

Abstract

Alzheimer's disease (AD) has two hallmarks: the extracellular amyloid plaques (AP) consisting mainly of the β -amyloid peptide and the intracellular neurofibrillary tangles (NFT) containing mainly of Tau protein. The Alzheimer Tau is hyper-phosphorylated, and this abnormal phosphorylation is an early signal for neurodegeneration in AD. The function of Tau binding to microtubule (MT) and stabilizing them is regulated by phosphorylation. One of the kinases that plays a role in this process is the microtubule-affinity-regulating kinase (MARK).

In this study, I used the phage display recombinant antibody technique to generate new antibodies recognizing phosphorylated Tau and MARK in order to develop diagnostic tools for recognizing MARK in diseased tissue, transgenic animal models and Alzheimer Tau in the cerebrospinal fluid (CSF).

I established a phage display antibody library based on the hybridoma cells which produce Tau-1 monoclonal antibody. From this library, I obtained the scFv-Tau193-204 antibody which has the same properties as Tau-1 monoclonal antibody.

From the Griffin.1 library (a gift from Prof. Winter), I obtained four scFv antibodies against Tau. The scFv-TauS235p and scFv-TauS320p/S324p antibodies are phosphorylation-dependent. The scFv-TauS320p/S324p can distinguish the Alzheimer Tau from the control Tau; the scFv-TauS235p antibody showed by immunofluorescence that Tau in mitotic CHO cells is phosphorylated at Ser235. The scFv-Tau13-24 and scFv-Tau349-360 are phosphorylation-independent, the scFv-Tau13-24 antibody is human Tau-specific and can therefore be used to distinguish endogenous Tau from human Tau in transgenic animal models.

From the Griffin.1 library, I obtained two scFv antibodies against MARK. The scFv-PanMARK antibody recognizes all MARK isoforms, whereas the scFv-MARK1-535-549 is MARK1-specific. The scFv-PanMARK antibody can detect the overexpressed MARK in CHO cells by immunofluorescence.

By gene manipulation, I made tetramerized scFv antibodies. Comparing the monovalent scFv antibody to the tetravalent scFv antibody, I could show that the tetravalent scFv antibody has a 10-fold higher functional affinity.

Zusammenfassung

Die Alzheimersche Krankheit (Alzheimer's disease, AD) zeigt zwei Merkmale: die extrazellulären Amyloid-Plaques (AP), die hauptsächlich aus β -Amyloid-Peptiden bestehen und die intrazellulären neurofibrillären Bündeln (intracellular neurofibrillary tangles, NFT), die hauptsächlich aus dem Tau-Protein bestehen. Dieses Tau ist hyperphosphoryliert und die abnormale Phosphorylierung stellt ein frühes Signal für Neurodegeneration in AD. Die Funktion von Tau, Modulation der Stabilität von Mikrotubuli (MT) bindet und stabilisiert, wird durch Phosphorylierung reguliert. Eine der Kinasen, die eine wichtige Rolle in diesem Prozeß spielt, ist die Mikrotubuli-Affinität-regulierende Kinase (microtubule affinity regulating kinase, MARK).

In meiner Arbeit wurde die rekombinante Antikörper Phagen-Display Technologie für die Erzeugung neuer Antikörper verwendet, die phosphoryliertes Tau und MARK erkennen. Damit sollten diagnostische Werkzeuge zur Detektion von MARK in erkrankten Geweben, transgenen Tiermodellen und von Alzheimer-Tau in der cerebrospinalen Flüssigkeit (cerebrospinal fluid, CSF) entwickelt werden.

Ich etablierte eine Phagen-Display-Antikörperbibliothek aus Hybridoma-Zellen, die monoklonale Antikörper gegen Tau-1 produzieren. Aus dieser Bibliothek erhielt ich den Antikörper scFv-Tau193-204, der die gleichen Eigenschaften wie der monoklonale Antikörper gegen Tau-1.

Aus der Griffin.1-Bibliothek (ein Geschenk von Prof. Winter) erhielt ich vier scFv-Antikörper gegen Tau, wobei scFv-TauS235p und scFv-TauS320p/S324p eine phosphorylierungsabhängige Bindung zeigen. Der scFv-TauS320p/S324p kann das Alzheimer-Tau von Kontroll-Tau unterscheiden. In der Immunofluoreszenz zeigte der scFv-TauS235p-Antikörper, daß in mitotischen CHO-Zellen Tau an Ser235 phosphoryliert ist. Die scFv-Tau13-24 und scFv-Tau349-360 sind phosphorylierungsunabhängig. Der scFv-Tau13-24-Antikörper ist spezifisch für menschliches Tau und kann somit zur Unterscheidung des endogenen Tau von menschlichem Tau in transgenen Tiermodellen verwendet werden.

Aus der Griffin.1-Bibliothek erhielt ich zwei scFv-Antikörper gegen MARK. Der scFv-PanMARK-Antikörper erkennt alle Isoformen von MARK, während der scFv-MARK1-535-549 MARK1-spezifisch ist. Der scFv-PanMARK-Antikörper kann in der Immunofluoreszenz die überexprimierte MARK in CHO-Zellen detektieren.

Mit Methoden der Genmanipulation erzeugte ich tetramerisierte scFv-Antikörper. Verglichen mit einem monovalenten scFv-Antikörper zeigen tetraivalente scFv-Antikörper eine zehnfach höhere funktionelle Affinität.