4,6	
Fibrillierungsbedingungen		
Konzentration	10 mg/ml	Amyloid Charakteristika KR-grüne Doppelbrechung ²⁷ Amid-I-Maximum (cm ⁻¹): 1629 (H ₂ O)
Lösungsmittel	50 mM Natriumphosphat	
pH	1,0	
Temperatur	Raumtemperatur	
Zeit	4 d	

**Strukturelle Charakteristika**

kurz
gerade
Fibrillendicke: 14-29 nm
nicht deutlich gewunden
Helizität: linksgängig

Tabelle 8.12. Eigenschaften von hSAA-Fibrillen.

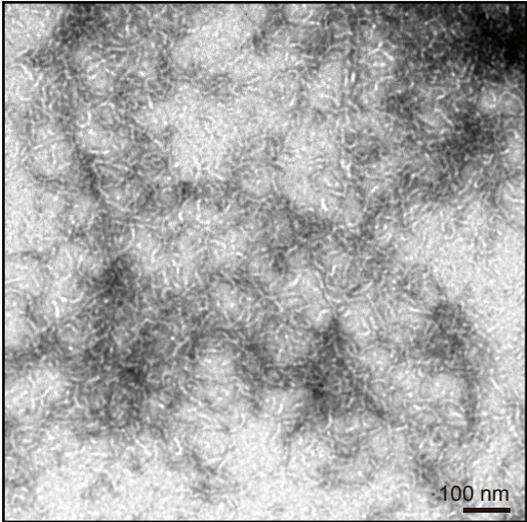
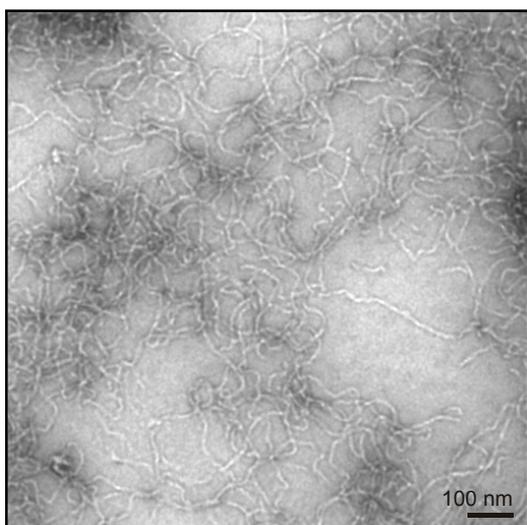
Name	hSAA	
Sequenz	RSFFSFLGEA-FDGARDMWRA-YSDMREANYI-GSDKYFHARG-NYDAAKRGPG-GVWAAEAISD-ARENIQRFFG-HGAEDSLADQ-AAANEWGRSGK-DPNHFRPAGL-PEKY	
Organismus	Mensch	
Quelle	rekombinant ³⁰⁶	
Anzahl an Aminosäuren	104	
Molekulargewicht	11683 Da	
isoelektrischer Punkt	5,9	
Fibrillierungsbedingungen		Amyloid Charakteristika
Konzentration	10 mg/ml	KR-grüne Doppelbrechung
Lösungsmittel	50 mM Natriumphosphat	Amid-I-Maximum (cm ⁻¹): 1618 (H ₂ O)
pH	1,0	
Temperatur	Raumtemperatur	
Zeit	4 d	
		Strukturelle Charakteristika
		kurz
		gebogen
		Fibrillendicke: ~ 13 nm
		

Tabelle 8.13. Eigenschaften von mSAA-Fibrillen.

Name	mSAA	
Sequenz	GFFSFIGEAF-QGAGDMWRAY-TDMKEAGWKD-GDKYFHARGN-YDAAQRGPGG-VWAAEKISDA-RESFQEFFGR-GHEDTMADQE-ANRHGRSGKD-PNYRPPGLP-AKY	
Organismus	Maus	
Quelle	rekombinant ²⁷	
Anzahl an Aminosäuren	103	
Molekulargewicht	11606 Da	
isoelektrischer Punkt	5,9	
Fibrillierungsbedingungen		Amyloid Charakteristika
Konzentration	5 mg/ml	KR-grüne Doppelbrechung ²⁷
Lösungsmittel	50 mM Natriumphosphat	Amid-I-Maximum (cm ⁻¹): 1620 (H ₂ O)
pH	3,0	
Temperatur	37 °C	
Zeit	2 d	

**Strukturelle Charakteristika**

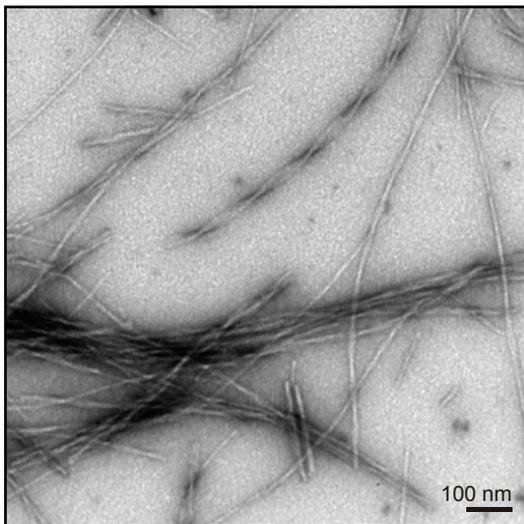
kurz

gebogen

Fibrillendicke: ~ 13 nm

Tabelle 8.14. Eigenschaften von Glucagon-Fibrillen.

Name	Glucagon	
Sequenz	HSQGTFTSDY-SKYLDSRRAQ-DFVQWLMNT	
Organismus	Mensch	
Quelle	Vega	
Anzahl an Aminosäuren	29	
Molekulargewicht	3483 Da	
isoelektrischer Punkt	6,8	
Fibrillierungsbedingungen		
Konzentration	1 mg/ml	Amyloid Charakteristika KR-grüne Doppelbrechung ³⁷⁰ Amid-I'-Maximum (cm^{-1}): 1613 (D_2O) ⁸⁴
Lösungsmittel	50 mM Natriumphosphat	
pH	3,0	
Temperatur	4 °C	
Zeit	2 d	

**Strukturelle Charakteristika**

lang
gerade
Fibrillendicke: 12-35 nm
große morphologische Heterogenität
meist gewunden

Tabelle 8.15. Eigenschaften von HET-s(218-289)-Fibrillen (pH 3).

Name	HET-s(218-289)	
Sequenz	MKIDAIVGRN-SAKDIRTEER-ARVQLGNVVT-AAALHGGIRI-SDQTTNSVET-VVGKGESRVL-IGNEYGGKGF-WDNHHHHHH	
Organismus	<i>P. anserina</i>	
Quelle	rekombinant (R. Riek; ETH, Zürich)	
Anzahl an Aminosäuren	79	
Molekulargewicht	8651 Da	
isoelektrischer Punkt	8,3	
Fibrillierungsbedingungen		Amyloid Charakteristika
Konzentration	1,5 mg/ml	ThT-Bindung ¹³³
Lösungsmittel	40 mM Borsäure	
	6 mM NaCl	
	10 mM Zitronensäure	
pH	3,0	
Temperatur	37 °C	
Zeit	7 d	
		Strukturelle Charakteristika
		lang
		gerade
		Fibrillendicke: ~ 15 nm
		deutlich gewunden

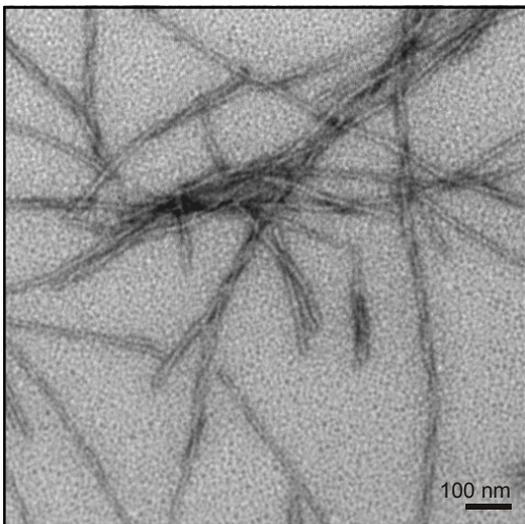


Tabelle 8.15. Eigenschaften von HET-s(218-289)-Fibrillen (pH 7,5).

Name	HET-s(218-289)	
Sequenz	MKIDAIVGRN-SAKDIRTEER-ARVQLGNVVT-AAALHGGIRI-SDQTTNSVET-VVGKGESRVL-IGNEYGGKGF-WDNHHHHHH	
Organismus	<i>P. anserina</i>	
Quelle	rekombinant (R. Riek; Zürich)	
Anzahl an Aminosäuren	79	
Molekulargewicht	8651 Da	
isoelektrischer Punkt	8,3	
Fibrillierungsbedingungen		Amyloid Charakteristika
Konzentration	1,5 mg/ml	Elektronenbeugung (Å): 4,7 ¹³³
Lösungsmittel	150 mM Essigsäure	KR-Bindung ¹³³
pH	7,5 (mit 3 M Tris eingestellt)	Amid-I-Maximum (cm ⁻¹): 1628 (H ₂ O) ¹³³
Temperatur	Raumtemperatur	
Zeit	sofort	
		Strukturelle Charakteristika
		lang
		gerade
		Fibrillendicke: 12-40 nm
		nicht sichtbar gewunden
		β-Faltblatt: parallel (Festkörper-NMR) ¹¹²
		linksgewundene β-Helix ¹¹²

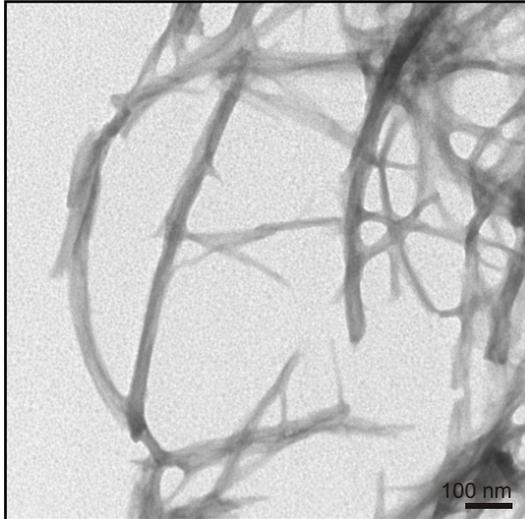


Tabelle 8.16. Eigenschaften von TTR-Fibrillen.

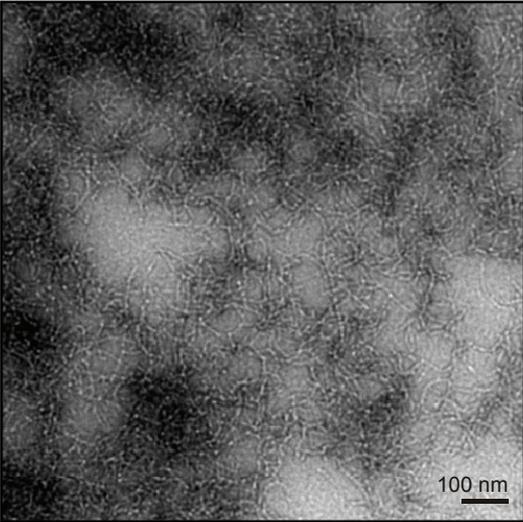
Name	Transthyretin	
Sequenz	GPTGTGESKC-PLMVKVLDVAV-RGSPAINVAV-HVFRKAADDV-WEPFASGKTS- ESGELHGLTT-EEEFVEGIYK-VEIDTKSYWK-ALGISPFHEH-AEVVFTANDS- GPRRYTIAAL-LSPYSYSTTA-VVTNPKE	
Organismus	Mensch	
Quelle	rekombinant (J. Kelly, Scripps Research Institute, La Jolla)	
Anzahl an Aminosäuren	127	
Molekulargewicht	13761 Da	
isoelektrischer Punkt	5,4	
Fibrillierungsbedingungen		Amyloid-Charakteristika
Konzentration	1 mg/ml	Amid-I'-Maximum (cm ⁻¹): 1615(D ₂ O) ⁸⁴
Lösungsmittel	50 mM Natriumphosphat	
pH	2,0	
Temperatur	37 °C	
Zeit	2 d	
		Strukturelle Charakteristika
		kurz
		gebogen
		Fibrillendicke: ~ 10 nm
		

Tabelle 8.17. Eigenschaften von Insulin-Fibrillen.

Name	Insulin
------	---------

Sequenz GIVEQCCTSI-CSLYQLENYC-N (**Kette A**)
 FVNQHLCGSH-LVEALYLVCG-ERGFYTPKT (**Kette B**)

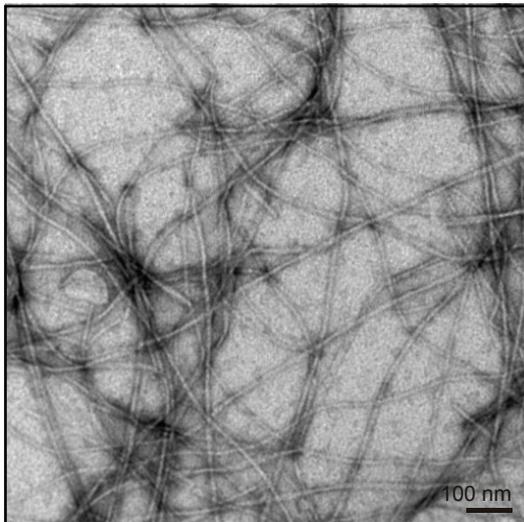
Organismus Mensch
Quelle rekombinant (Sigma-Aldrich)
Anzahl an Aminosäuren 51
Molekulargewicht 5796 Da
isoelektrischer Punkt 5,4

Fibrillierungsbedingungen

Konzentration 1 mg/ml
 Lösungsmittel Wasser
 pH 2,0
 Temperatur 60 °C
 Zeit 2 d

Amyloid Charakteristika

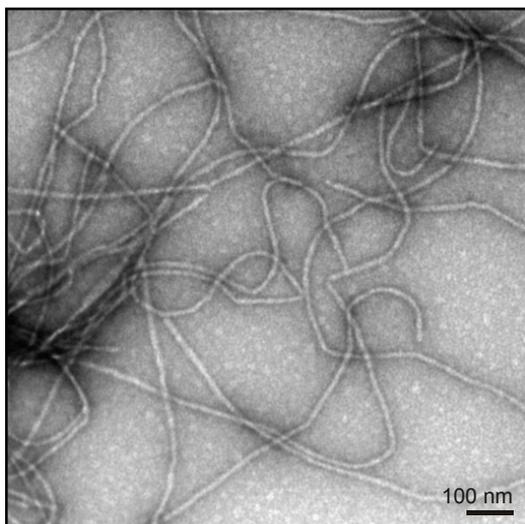
KR-grüne Doppelbrechung
 Amid-I-Maximum (cm^{-1}): 1628 (H_2O)

**Strukturelle Charakteristika**

lang
 gerade
 Fibrillendicke: ~ 18 nm
 nicht sichtbar gewunden

Tabelle 8.18. Eigenschaften von PABPN1-(+7)Ala-Fibrillen.

Name	Poly(A)-Bindeprotein 1-(+7)Ala(1-125)	
Sequenz	MGSSHHHHHH-SSGLVPRGSH-MAAAAAAAAAA-AAAAAAAAAGA-AGGRGSGPGR- RRHLVPGAGG-EAGEGAPGGA-GDYGNGLSE-ELEPEELLLE-PEPEPEPEEE- PPRPRAPPGA-PGPGPGSGAP-GNQEEEEESG-LVEGDPGDGA-IEDPELEAIK- AR	
Organismus	Rind	
Quelle	rekombinant (E. Schwarz, MLU, Halle (Saale))	
Anzahl an Aminosäuren	152	
Molekulargewicht	14818 Da	
isoelektrischer Punkt	4,6	
Fibrillierungsbedingungen		Amyloid Charakteristika
Konzentration	1 mg/ml	ThT-Bindung ³²³
Lösungsmittel	5 mM Kaliumphosphat 150 mM NaCl 1 % (w/v) Natriumazid	Amid-I'-Maximum (cm ⁻¹): 1621 (D ₂ O) ³²³
pH	7,4	
Temperatur	37 °C	
Zeit	30 d	

**Strukturelle Charakteristika**

lang
gekrümmt
Fibrillendicke: ~ 15 nm
nicht sichtbar gewunden
 β -Faltblatt: antiparallel (FTIR)³²³

9. Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, gemäß der Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der FSU Jena vom 22. August 2007, dass die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden.

Die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena ist mir bekannt.

Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde von mir nicht in Anspruch genommen.

Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit der vorgelegten Dissertation stehen.

Die vorliegende Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Prüfungsbehörde oder Hochschule eingereicht.

Christian Haupt

Jena, den 05. November 2010

10. Publikationen, Vorträge und Poster

Publikationen

- 2011** „Pattern recognition with a fibril-specific antibody fragment reveals the surface variability of natural amyloid fibrils”
C. Haupt et al.; *J. Mol. Biol.* **408**, 529-540.
- 2011** „Amyloid fibril recognition with the conformational B10 antibody fragment depends on electrostatic interactions”
C. Haupt et al.; *J. Mol. Biol.* **405**, 341-348.
- 2008** „Limb articulation in caridoid crustaceans revisited - New evidence from Euphausiacea (Malacostraca)”
C. Haupt & S. Richter; *Arthropod Struct. Dev.* **37**, 221-233.
- 2007** „Directed selection of a conformational antibody domain that prevents mature amyloid fibril formation by stabilizing A β protofibrils“
G. Habicht, G. & C. Haupt et al.; *Proc Nat Acad Sci USA* **104**, 19232-19237.

Vorträge

- 04/2009** „Analysis of the amyloid-specific conformational antibody-domain B10”
Minisymposium „Proteinfehlfaltung bei der Alzheimerschen Krankheit“, Halle (Saale).
- 03/2009** „Analysis of the amyloid-specific conformational antibody-domain B10”
SFB 610 Workshop, Oppurg.

10/2008	<p>„Charakterisierung der konformations- und amyloid-spezifischen Antikörper-Domäne B10“</p> <p>23. Amyloidforum der deutschen Gesellschaft für Amyloidkrankheiten, Berlin.</p>
03/2008	<p>„Directed selection of a conformational antibody domain that prevents mature amyloid fibril formation by stabilizing Aβ protofibrils“</p> <p>International Symposium and meeting on „Systemic amyloidoses and related issues“ (3. EURAMY Meeting), Berlin.</p> <p>Poster</p>
02/2009	<p>„Analysis of the amyloid-specific conformational antibody-domain B10“</p> <p><u>C. Haupt</u> <i>et al.</i>; International Bunsen Discussion Meeting on „Structure of amyloid fibrils and mechanism of amyloid formation“, Halle (Saale).</p>
02/2006	<p>„Selection of a conformation-sensitive anti-amyloid antibody from a synthetic camelid VHH domain library“</p> <p><u>C. Haupt</u> <i>et al.</i>; FASEB Summer Research Conference Snowmass Village (Colorado, USA).</p>
02/2005	<p>„Die Beimgelenkung der Peracarida und ihre phylogenetische Deutung“</p> <p><u>C. Haupt</u> & S. Richter; 12. Crustaceologen-Tagung, Wilhelmshaven.</p>

11. Abkürzungen

Θ_{MWR}	mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest
CDR	Hypervariable Region (<i>complementarity determining region</i>)
CLAC	kollagenähnliche Alzheimer amyloide Plaque-Komponente (<i>collagen-like Alzheimer amyloid plaque component</i>)
DTT	Dithiothreitol
DMSO	Dimethylsulfoxid
EM	Elektronenmikroskopie
ETH	Eidgenössische Technische Hochschule
FTIR	Fourier-Transform-Infrarot
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HFIP	1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol
HKI	Hans Knöll Institut
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
K_{D}	apparente Dissoziationskonstante
KR	Kongorot
MBP	Maltose-Bindeprotein
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
MLU	Martin-Luther-Universität
MPF	Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung
NMR	Kernspinresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RAGE	Rezeptor für Endprodukte fortgeschrittener Glykosilierung (<i>receptor for advanced glycation end products</i>)
SAA	Serum Amyloid A
SAP	Serum Amyloid P
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (<i>Tris buffered saline</i>)
TBST	TBS mit Tween 20
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie
ThT	Thioflavin T
TTR	Transthyretin
Upm	Umdrehungen pro Minute

12. Abbildungen und Tabellen

12.1. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1.	Konzept der Bildung von Amyloidfibrillen als generische Eigenschaft von Polypeptidketten.	4
Abb. 1.2.	Die fibrilläre Gesamtstruktur von Amyloidfibrillen.	6
Abb. 1.3.	Die gekreuzte β -Faltblatt-Struktur von Amyloidfibrillen.	7
Abb. 1.4.	Die Interaktion von KR mit Amyloidfibrillen.	8
Abb. 1.5.	Die Interaktion von ThT mit Amyloidfibrillen.	9
Abb. 1.6.	FTIR-Spektren von globulär gefaltetem TTR oder TTR-Fibrillen.	10
Abb. 1.8.	Struktur einer HET-s(218-289)-Amyloidfibrille (pH 7,5).	12
Abb. 1.9.	Strukturmodelle von A β (1-40)- oder A β (1-42)-Amyloidfibrillen, abgeleitet von Festkörper-NMR.	13
Abb. 1.10.	Strukturmodelle von A β (1-40)- oder A β (1-42)-Amyloidfibrillen, abgeleitet von Kryo-EM.	14
Abb. 1.11.	Strukturen und Strukturmodelle von Mikrokristallen und Amyloidfibrillen.	15
Abb. 1.12.	Polymorphismen von Amyloidfibrillen.	16
Abb. 1.13.	Eigenschaften einer nukleationsabhängigen Aggregation.	18
Abb. 1.14.	Auftreten verschiedener Aggregate im zeitlichen Verlauf der Aggregationsreaktion.	19
Abb. 1.15.	Aggregations-Spezies und ihr pathogener Mechanismus.	22
Abb. 1.16.	Der Mechanismus der Erkennung von Amyloidfibrillen durch KR.	23
Abb. 1.17.	Der Mechanismus der Erkennung von Amyloidfibrillen durch ThT.	24
Abb. 1.18.	Der strukturelle Aufbau von SAP.	25
Abb. 1.19.	Der strukturelle Aufbau von RAGE.	27
Abb. 1.20.	Der schematische Aufbau von CLAC.	28
Abb. 1.21.	Die Bindungseigenschaften des fibrillenspezifischen Antikörpers WO1.	29
Abb. 1.22.	Vergleich konventioneller und Schwere-Kette-Antikörper.	31
Abb. 1.23.	Synthese und Eigenschaft der kameliden VHH-Domänen-Bibliothek.	33

Abb. 1.24. Untersuchung der konformationellen Spezifität von B10 mit Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Spektroskopie.	35
Abb. 1.25. Untersuchung der konformationellen Spezifität von B10 mittels Spot-Blot.	36
Abb. 1.26. B10AP erkennt in vivo gebildete A β (1-40)-Fibrillen.	38
Abb. 1.27. Lokalisierung des B10-Epitops entlang der A β (1-40)-Fibrille.	39
Abb. 1.27. Vergleich der molekularen Dimensionen von B10 und einer gekreuzten β -Faltblatt-Struktur.	41
Abb. 2.1. Organisation des exprimierten A β (1-40) Fusionsproteins.	56
Abb. 2.2. Organisation der exprimierten VHH-Domäne B10.	57
Abb. 2.3. Organisation des exprimierten Fusionsproteins B10AP.	58
Abb. 2.5. Organisation der exprimierten Pektat-Lyase Pel-15.	60
Abb. 2.6. Enzymatische Spaltung von Polygalakturonsäure durch Pektat-Lyasen	62
Abb. 2.7. Präparation kohlebedampfter, mit Formvarfilm überzogener Netzchen	71
Abb. 2.8. Negativkontrastierung einer TEM-Probe mit der Tropfentechnik.	72
Abb. 3.1. B10AP zeigt keine signifikante Interaktion mit A β (1-40)-Oligomeren.	76
Abb. 3.2. B10 zeigt keine signifikante Interaktion mit intrinsisch ungefalteten oder globulär gefalteten Polypeptidketten.	78
Abb. 3.3. Vergleich der strukturellen Diversität der getesteten globulär gefalteten Polypeptidketten.	79
Abb. 3.4. Struktureller Vergleich der antigenbindenden Region von B10 und einem sequenzspezifischen Anti-A β -Antikörper.	80
Abb. 3.5. Die CDRs von B10 sind mit positiv geladenen Aminosäuren angereichert.	81
Abb. 3.6. Aufreinigung der B10-Mutante H35A.	82
Abb. 3.7. Analyse der B10-Mutante H35A.	83
Abb. 3.8. Positiv geladene CDR-Reste sind entscheidend für die Bindung von B10 an A β (1-40)-Fibrillen.	84
Abb. 3.9. B10 bindet A β (1-40)-Fibrillen durch elektrostatische Interaktionen.	86
Abb. 3.10. Aufreinigung der A β (1-40)-Mutante D1G.	88
Abb. 3.11. Lokalisierung der B10-Bindungsstelle an der A β (1-40)-Fibrille.	90
Abb. 3.12. B10 erkennt verschiedene Amyloidfibrillen durch dieselbe Binderegion.	91

Abb. 3.13. TEM-Analyse der untersuchten in vitro-Amyloidfibrillen.	94
Abb. 3.14. Das B10-Epitop ist bei Amyloidfibrillen weit verbreitet, jedoch nicht generisch.	96
Abb. 3.15. Vergleich der Ladungsoberfläche von globulär gefalteten Polypeptidketten und B10-positiven Amyloidfibrillen.	98
Abb. 3.16. Interaktion von B10 mit Heparin und DNS.	99
Abb. 3.17. Vergleich des elektrostatischen Oberflächenpotentials von B10 und RAGE.	101
Abb. 3.18. Vergleich der Bindungscharakteristika von B10 und RAGE.	102
Abb. 3.19. B10 und RAGE weisen ähnliche Ligandenspezifitäten auf.	103
Abb. 3.20. Vergleich der Anordnung negativer Ladungen verschiedener Pel-15 Varianten.	104
Abb. 3.21. Aufreinigung der Pel-15-Mutante M6+.	106
Abb. 3.22. 1D- ¹ H-NMR-Spektren verschiedener Pel-15-Varianten.	107
Abb. 3.23. B10 zeigt keine Interaktion mit den untersuchten Pel-15-Varianten.	108
Abb. 3.24. Das B10-Epitop entsteht bevor ThT-positive A β (1-40)-Fibrillen nachweisbar sind.	110
Abb. 3.25. B10AP verhindert die Bildung von A β (1-40)-Fibrillen.	112
Abb. 3.26. B10AP stabilisierte Aggregate weisen die Charakteristika von Protofibrillen auf.	114
Abb. 3.27. B10 bindet A β (1-40)-Fibrillen an einer anderen Stelle als KR oder ThT.	115
Abb. 3.28. B10AP führt nicht zur Auflösung bereits gebildeter A β (1-40)-Fibrillen.	117
Abb. 4.1. B10 verhindert die Bildung von Amyloidfibrillen durch Stabilisierung von Protofibrillen.	120
Abb. 4.2. Bindung von B10 an chemisch modifizierte Amyloidfibrillen.	123
Abb. 4.3. Abhängigkeit von spezifischen Ladungsmustern von den strukturellen Grundlagen von Amyloidfibrillen.	127
Abb. 4.4. Vergleich der Ladungsverteilung von paralleler und antiparalleler β -Faltblatt-Organisation in Amyloidfibrillen.	130
Abb. 4.5. Einfluss von B10AP auf die Mechanismen der Bildung von Amyloidfibrillen aus Protofibrillen.	134
Abb. 4.6. Strukturelle Flexibilität der A β (1-40)-Polypeptidkette in B10AP-stabilisierten Protofibrillen.	136

12.2. Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1.	Auswahl an Polypeptidketten, die mit Amyloidosen assoziiert sind.	2
Tab. 2.1.	Chemikalien.	43
Tab. 2.2.	Kits, Standards und gebrauchsfertige Lösungen.	45
Tab. 2.3.	Chromatographiemedien und ihre Anwendung.	45
Tab. 2.4.	Sonstige verwendete Materialien.	46
Tab. 2.5.	Verwendete Geräte.	47
Tab. 2.6.	Verwendete Programme.	48
Tab. 2.7.	Übersicht der genutzten Plasmide.	49
Tab. 2.8.	Übersicht der genutzten Primer für die ortsspezifische Mutagenese.	49
Tab. 2.9.	Liste der verwendeten Restriktionsenzyme.	51
Tab. 2.10.	Zusammenfassung der verwendeten <i>E. coli</i> -Stämme.	51
Tab. 2.11.	Verwendete Kulturmedien und ihre Bestandteile.	52
Tab. 2.12.	Eigenschaften der getesteten globulär gefalteten Polypeptidketten.	53
Tab. 2.13.	Liste der getesteten intrinsisch ungefalteten Polypeptide.	54
Tab. 2.14.	Übersicht der verwendeten <i>ex vivo</i> -Amyloidfibrillen.	54
Tab. 2.15.	Verwendete Antikörper.	55
Tab. 2.16.	Liste weiterer Proteine.	55
Tab. 2.17.	Verwendete Puffer für die Aufreinigung von A β (1-40).	57
Tab. 2.18.	Verwendete Puffer für die Aufreinigung von B10.	58
Tab. 2.19.	Verwendete Puffer für die Aufreinigung von B10AP.	59
Tab. 2.20.	Puffer für die Aufreinigung des Pel-15-Wildtyps.	60
Tab. 2.21.	Puffer für die Isolation von Pel-15-Einschlusskörpern.	61
Tab. 2.22.	Puffer für die Aufreinigung der Pel-15-Varianten aus Einschlusskörpern.	61
Tab. 2.23.	Lösungen für die Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.	63
Tab. 2.24.	Lösungen für die Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen.	64
Tab. 2.25.	Verwendete Lösungen für die Spot-Blot-Analyse.	67
Tab. 2.26.	Verwendete Lösungen für die alkalische KR-Methode.	69
Tab. 3.1.	Übersicht der strukturellen Eigenschaften der untersuchten <i>in vitro</i> -Amyloidfibrillen.	93
Tab. 8.1.	Analyse der aufgereinigten B10-Varianten.	159
Tab. 8.2.	Eigenschaften von A β (1-40)-Fibrillen (pH 9).	160

Tab. 8.3.	Eigenschaften von A β (1-40)-Fibrillen (pH 7,4).	161
Tab. 8.4.	Eigenschaften von A β (1-42)-Fibrillen.	162
Tab. 8.5.	Eigenschaften von A β (11-25)-Fibrillen.	163
Tab. 8.6.	Eigenschaften von A β (16-22)-Fibrillen.	164
Tab. 8.7.	Eigenschaften von Apomyoglobin-Fibrillen.	165
Tab. 8.8.	Eigenschaften von G-Helix-Fibrillen.	166
Tab. 8.9.	Eigenschaften von hSAA(1-12)-Fibrillen.	167
Tab. 8.10.	Eigenschaften von hSAA(1-12)-Fibrillen.	168
Tab. 8.11.	Eigenschaften von hSAA(2-21)-Fibrillen.	169
Tab. 8.12.	Eigenschaften von hSAA-Fibrillen.	170
Tab. 8.13.	Eigenschaften von mSAA-Fibrillen.	171
Tab. 8.14.	Eigenschaften von Glucagon-Fibrillen.	172
Tab. 8.15.	Eigenschaften von HET-s(218-289)-Fibrillen (pH 3).	173
Tab. 8.15.	Eigenschaften von HET-s(218-289)-Fibrillen (pH 7,5).	174
Tab. 8.16.	Eigenschaften von TTR-Fibrillen.	175
Tab. 8.17.	Eigenschaften von Insulin-Fibrillen.	176
Tab. 8.18.	Eigenschaften von PABPN1-(+7)Ala-Fibrillen.	177