

Charakterisierung der Oligomerisierung des Amyloid- β -Peptids

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Martin Wolff aus Greifswald

Düsseldorf, Dezember 2014

Aus dem Institut für Physikalische Biologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Referent: Prof. Dr. Dieter Willbold
Koreferent: Prof. Dr. Heike Brötz-Oesterhelt
Tag der mündlichen Prüfung: 22.01.2015

It's always darkest just before it goes pitch black.

-Unknown-

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1 Einleitung	3
1.1 Alzheimersche Demenz	3
1.2 Amyloid β	3
1.3 Analytische Ultrazentrifugation	4
1.4 Ziele der Arbeit	5
2 Material	7
2.1 Puffer	7
2.2 Chemikalien	7
2.3 Geräte	8
2.4 Proteine	8
2.5 Software	9
3 Methoden	11
3.1 Probenvorbereitung	11
3.2 Analytische Ultrazentrifugation	11
3.2.1 Theoretische Grundlagen	11
3.2.2 Die Messzelle	14
3.2.3 Die Optiken	14
3.3 Datenauswertung von AUZ-Messungen	17
3.3.1 Sednterp	17
3.3.2 Sedfit	18
3.3.3 UltraScan	19
3.4 Zirkulardichroismus	20
3.5 ThioflavinT-Assay	21
3.6 Rasterkraftmikroskopie	22
4 Aβ42: Charakterisierung des Ausgangsmaterials	25
4.1 Das Absorptionsspektrum von A β 42	25
4.2 Sekundärstrukturbestimmung	27
4.3 AUZ zur Charakterisierung des A β 42-Monomers	29
5 Die Aggregation des Aβ42	31
5.1 Charakterisierung der Aggregation des A β 42 in NaP $_i$	31
5.2 Die Suche nach dem Dimer	34
5.3 Oligomergrößenverteilung von A β 42	38
5.4 Einfluss von Metallionen auf die Aggregation	44
5.5 Einfluss von Proteinen auf die Aggregation	46
6 AUZ mit Fluoreszenzdetektionssystem	47
6.1 Die Bedienung des FDS	47
6.2 Die Wahl der Schichtdicke des Mittelstückes	48

6.3	Die Fluoreszenzmarkierung	51
6.3.1	Nicht kovalente Fluoreszenzmarkierung	51
6.3.2	Kovalente Fluoreszenzmarkierung	54
6.4	SV-Analysen von fluoreszenzmarkiertem A β 42	55
6.5	Die Oligomerisierung von fluoreszenzmarkiertem A β 42	58
6.6	Verwendung des FDS für EQ-Läufe	62
7	Aβ42 in physiologischer Umgebung	65
7.1	Charakterisierung des verwendeten CSF	65
7.2	Bestimmung von Dichte und Viskosität des CSF mittels AUZ	68
7.3	A β 42 in CSF	72
8	Diskussion	73
8.1	Charakterisierung des monomeren A β 42-Peptids	73
8.2	Die Oligomerisierung	74
8.3	A β 42 und CSF	76
8.4	Der mögliche Mechanismus der Oligomerbildung des A β 42	77
9	Zusammenfassung	79
10	Summary	81
11	Selbstständigkeitserklärung	83
12	Danksagung	85
	Literaturverzeichnis	85

Abkürzungsverzeichnis

A β 40	Amyloid β 40
A β 42	Amyloid β 42
A β	Amyloid β
aCSF	artifizielles CSF
AD	Alzheimersche Demenz
AFM	Rasterkraftmikroskopie
Alexa488-A β 42	AlexaFluor488-Maleimid-(Cys ⁰)-Amyloid β 42
ApoE	Apolipoprotein E
ApoE3	Apolipoprotein E3
ApoE4	Apolipoprotein E4
APP	Amyloid-Precursor-Protein
AUZ	Analytische Ultrazentrifugation
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Zirkulardichroismus
cP	Centipoise
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
Cys-A β 40	(Cys ⁰)-Amyloid β 40
DCVJ	9-(2,2-Dicyanovinyl)julolidin
EQ-Lauf	Sedimentationsgleichgewichtslauf
FDS	Fluoreszenzdetektionssystem
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FITC-A β 42	FITC- β -Ala-Amyloid β 42
GA	genetischer Algorithmus
GFP	Green-Fluorescent-Protein
GFP-1433	Green-Fluorescent-Protein-1433
HFIP	1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol
HSA	Humanes Serumalbumin
K _D	Dissoziationskonstante
MC	Monte Carlo

ME	molare Elliptizität
MRE	molare Elliptizität pro Aminosäurerest
NaP _i	10 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,4
OG488-A β 42	OregonGreen488-Amyloid β 42
PBS	Dulbeccos PBS
PBSCM	Dulbeccos PBS mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺
PGA	programmierbarer Gainverstärker
Ri-Noise	radialunabhängiges Rauschen
RMSD	Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung
rpm	Umdrehungen pro Minute
SV-Lauf	Sedimentationsgeschwindigkeitslauf
Sörensen	10 mM Sörensen-Puffer pH 7.4
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin-Hydrochlorid
ThT	Thioflavin T
Ti-Noise	zeitunabhängiges Rauschen
UZ	Analytische Ultrazentrifuge

1 Einleitung

In einer Gesellschaft mit zunehmend längeren Lebenserwartungen steigt die Bedeutung von Erkrankungen des Alters und deren Therapie. Eine große Rolle spielen die Demenzerkrankungen. Dem Welt-Alzheimer-Report 2014 nach leiden weltweit 44 Millionen Menschen an Demenz und die Kosten für die Pflege liegen bei 600 Milliarden US-Dollar im Jahr (Angabe von 2010) [1]. Zur Gruppe der Demenzerkrankungen gehören u. a. Alzheimersche Demenz, Frontotemporale Demenz und Vaskuläre Demenz. Die Neuropathologie der Demenzerkrankungen ist sehr verschieden. Gemeinsam ist allen, dass eine Heilung nicht möglich ist. Im Folgenden wird die Alzheimersche Demenz näher betrachtet.

1.1 Alzheimersche Demenz

Die Alzheimersche Demenz (AD) ist eine neurodegenerative Erkrankung. AD wurde 1906 durch Alois Alzheimer erstmals beschrieben. Die Erkrankung zeichnet sich u. a. durch einen fortschreitenden Gedächtnisverlust, zunehmenden Verlust der Feinmotorik und des Sprachvermögens aus. Pathophysiologisch ist AD durch das Vorhandensein von Ablagerungen in Form von amyloiden Plaques (des Amyloid β -Peptids) und neurofibrillären Bündeln (des Tau-Peptids) im Gehirn gekennzeichnet. Mit fortschreitender Erkrankung kommt es zum vermehrten Absterben von Neuronen. Dies kann erst post mortem nachgewiesen werden. Während lange Zeit vermutet wurde, dass die Plaques die Ursache für das Absterben der Neuronen sind, deuten die Untersuchungen der letzten 12 Jahre auf die löslichen, nicht fibrillären Formen der Proteine als Ursachen hin. Vor allem die Forschung an den löslichen Strukturen des Amyloid β hat in den letzten Jahren zugenommen, um die Entwicklung von AD besser zu verstehen und mögliche Zielstrukturen für Arzneimittel zu entdecken [2].

1.2 Amyloid β

Amyloid β ($A\beta$) wird durch die proteolytische Spaltung des Amyloid-Precursor-Proteins (APP) gebildet. APP ist ein transmembranes Glycoprotein und wird in den meisten peripheren Zellen exprimiert. Die Abspaltung des extrazellulären Bereiches des APP kann durch verschiedene Sekretasen erfolgen. Eine Spaltung des APP durch die β - und γ -Sekretase führt zur Bildung des $A\beta$. Die Fragmentlänge des resultierenden $A\beta$ variiert zwischen 38 und 43 Aminosäuren. Den größten Mengenanteil aller Fragmente stellt dabei das $A\beta_{40}$. Das Fragment mit der höchsten Aggregationsneigung ist das $A\beta_{42}$, dieses weist daher auch die höchste Zelltoxizität auf. Der Ablauf der Aggregation des $A\beta_{42}$ ist komplex und wird durch viele Faktoren beeinflusst. In der Literatur sind verschiedene Aggregate beschrieben, aber kein einheitlicher Mechanismus für den Ablauf der Aggregation. Das $A\beta$ ist ein hydrophobes, intrinsisch ungeordnetes Peptid. Ausgehend von monomerem $A\beta$ bilden sich über die Zeit kleinere, löslichere Oligomere. Diese aggregieren unter Ausprägung von β -Faltblattstrukturen zu Protofibrillen und Fibrillen weiter. Die Fibrillen des $A\beta$ sind durch eine cross- β -Faltblattstruktur gekennzeichnet. Die im Gehirn nachweisbaren Plaques bestehen u. a. aus Fibrillenbündeln des $A\beta$. Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese weist dem $A\beta$ eine zentrale Rolle in der Ausprägung der AD zu [3]. Änderungen im natürlichen Metabolismus des $A\beta$ führen zu vermehrter Aggregation und Ablagerung. Im Zuge dessen treten die nachweisbaren Schädigungen an den Neuronen auf. Während ursprünglich bei Hardy et al.

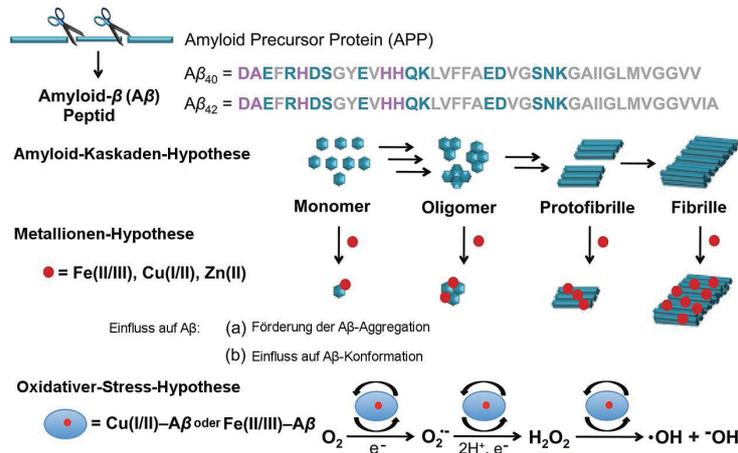


Abbildung 1.2.1: Schema der Amyloid-Kaskaden-Hypothese, Metallionen-Hypothese und Oxidativer-Stress-Hypothese. Die Aminosäuresequenzen von Aβ₄₀ und Aβ₄₂ sind gezeigt. Abbildung verändert nach [7].

[3] noch die Aβ-Ablagerung in Form der Plaques als Ursache für die Schäden an den Neuronen angesehen wurde, deuten die Untersuchungsergebnisse der letzten Jahre vermehrt auf die löslichen Oligomere des Aβ hin. Eine Definition für das toxische Oligomer fehlt bis heute. Erschwert wird dies durch die vielfältigen Wechselwirkungspartner, die das Aβ im menschlichen Organismus vorfindet. So werden verschiedene Hypothesen diskutiert, die letztendlich zur Bildung eines toxischen Aggregates führen. In den Plaques wurden hohe Konzentrationen an Metallionen nachgewiesen. Diese können durch ihre Bindung an Aβ die Aggregation beeinflussen und zur Bildung oder Stabilisierung von neurotoxischen Aggregaten führen (Metallionen-Hypothese) [4]. Eine Schädigung der Neuronen auf Basis von reaktiven Sauerstoffspezies wird ebenfalls in der Literatur diskutiert. Diese könnten z. B. durch Aβ-Kupfer(I/II)- oder Aβ-Eisen(II/III)-Komplexe gebildet werden und zu Entzündungsprozessen führen (Oxidativer-Stress-Hypothese) [5, 6]. Abbildung 1.2.1 zeigt schematisch die Amyloid-Kaskaden-Hypothese, die Metallionen-Hypothese und die Oxidativer-Stress-Hypothese. Die hier angesprochenen Wechselwirkungen des Aβ stellen nur einen Ausschnitt der Problematik der Interaktionen des Aβ dar. Im Blut oder der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) treten zudem viele unterschiedliche Proteine auf, für die eine mehr oder weniger spezifische Bindung an Aβ in der Literatur beschrieben sind, z. B. Humanes Serumalbumin (HSA) [8] oder Apolipoprotein E (ApoE) [9].

Um die physiologische Relevanz der vielen Aβ-Interaktionen einzuschätzen, ist zu allererst eine Charakterisierung der eigentlichen Aggregation des Aβ erforderlich. Dies umfasst auch Strukturinformationen der auftretenden Oligomere, um Wechselwirkungen mit z. B. Metallionen und Proteinen zu verstehen und zu beschreiben. Ein Eingriff in die Aggregation durch therapeutische Maßnahmen ist auf Basis der Kenntnisse über den Ablauf der Oligomerisierung gezielter möglich.

1.3 Analytische Ultrazentrifugation

Verschiedene Methoden wurden bereits für die Untersuchung der Aggregation des Aβ verwendet. Methoden, die eine stationäre Phase verwenden, führen zu unkontrollierter Adsorption von Aggregaten des Aβ an die Oberfläche. Dies führt zur Unterbewertung bei der Bestimmung ihrer Anteile. Im Extremfall ist eine Detektion nur von einem kleinen löslichen Anteil des Aβ möglich. Dies könnte zu falschen Schlussfolgerungen, z. B. einer Unterdrückung der Aggregation, führen. In der Analytischen Ultrazentrifugation (AUZ) wird die Konzentration der Probe in Lösung wiederholt detektiert und kann mit den Startwerten verglichen werden. Dies ermöglicht die Überprüfung von Probenverlusten. Für die Detektion stehen eine Absorptionsoptik und ein

Fluoreszenzdetektionssystem zur Verfügung. Die AUZ ist eine Absolutmethode. Es können die hydrodynamischen Eigenschaften von Partikelmischungen in Lösung charakterisiert werden. Vorteilhaft ist, dass für die Auftrennung von verschiedenen großen Partikeln in Lösung keine Interaktion mit Oberflächen benötigt wird. Die Detektion der in der Probe enthaltenen Partikel erfolgt während ihrer Auftrennung im Zentrifugalfeld. Dafür werden Sedimentationsgeschwindigkeits- und Sedimentationsgleichgewichtsläufe durchgeführt. Für Untersuchungen von selbstaggregierenden Proben, die aus Partikeln verschiedener Größe und Form bestehen, ist die Durchführung von Sedimentationsgeschwindigkeitsläufen am besten geeignet [10]. Die Anwendung der AUZ zur Untersuchung von Proteinaggregation gewinnt zunehmend an Bedeutung. In der pharmazeutischen Industrie wird sie zunehmend eingesetzt, um z. B. die Reinheit von Antikörperlösungen zu untersuchen. Die AUZ wird in dieser Arbeit als primäre Methode zur Charakterisierung der Oligomergrößenverteilung des $A\beta$ in Lösung verwendet.

1.4 Ziele der Arbeit

Wässrige Lösungen des $A\beta$ -Peptids sollen bezüglich ihres Aggregationszustandes mithilfe der Sedimentationsgeschwindigkeits-Zentrifugation charakterisiert werden. Dafür sollen die Aggregatgrößenverteilungen des synthetischen $A\beta_{42}$ in einem Phosphatpuffer bestimmt sowie der mögliche Einfluss von CSF als Lösungsmittel auf diese Verteilung betrachtet werden. Der für die Aggregationsanalysen unter physiologischen Bedingungen notwendige niedrige Konzentrationsbereich soll durch die Etablierung eines Fluoreszenzdetektionssystems für die AUZ erschlossen werden. Die Aufgabe gliedert sich in folgende Unterpunkte.

1. Bestimmung der Sedimentationseigenschaften des monomeren $A\beta_{42}$
2. Qualitative und quantitative Charakterisierung der oligomeren $A\beta_{42}$ -Spezies
3. Untersuchung des Einflusses von Metallionen und Proteinen, wie sie im CSF vorkommen, auf die Aggregation des $A\beta_{42}$
4. Untersuchung der Oligomergrößenverteilung des $A\beta_{42}$ in CSF unter Verwendung des Fluoreszenzdetektionssystems

2 Material

2.1 Puffer

10 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,4 (NaP_i)

Na₂HPO₄ 8,1 mM

NaH₂PO₄ 1,9 mM

H₂O

10 mM Sörensen-Puffer pH 7,4 (Sörensen)

Na₂HPO₄ 7,8 mM

KH₂PO₄ 2,2 mM

H₂O

Dulbeccos PBS pH 7,4 (PBS)

KH₂PO₄ 1,47 mM

Na₂HPO₄*7 H₂O 8,1 mM

NaCl 138 mM

KCl 2,7 mM

H₂O

Dulbeccos PBS pH 7,4 mit Ca²⁺ und Mg²⁺(PBSCM)

KH₂PO₄ 1,5 mM

Na₂HPO₄*7 H₂O 8,1 mM

KCl 2,7 mM

NaCl 138 mM

CaCl₂ 0,9 mM

MgCl₂*6 H₂O 0,5 mM

H₂O

Cerebrospinalflüssigkeit (CSF), gepoolt von lebenden humanen Spendern, Katalog-Nr. 991-19 (Lee Biosolutions, St. Louis, Missouri, USA)

2.2 Chemikalien

Wasser aus MerckMillipore-Wasseraufbereitungsanlage

Salzsäure, ACS Grade (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Natronlauge, ACS Grade (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Thioflavin-T (ThT) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Tris(2-carboxyethyl)phosphin-Hydrochlorid (TCEP) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

9-(2,2-Dicyanovinyl)julolidin (DCVJ) (VWR, Darmstadt, Deutschland)

Natriumhydrogencarbonat, ACS Grade (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Dinatriumhydrogencarbonat, ACS Grade (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Kupferchlorid, ACS Grade (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Zinkchlorid, ACS Grade (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Magnesiumchlorid, ACS Grade (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Calciumchlorid, ACS Grade (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFIP), > 98 % (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Mica Disks 10 mm (Ted Pella, Inc., Redding, California, USA)
Fluoresceinisothiocyanat (FITC) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Dismozon plus (Bode Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland)
Guanidiniumhydrochlorid, > 99,5 % (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

2.3 Geräte

Jasco CD-Spektrophotometer J-815 (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland)
Jasco Fluorimeter FP-6500 (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland)
Jasco Spektralphotometer V-650 (Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland)
Beckman XL-A Analytische Ultrazentrifuge (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland)
Rotor für Analytische Ultrazentrifuge AnTi50 (8-Loch) (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland)
Rotor für Analytische Ultrazentrifuge AnTi60 (4-Loch) (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland)
Messzellen für Analytische Ultrazentrifuge Titan mit 3-mm- und 12-mm-Mittelstücken (Nanolitics GmbH, Potsdam, Deutschland)
Messzellen für Analytische Ultrazentrifuge Aluminium mit 12-mm-Mittelstücken (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland)
Fluoreszenzdetektionssystem für Analytische Ultrazentrifuge (Aviv Biomedical, NJ, USA)
JPK NanoWizard II AFM (JPK Instruments AG, Berlin, Deutschland)
Cantilever OMCL-AC 160TS (Olympus Europa, Hamburg Deutschland)
SpeedVac (AVC 2-18) mit LT-105-Kühlfalle (Christ, Osterode, Deutschland)
Tekan Infinite M 1000-Plattenlesegerät (Tekan Group, Männedorf, Schweiz)
MerckMillipore-Wasseraufbereitungsanlage mit Elix Advantage und Biopack (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Nunc 96-Well-Platte, transparent (VWR, Darmstadt, Deutschland)
Hamiltonspritzen (Hamilton Messtechnik, Höchst, Deutschland)
Eppendorf-Pipetten (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
Eppendorf-Spitzen (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
Eppendorf-Gefäße, Protein LoBind (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland)

2.4 Proteine

Green-Fluorescent-Protein, mit His-Tag (GFP) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Green-Fluorescent-Protein-1433 (GFP-1433) (Chemical Genomics Centre of the Max Planck Society, Dortmund, Deutschland)
Humanes Serumalbumin, fettsäurefrei und globulinfrei (HSA) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Bovines Serumalbumin > 98 % (BSA) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Amyloid β 42 (A β 42) (Bachem, Bubendorf, Schweiz)

FITC- β -Ala-Amyloid β 42 (FITC-A β 42) (Bachem, Bubendorf, Schweiz)
Amyloid β 40 (A β 40) (Bachem, Bubendorf, Schweiz)
(Cys⁰)-Amyloid β 40 (Cys-A β 40) (Bachem, Bubendorf, Schweiz)
OregonGreen488-Amyloid β 42 (OG488-A β 42) (Institut für Biochemie Charité-Universitätsmedizin, Berlin, Deutschland)
AlexaFluor488-Maleimid-(Cys⁰)-Amyloid β 42 (Alexa488-A β 42) (Bachem, Bubendorf, Schweiz)
Apolipoprotein E3, rekombinant aus *E.coli* (ApoE3) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

2.5 Software

UltraScan III Version 3.2 und UltraScan II Version 9.9 (<http://www.ultrascan.uthscsa.edu/>)
Sedfit Version 14.4d (<http://www.analyticalultracentrifugation.com/default.htm>)
Gussi Version 10.8e (<http://biophysics.swmed.edu/MBR/software.html>)
Sednterp Version 20111201BETA (http://bitcwiki.sr.unh.edu/index.php/Main_Page)
MatLab R2011b (MathWorks, Inc.)
JPKSPM Data Processing (JPK Instruments AG, Berlin, Deutschland)

3 Methoden

3.1 Probenvorbereitung

In dieser Arbeit wurde ausschließlich synthetisches A β 42 verwendet. Dieses wurde in Festphasensynthese hergestellt. Die N-terminale Fluoreszenzmarkierung erfolgte entweder durch direkt Markierung des noch an der Festphase befindlichen Materials oder durch Verwendung zuvor markierter Aminosäuren. Alle A β 42-Konstrukte wurden als Lyophilisat in Form des Trifluoroacetatsalzes geliefert. Das Lyophilisat wurde in 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFIP) in einer Konzentration von 1,4 mg/mL gelöst und bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Aliquotierung in je nach Versuch benötigten Mengen zwischen 30 und 100 μ g. Alle Pipettierschritte erfolgten bei 4 °C und auf Eis unter Verwendung vorgekühlter Eppendorf-Spitzen bzw. Hamiltonspritzen. Das HFIP wurde im Anschluss mittels Lyophilisation in der SpeedVac entfernt. Der resultierende Film aus A β 42 wurde bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.2 Analytische Ultrazentrifugation

Die Analytische Ultrazentrifugation (AUZ) ist eine Zentrifugationsmethode und dient zur Bestimmung biophysikalischer Parameter von Partikeln in Lösung. Es handelt sich um eine Absolutmethode. Aufgrund der Zentrifugation erfolgt eine Auftrennung der Partikel nach ihrem Sedimentationsverhalten. Im Gegensatz zu Trennmethoden wie der Größenausschlusschromatographie wird keine feste Phase benötigt. Es handelt sich um ein Einphasensystem. Ein Vorteil der AUZ ist, dass sich schnell sedimentierende Partikel immer in Gegenwart von langsam sedimentierenden Partikeln bewegen. Ein Zerfall von Oligomeren, wie er bei Abtrennung der Monomere induziert würde, findet daher nicht statt. Die Detektion der Sedimentation der Partikel findet während der Zentrifugation statt. Eine dauerhafte Fraktionierung ist mit dieser Methode allerdings nicht möglich, da es wieder zur Durchmischung der Lösung kommt, wenn die Zentrifugation aufhört. Die AUZ ist geeignet für Analysen von Proteinen in einem Größenbereich von wenigen Nanometern bis zu einigen Mikrometern. Außerdem können Proteine und Proteingemische in einem breiten Konzentrationsbereich und unter verschiedenen Lösungsmittelbedingungen untersucht werden. Zur Untersuchung von löslichen Proteinaggregaten ist die AUZ bestens geeignet [11].

3.2.1 Theoretische Grundlagen

Die Probenlösung befindet sich in einer Messzelle mit sektorförmigen Kammern. Die Messzellen werden in der Analytischen Ultrazentrifuge (UZ) auf bis zu 60.000 rpm (260.000 g bei einer Entfernung von 6,5 cm von der Rotorachse) beschleunigt. Auf die Partikel in der Lösung wirken verschiedene Kräfte (siehe Abbildung 3.2.1). Die Zentrifugalkraft (F_G) bewegt den Partikel von der Rotorachse weg, Richtung Messzellenboden. Diese ist proportional zur Masse des Partikels (M), dessen Entfernung von der Rotorachse (r) sowie der Winkelgeschwindigkeit des Rotors (ω). Entgegen der Zentrifugalkraft wirkt die Auftriebskraft (F_b). Diese wird durch die Dichte des Partikels (das partiell spezifische Volumen, \bar{v}) und die Dichte des verdrängten Lösungsmittels (ρ) bestimmt. Aufgrund der Bewegung des Partikels durch das Lösungsmittel tritt Reibung zwischen

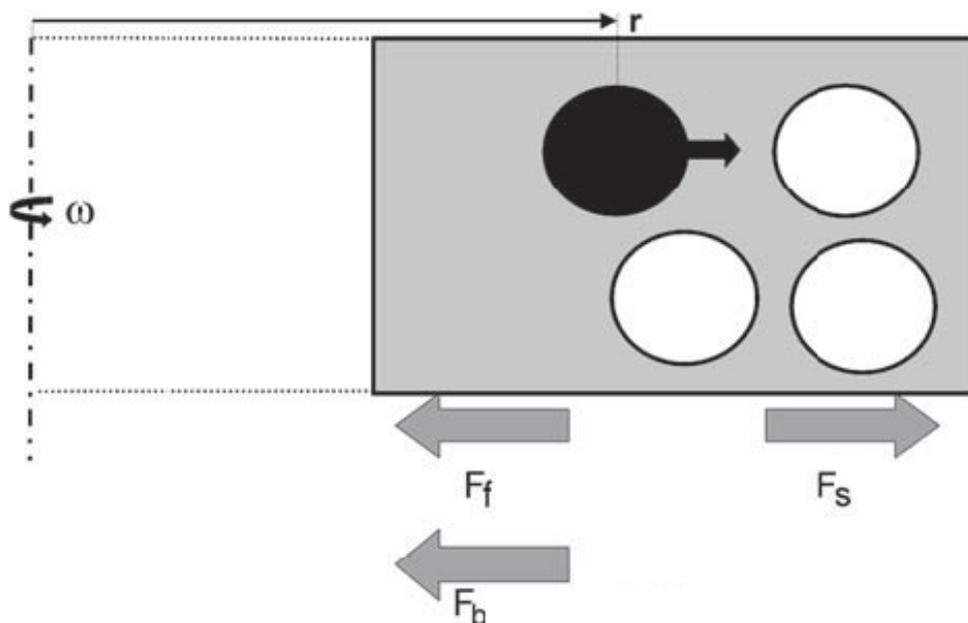


Abbildung 3.2.1: Schematisches Diagramm der auf einen Partikel im Gravitationsfeld wirkenden Kräfte. Abbildung verändert nach [12]

dem Partikel und den Lösungsmittelmolekülen auf. Die Reibungskraft (F_f) wirkt der Zentrifugalkraft entgegen. Diese ist abhängig von der Form (f) und der Geschwindigkeit (v) des Partikels. Sind alle drei Kräfte im Gleichgewicht, bewegt sich der Partikel mit konstanter Geschwindigkeit durch das Lösungsmittel. Die resultierende Kraft aus der Summe aller drei Kräfte bestimmt die Bewegungsrichtung des Partikels. Eine positive Kraft führt zur Sedimentation, eine negative zur Flotation. Der Zusammenhang wird durch die Svedberg-Gleichung [13] beschrieben. Die Beweglichkeit des Partikels im Zentrifugalfeld wird als s -Wert oder Sedimentationskoeffizient definiert. Die Einheit wird in Svedberg (S) angegeben und entspricht 10^{-13} Sekunden.

$$s = \frac{v}{\omega^2 r} = \frac{M(1 - \bar{v}\rho)}{f}$$

Sedimentationsgeschwindigkeitslauf (SV-Lauf)

Zur Bestimmung von s -Werten und Diffusionskonstanten werden SV-Läufe durchgeführt. Die in der Probenlösung enthaltenen Partikel sedimentieren über die Zeit in Richtung Messzellenboden. D. h., es erfolgt eine zeitliche Änderung der Konzentration an Partikeln über den Radius. Dieser Konzentrationsverlauf kann durch die Optik in der UZ detektiert werden und wird als Sedimentationsgrenzschicht bezeichnet. Da die Messzelle nicht vollständig mit Probenlösung gefüllt ist, befindet sich ein Luftraum über der Lösung. Der Übergang zwischen Luft und Lösung wird als Meniskus bezeichnet und stellt den radialen Startpunkt der Sedimentation dar. Der Aufbau eines Konzentrationsgradienten innerhalb der Messzelle führt zur Diffusion von Partikeln in Richtung des Konzentrationsgefälles. Die Sedimentationsgrenzschicht ist daher diffusionsverbreitert und hat eine sigmoide Form. Die in zeitlichem Abstand aufgenommenen Sedimentationsgrenzschichten werden zu einem Sedimentationsprofil zusammengefasst (siehe Abbildung 3.2.2). Mit zunehmender Zeit wandert die Sedimentationsgrenzschicht Richtung Boden der Messzelle weg von der Rotorachse (radiale Position bei null cm) und damit zu größeren Radien. Je später der Zeitpunkt, desto deutlicher ist die typische sigmoide Form zu erkennen.

Das Sedimentationsprofil kann hinsichtlich s -Wert und Diffusionskoeffizient ausgewertet werden. Der Abstand der Sedimentationsgrenzschichten entspricht der Wanderungsgeschwindigkeit der

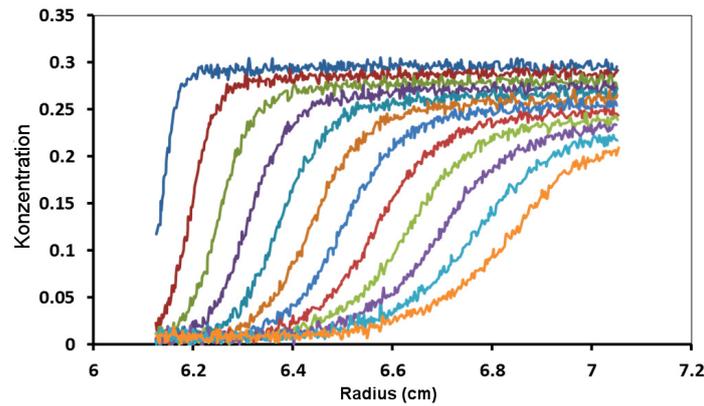


Abbildung 3.2.2: Exemplarisches Sedimentationsprofil eines SV-Laufes. Dargestellt ist die zeitliche Abfolge von Sedimentationsgrenzschichten (von links nach rechts). Jede Sedimentationsgrenzschicht ist die Detektion der Konzentration an Partikeln in der Messzelle über den Radius. Die radiale Position null cm entspricht der Rotorachse.

Partikel in der Lösung (s -Wert). Die Verbreiterung der Sedimentationsgrenzschichten lässt Rückschlüsse auf den Diffusionskoeffizienten (D) der Partikel zu. Auf Basis dieser Parameter lassen sich die Form und Masse der Partikel berechnen. Eine mathematische Lösung für die Auswertung des Sedimentationsprofils bietet die Lamm-Gleichung [14]. Diese beschreibt die Konzentrationsänderung der sedimentierenden Partikel über die Zeit in Abhängigkeit von der Rotorgeschwindigkeit in einer sektorförmigen Messzelle.

$$\frac{\delta c}{\delta t} = D \left[\frac{\delta^2 c}{\delta r^2} + \frac{1}{r} \frac{\delta c}{\delta r} \right] - s\omega^2 \left[r \frac{\delta c}{\delta r} + 2c \right]$$

Durch das Fitten von experimentellen Daten auf Basis der Gleichung können s -Wert (s_{app}) und Diffusionskoeffizient unter den experimentellen Bedingungen ($\bar{v}_{\text{app}}, \rho_{\text{app}}, \eta_{\text{app}}$) ermittelt werden. Diese werden als apparente Werte bezeichnet und anschließend zur besseren Vergleichbarkeit auf die Dichte ($\rho_{20,w}$) und Viskosität ($\eta_{20,w}$) von Wasser als Lösungsmittel bei 20 °C korrigiert.

$$\frac{s_{20,w}}{s_{\text{app}}} = \frac{(1 - \bar{v}_{20,w}\rho_{20,w})\eta_{\text{app}}}{(1 - \bar{v}_{\text{app}}\rho_{\text{app}})\eta_{20,w}}$$

Die im SV-Lauf ermittelten $s_{20,w}$ -Werte gelten für Lösungen in unendlicher Verdünnung. Diese werden in der Literatur auch als $s_{20,w}^0$ angegeben. Sind in der Lösung Partikel verschiedener s -Werte, kann eine Summe von Lamm-Gleichungen gefittet werden. Dies ermöglicht die Analyse von Gemischen.

Sedimentationsgleichgewichtslauf (EQ-Lauf)

Zur Bestimmung von Molekulargewichten von Partikeln können EQ-Läufe durchgeführt werden. Im Gegensatz zum SV-Lauf wird das Konzentrationsprofil in der Messzelle erst nach Einstellung des Gleichgewichts zwischen Sedimentation und Rückdiffusion gemessen. Der Nettotransport von Partikeln beträgt in diesem Fall null. Es kommt zur Ausbildung eines Gleichgewichtsprofils. Dieses ist nur noch abhängig von der Masse des Partikels und unbeeinflusst durch Sedimentationskoeffizient, Diffusionskoeffizient und gebundene Lösungsmittelpartikel (Hydrathülle). Dieses Profil entspricht einer e-Funktion. Für Mischungen von Partikeln verschiedener Molekulargewichte ist das resultierende Profil eine Summe einzelner e-Funktionen. Für Mischungen aus bis zu drei Komponenten lässt sich dies mathematisch lösen. Die gemessene radiale Konzentrationsänderung ($c(r)$) ist abhängig vom Molekulargewicht (M) des Partikels, dessen \bar{v} , der Winkelgeschwindigkeit (ω), der Dichte des Lösungsmittels (ρ), der Avogadro-Konstanten (R), der Rotortemperatur (T) und der Position des Meniskus (r_0).

$$\frac{c(r)}{c(r_0)} = \exp \frac{M(1 - \bar{v}\rho) * \omega^2 * (r_0^2)}{2 * R * T}$$

3.2.2 Die Messzelle

Für die AUZ werden spezielle Messzellen verwendet. Abbildung 3.2.3 zeigt den schematischen Aufbau einer solchen Zelle. Die verwendeten Fenster bestanden aus Quarz- bzw. Saphirglas. Quarzglasfenster weisen eine etwas höhere Transparenz im UV-Bereich auf und wurden daher bevorzugt für Absorptionsmessungen unterhalb von 280 nm eingesetzt. Das zentrale Kernstück der Messzelle ist das Mittelstück. Alle AUZ-Messungen in dieser Arbeit wurden mit Mittelstücken mit zwei Kammern durchgeführt. Die Kammern sind sektorförmig, um die Sedimentation der Partikel entlang der Rotorradien zu gewährleisten. Die Verwendung der Absorptionsoptik erfordert einen Referenzsektor ohne absorbierende Partikel. Der linke Sektor (schmale Seite der Sektoren in Richtung Rotorachse) wird daher mit dem Lösungsmittel gefüllt. Bei Verwendung des Fluoreszenzdetektionssystems (FDS) können beide Sektoren für Probenlösung verwendet werden. In dieser Arbeit wurden Mittelstücke mit den Schichtdicken 3 mm und 12 mm verwendet (siehe hierzu 6.2). Es wurden Mittelstücke aus Titan (3 mm und 12 mm) und Aluminium (12 mm) verwendet. Die Wahl des Materials richtete sich nach der Stabilität gegenüber der Probenlösung bzw. der im Anschluss benötigten Dekontaminierungsmethoden.

3.2.3 Die Optiken

Für diese Arbeit wurden zwei verschiedene Optiken in der UZ verwendet. Die Absorptionsoptik stellt die „klassische“ Detektionseinheit dar. Sie besteht aus einer Xenon-Blitzlichtlampe, dem Monochromator, einem beweglichen Spalt mit einer Breite von 13 μm und dem Photomultiplier. Abbildung 3.2.4 zeigt schematisch den Strahlengang der Absorptionsoptik. Der Monochromator ermöglicht eine Auswahl der Detektionswellenlänge zwischen 190 und 800 nm. Der bewegliche Spalt wird von einem Schrittmotor entlang des Rotorradius mit einer maximal möglichen Auflösung von 10 μm bewegt. Dies ermöglicht eine Detektion der Lichtintensität über den Radius mittels des Photomultipliers. Bei den verwendeten Messzellen kann die Datenaufnahme in Form von Intensitätswerten für jeden der beiden Sektoren separat oder als verrechnetes Absorptionssignal aus den Intensitäten des Probensektors und des Referenzsektors. Ist der radiale Scan einer Messzelle beendet, wird die nächste Zelle vermessen. Um den nächsten Scan der ursprünglichen Messzelle durchzuführen, müssen alle anderen Messzellen gescannt worden sein. Je nach Probenanzahl pro Messlauf kann der zeitliche Abstand zweier Scans zwischen 1,5 und 10,5 min liegen. Da die Messungen in der UZ im Hochvakuum erfolgen, ist das Signal-/Rausch-Verhältnis nur von der Lampenintensität bei der gewählten Wellenlänge sowie der Absorption des Lösungsmittels

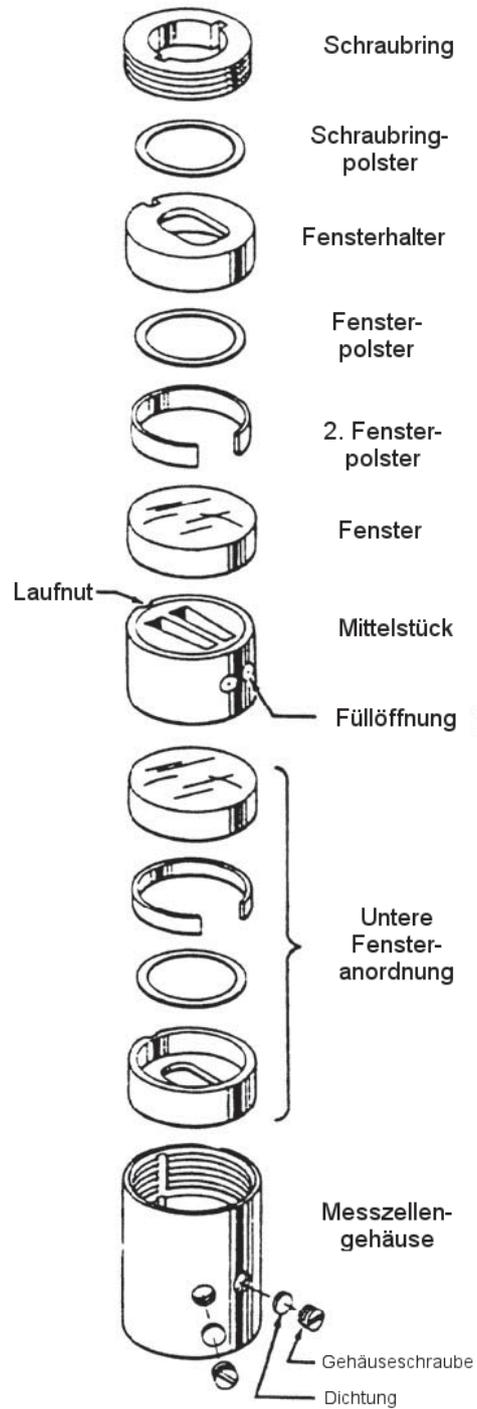


Abbildung 3.2.3: Schematischer Aufbau eine Messzelle. Abbildung verändert nach [12]

und dem Extinktionskoeffizienten der Partikel abhängig. Der lineare Messbereich der Optik liegt zwischen 0,1 und 1,2 OD. Für alle SV-Läufe mit der Absorptionsoptik wurden die Scans mit

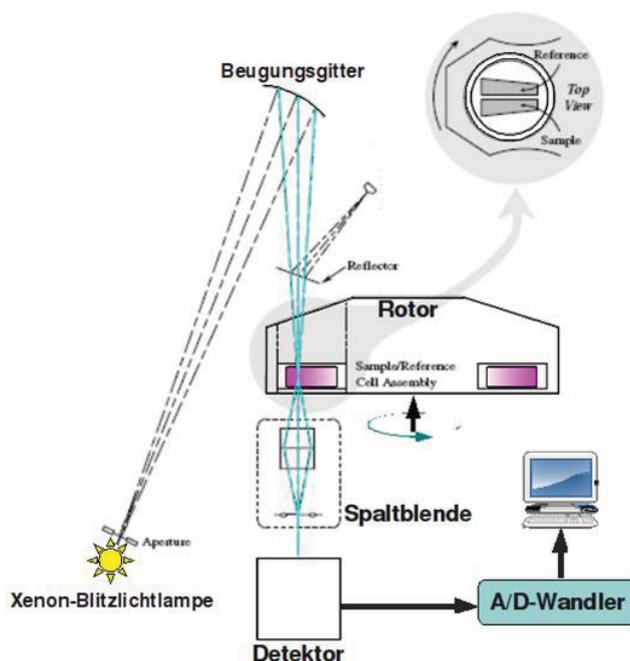


Abbildung 3.2.4: Schema des Strahlenganges der Absorptionsoptik von Beckman Coulter. Abbildung verändert nach [15]

einer radialen Auflösung von 30 μm und in einem zeitlichen Abstand von ca. 5 min aufgenommen. Soweit nicht explizit angegeben, erfolgten die Messungen bei einer Rotortemperatur von 20 $^{\circ}\text{C}$. In allen Messungen muss eine Equilibrierung der Rotortemperatur von ca. 15 min berücksichtigt werden. Dies stellte sicher, dass sowohl Rotor als auch die Probe in den Messzellen die gewünschte Temperatur erreichten. Um diese Zeit möglichst gering zu halten, wurden ggf. die Rotorkammer und der Rotor vor der Messung auf die gewünschte Messtemperatur eingestellt. Da die überwiegende Zahl der Messungen bei 20 $^{\circ}\text{C}$ erfolgte, wurde die Raumtemperatur am Standort der Zentrifuge auf ca. 20 $^{\circ}\text{C}$ eingestellt.

Das Fluoreszenzdetektionssystem (FDS) von Aviv bietet die Möglichkeit, fluoreszenzmarkierte Makromoleküle zu detektieren. Dies ermöglicht die Messungen von Makromolekülen im nanomolaren Konzentrationsbereich sowie Interaktionsstudien durch selektive Fluoreszenzmarkierung der Interaktionspartner. Ein weiterer Anwendungsbereich ist die Detektion von fluoreszenzmarkierten Partikeln in komplexen Mischungen, z. B. Rohextrakten, die weder mit Absorptions- noch Interferenzoptik vermessen werden können. Für die Anregung steht eine Laserdiode zur Verfügung, die Licht von 488 nm kontinuierlich emittiert. Das Licht wird mithilfe eines dichroitischen Spiegels und einer Fokusslinse in die Messzelle kurz unterhalb des oberen Fensters fokussiert. Von der Probe emittiertes Licht kann den Spiegel passieren und trifft nach Passage eines Cut-off-Filters von 505 nm auf einen Photomultiplier. Abbildung 3.2.5 zeigt schematisch den Strahlengang im FDS. Zur Aufnahme von radial aufgelösten Fluoreszenzdaten wird das gesamte FDS über den Rotor bewegt. Die radiale Auflösung beträgt 20 μm . Das FDS nimmt an jeder radialen Position die vollständige 360 $^{\circ}$ -Ansicht des Rotors auf (siehe Abbildung 3.2.6). Im Anschluss werden nur die Fluoreszenzsignale abgespeichert, an deren Position sich eine Messzelle befindet. Pro radiale Position werden fünf Rotorumdrehungen gemittelt und ergeben das abgespeicherte Fluoreszenzsignal. Bei einer Bewegung des FDS in Richtung Rotorachse kann für alle Messzellen ein Scan aufgenommen werden. Die Scanzeit ist folglich unabhängig von der Zahl der zu vermessenden Proben. Scans einer Messzelle können im Abstand von ca. 1,5 min aufgenommen werden.

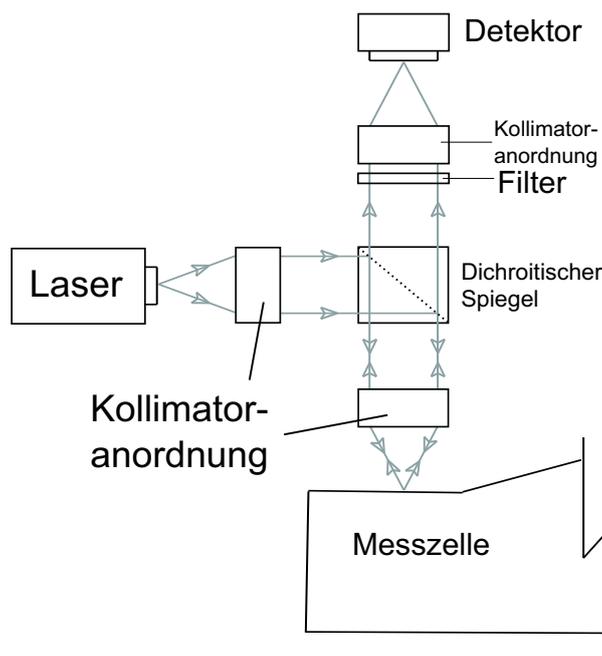


Abbildung 3.2.5: Schema des Strahlenganges im FDS. Abbildung verändert nach [16]

Für jede Messzelle wird ein individuell angepasster Verstärkungsfaktor gewählt. Weitere Punkte bezüglich der Bedienung des FDS sind unter 6.1 zu finden. Im Gegensatz zur Absorptionsoptik muss mehr Zeit für die Einstellungen vor dem Start der Messung eingeplant werden. Vom Platzieren der Proben in der UZ bis zum Start der Messung müssen beim FDS ca. 30 bis 40 Minuten eingeplant werden. Alle Messungen mit dem FDS wurden, soweit nicht explizit ausgewiesen, bei 20 °C durchgeführt.

3.3 Datenauswertung von AUZ-Messungen

Die Auswertung von SV- und EQ-Läufen erfordert die Verwendung verschiedener Softwarepakete. Die Basis der Auswertung sind in jedem Fall die Kenntnisse über die vorliegenden Lösungsmittelebedingungen sowie des \bar{v} des Proteins unter den Messbedingungen.

3.3.1 Sednterp

Berechnung der Dichten und Viskositäten von Puffern

Das Softwarepaket Sednterp [17] ermöglicht die Kalkulation von Dichten und Viskositäten wässriger Lösungsmittel. Die Berechnung beruht auf tabellierten Werten für Dichten und Viskositäten der Pufferkomponenten. Temperaturkorrekturen können ebenfalls mit Sednterp erfolgen. Für die in dieser Arbeit verwendeten Puffer (siehe 2.1) wurden folgende Dichten und Viskositäten für 20 °C errechnet:

PBS: ρ_{20} : 1,00537 g/cm³, η_{20} : 1,011 cP

PBSCM: ρ_{20} : 1,0055 g/cm³, η_{20} : 1,0078 cP

NaP_i: ρ_{20} : 0,9996 g/cm³, η_{20} : 1,00086 cP

Sörensen: ρ_{20} : 0,9995 g/cm³, η_{20} : 1,0011 cP

Berechnung von \bar{v}

Die Berechnung des \bar{v} der verwendeten Proteine kann ebenfalls mit Sednterp durchgeführt werden. Diese beruht auf der Methode nach Cohn und Edsall [18]. Ausgehend von den \bar{v} aller enthal-

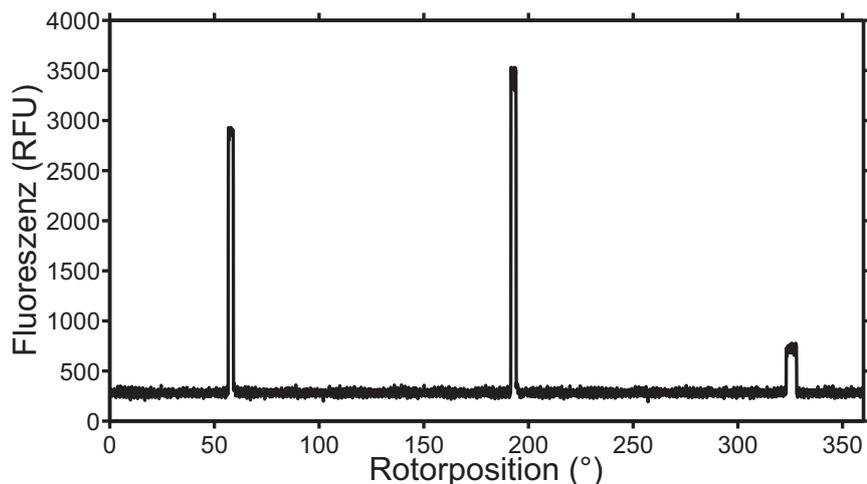


Abbildung 3.2.6: 360°-Ansicht des Fluoreszenzsignals mittels FDS. An der Rotorposition 6,5 cm wurde das Fluoreszenzsignal über eine vollständige Umdrehung des AnTi50-Rotors aufgenommen. Die Signalanstiege zeigen die Position von 3 Messzellen an. Das Basissignal entspricht der Dunkelzählrate des Photomultipliers bei der verwendeten Verstärkerstufe.

tenen Aminosäuren in einem Protein kann das \bar{v} des Proteins kalkuliert werden. Die benötigten Molekulargewichte und \bar{v} der Aminosäuren sind in der Programmdatenbank hinterlegt.

Für die Bestimmung des \bar{v} der fluoreszenzfarbstoffmarkierten Proteine müssen zusätzlich zur Aminosäuresequenz der Fluoreszenzfarbstoff und der Linker mit einkalkuliert werden. Dies ist in Sednterp nicht möglich. Durschlag [19] liefert ein Tabellenwerk für die Kalkulation des \bar{v} auf Basis der Volumina der im Gesamtkonstrukt enthaltenen Atome. Dies erfolgt in mehreren Schritten. Zuerst wird das partiell molare Volumen (\bar{v}_c) berechnet. Dieses ergibt sich aus den Volumeninkrementen der Atome und Atomgruppen (v_i) unter Berücksichtigung des Kovolumens (v_{CV}), möglicher Ringbildungen innerhalb der Moleküle (v_{RF}) sowie elektrostatischer Aspekte (v_{ES}).

$$\bar{v}_c = \Sigma v_i + v_{CV} - \Sigma v_{RF} - \Sigma v_{ES}$$

Über die molare Masse (M) des Gesamtkonstruktes erfolgt die Konversion in das \bar{v} .

$$\bar{v} = \frac{\bar{v}_c}{M}$$

Das Tabellenwerk liefert alle Angaben für 25 °C. Die nötige Korrektur des \bar{v} unter bekannten Temperaturen (T_{geg}) für neue Temperaturen (T_{gew}) kann über folgende Gleichung erfolgen.

$$\bar{v}_{T_{gew}} = \bar{v}_{T_{geg}} + 4,5 * 10^{-4} \frac{cm^3}{g * K} (T_{gew} - T_{geg})$$

Die berechneten \bar{v} sind eine ausgezeichnete Näherung zu gemessenen Werten und zeigen typischerweise eine Abweichung von weniger als 3 %. Tabelle 3.1 zeigt die berechneten \bar{v} bei 20 °C für alle verwendeten Proteine.

3.3.2 Sedfit

Das Softwarepaket Sedfit wurde zur Analyse von SV-Läufen verwendet [20]. Die Daten wurden auf Basis des c(s)-Modells ausgewertet, eine Variante der Lösung der Lamm-Gleichung. Dieses Modell setzt eine Mischung von nicht interagierenden, ideal sedimentierenden Molekülen voraus.

Tabelle 3.1: Berechnete \bar{v} für verwendete Proteine bei 20 °C.

Protein	\bar{v} (cm ³ /g)
BSA	0,7320
HSA	0,7328
A β 42	0,7377
OG488-A β 42	0,7269
FITC-A β 42	0,7350
Alexa488-A β 42	0,7127
A β 40	0,7341
Cys-A β 40	0,7316
GFP	0,7291
GFP-1433	0,7288

Es kann für die Auswertung von Partikelmischungen verwendet werden. Ein Zerfall oder eine Aggregation von Partikeln muss während des Zeitraums der Sedimentation ausgeschlossen sein. Der Fit erfolgte mittels eines Simplex-Algorithmus. Der anschließenden Regularisierung lag die Maximum-Entropie-Methode zugrunde. Die Auswertung setzt folgende Parameter voraus: den zu betrachtende s -Wertbereich und dessen Auflösung, die Lösungsmittelbedingungen (ρ, η), das \bar{v} des Proteins und das Konfidenzlevel (fix bei 0,95). Folgende Parameter wurden gefittet: f/f_0 , Baseline, zeitunabhängiges Rauschen (Ti-Noise), radialunabhängiges Rauschen (Ri-Noise) und Meniskus- und Bodenposition. Die Auswertung lieferte eine $c(s)$ -Verteilung. Diese gibt die Anteile an s -Werten im zugrunde gelegten s -Wertbereich an. Der s -Wert eines Partikels in der Probe ergibt sich als theoretische Gauß-Kurve unter der $c(s)$ -Verteilung. Vereinfacht kann jedes Maximum der $c(s)$ -Verteilung als mathematische Lösung für einen Partikel in der Probe angesehen werden. Für die Auswertung von Fluoreszenzdaten sind zusätzliche Parameter in der Software implementiert, die gefittet werden können. Um die Anzahl an Freiheitsgraden möglichst gering zu halten, wurde bei allen Fits versucht, möglichst wenige dieser Parameter zu fitten (siehe 6). Für die Auswertung der Messungen zur Bestimmung der Dichte und Viskosität des CSF wurde das Modell der nicht interagierenden diskreten Spezies verwendet. Zu fittende Parameter waren der Anteil der jeweiligen Spezies, dessen Diffusionskoeffizient und s -Wert sowie Ti-Noise, Ri-Noise und die Baseline. Dieses Modell setzt keine Kenntnisse über die Lösungsmittleigenschaften voraus (siehe 7.2).

3.3.3 UltraScan

Das Softwarepaket UltraScan wurde für die Auswertung von SV- und EQ-Läufen verwendet [21, 22]. Dieses Softwarepaket basiert auf einem Datenbanksystem. In diesem werden alle Informationen bezüglich der auszuwertenden AUZ-Läufe hinterlegt. Die Daten werden nicht lokal gespeichert und ausgewertet, sondern auf einem Supercomputer in den USA. Das Laden der Daten in bzw. Abholen der Daten von der Datenbank vor jedem Arbeitsschritt benötigte deutlich mehr Zeit als eine Auswertung mit Sedfit. Daher wurden nicht alle in der Arbeit gewonnen Datensätze aus SV-Läufen mit UltraScan ausgewertet. Dieses Softwarepaket wurde gezielt für die Fragestellung nach Formparametern (f/f_0) von detektierten A β 42-Spezies eingesetzt. Die Auswertung beruht auf der Lösung der Lamm-Gleichung auf Basis der experimentellen Daten. Die Auswertung setzt Kenntnisse über ρ und η des Lösungsmittels sowie \bar{v} des Proteins voraus. Im Gegensatz zu Sedfit wird außer dem s -Wert auch f/f_0 gefittet. Die Fitroutine umfasste mehrere Schritte. Zuerst wurden die Daten mit einem zweidimensionalen Fit, dem sog. 2DSA, gefittet. Die Zweidimensionalität ergibt sich aus der Auftragung des zu fittenden s -Wertbereiches gegen den f/f_0 -Bereich. In diesem Schritt wurden ebenfalls Ti-Noise, Ri-Noise, Baseline und Meniskus gefittet. Auf Basis der Lösungen des 2DSA wurden die zu fittenden Bereiche im s -Wert

gegen f/f_0 -Gitter eingengt. Als Zweites wurden die Daten innerhalb dieser Parameterbereiche mit einem genetischen Algorithmus (GA) gefittet. Diese Vorgehensweise liefert die mathematisch sinnvollsten Lösungen der Lamm-Gleichung. Zur statistischen Absicherung wurde als Drittes eine Monte-Carlo-Analyse mit 50 Iterationen der Ergebnisse des GA durchgeführt.

Sedfit und UltraScan unterscheiden sich hinsichtlich der verwendeten Algorithmen. Das Resultat ist in beiden Fällen eine Lösung der Lamm-Gleichung auf Basis der Messdaten unter Berücksichtigung des Prinzips von Occams Rasiermesser. D. h., die berechnete s -Wertverteilung liefert die minimal mögliche Anzahl an Spezies, die nötig sind, um eine möglichst geringe Abweichung zwischen den Messdatenkurven und den aus dem Fit resultierenden Kurven zu erhalten. In beiden Fällen wird die Güte des Fits über die Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung (RMSD) angegeben. RMSD-Werte unterhalb von 3 % des maximalen Detektionssignals wurden akzeptiert.

Die Auswertung der EQ-Läufe basiert auf der Lösung der Messdaten unter der Annahme von e -Funktionen (siehe 3.2.1). Ein Teilprogramm von UltraScan ermöglicht die lokale Auswertung. Die Messdaten mehrerer Rotorgeschwindigkeiten wurden global gefittet. Der Fit wurde durch Verwendung verschiedener Fitalgorithmen (Levenberg-Marquardt, Modified Gauss-Newton) optimiert. Für diese Arbeit wurden die Messdaten auf Basis eines Ein-Komponenten-Modells ausgewertet. Im Zuge der Auswertung wird ebenfalls die Baseline gefittet. Auf Basis der Lösung des Fits wurde im Anschluss eine Monte-Carlo(MC)-Analyse mit 5.000 Iterationen durchgeführt.

3.4 Zirkulardichroismus

Zirkulardichroismus (CD) beschreibt die Differenz der Absorption von rechts- und linkszirkular polarisiertem Licht. Dieser Effekt kann bei optisch aktiven Substanzen gemessen werden und ist abhängig von der eingestrahlten Wellenlänge. Der CD-Effekt lässt sich über die Elliptizität (Θ) beschreiben. Diese gibt den Phasenwinkel aus der Addition der Schwingungsvektoren von rechts und links polarisiertem Licht nach Durchtritt durch die Probe an. Bei Proteinen kann dies zur Bestimmung der Sekundärstruktur herangezogen werden. Zwischen 180 und 240 nm zeigen α -Helix-, β -Faltblatt- und Random-Coil-Strukturen typische Minima, Maxima und Nulldurchgänge in ihren jeweiligen CD-Spektren. Das α -Helixspektrum weist ein Maximum bei 191 nm und zwei Minima bei 208 und 222 nm sowie einen Nulldurchgang bei 202 nm auf. Das β -Faltblattspektrum ist durch ein Maximum bei 195 nm und ein Minimum bei 217 nm sowie einen Nulldurchgang bei 208 nm gekennzeichnet. Das CD-Spektrum von Random-Coil-Strukturen zeigt ein Minimum bei 198 nm und einen Nulldurchgang bei 211 nm. Abbildung 3.4.1 veranschaulicht dies am Beispiel von Poly-L-lysin [23]. In Proteinen mit verschiedenen Sekundärstrukturanteilen ergibt

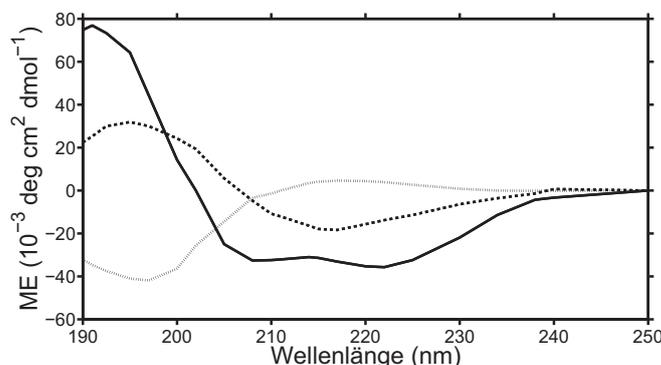


Abbildung 3.4.1: CD-Spektrum von Poly-L-lysin in den drei Konformationen α -Helix (-), β -Faltblatt (- -) und Random Coil (·). Abbildung nach [23]

sich das Messsignal als Summe der einzelnen Sekundärstrukturen. Zur Vergleichbarkeit wird die gemessene Elliptizität auf die Schichtdicke der verwendeten Küvette (d) und die eingesetzte Proteinkonzentration (c) korrigiert. Dies ergibt die molare Elliptizität (ME) in Abhängigkeit von der Wellenlänge. Zusätzlich kann diese auf die Aminosäurezahl (N) des eingesetzten Proteins bezogen werden und wird als molare Elliptizität pro Aminosäurerest (MRE) angegeben.

$$MRE = \frac{\theta}{10 * c * d * (N - 1)}$$

Während absolute Bestimmungen von Sekundärstrukturanteilen oft problematisch sind, lassen sich relative Änderungen in der Sekundärstruktur mittels CD-Spektroskopie sehr gut verfolgen. Die Untersuchung von aggregierenden Proben ist immer schwierig, da die Konzentration an Protein in der Lösung schwer zu bestimmen ist. Mit zunehmender Aggregatgröße ist mit Absinken von Protein aus dem Strahlengang zu rechnen. Außerdem führen große Aggregate in der CD-Spektroskopie zu zunehmender Streuung. Für die Berechnung der MRE von inkubierten A β 42-Proben wurde angenommen, dass sich die Konzentration zu keinem Zeitpunkt von der Ausgangskonzentration unterscheidet. Außer der Elliptizität liefert die CD-Messung die Spannung am Detektor. Diese lässt Rückschlüsse auf die Transparenz der zu messenden Lösungen zu. Treten Spannungen über 600 V auf, ist das Signal-/Rausch-Verhältnis des CD-Signals so gering, dass keine zuverlässigen Aussagen mehr über die Elliptizität getroffen werden können. Daher wurden in dieser Arbeit nur Elliptizitäten herangezogen, die bei Detektorspannungen unter 600 V aufgenommen wurden. Die Messungen wurden mit einem Jasco J-815 CD-Spektralphotometer in einer 1-mm-Küvette durchgeführt. Die Spektren wurden zwischen 180 und 260 nm mit einer Auflösung von 1 nm, einer Scangeschwindigkeit von 50 nm/min, einer Integrationszeit von 0,5 sec und 5-10 Akkumulationen aufgenommen. Von allen Spektren wurde das bei identischen Einstellungen aufgenommene Pufferspektrum subtrahiert. Zur Aufnahme von CD-Spektren von A β 42 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit wurde das Material zuvor in einem Eppendorf-Gefäß gelöst und inkubiert. Für die CD-Messungen wurde die benötigte Menge nach sachtem Schwenken entnommen und nach der Messung in das Gefäß zurückpipettiert.

3.5 ThioflavinT-Assay

Zur Bestimmung des Verlaufes der Aggregation von A β 42 unter verschiedenen Pufferbedingungen wurde der Thioflavin-T(ThT)-Assay verwendet. Bei ThT handelt es sich um eine 4-Benzothiazolanillin-Verbindung. Dieses bindet bevorzugt an β -Faltblattstrukturen, ein Sekundärstrukturmerkmal amyloider Proteine. Als Folge der Bindung wird die freie Drehbarkeit der Bindung zwischen dem Benzothiazolring und dem Anillinring eingeschränkt. Dies führt zu einer Fluoreszenzverstärkung gegenüber ungebundenem ThT [24]. Amyloide Proteine wie A β 42 aggregieren unter Bildung von cross- β -faltblattreichen Strukturen. Mittels ThT kann der Aggregationsverlauf über eine zeitliche Änderung des Fluoreszenzsignals gemessen werden. Eine typische Messung stellt eine sigmoide Kurve dar. Diese kann in drei Bereiche unterteilt werden. In der Lag-Phase liegen wenig ThT-bindende Partikel vor. In der logarithmischen Phase erfolgt ein schneller Anstieg des Fluoreszenzsignals und in der Plateauphase bleibt das Fluoreszenzsignal konstant und der Anteil an ThT-bindenden Partikeln bleibt konstant. Als Maß der Aggregationsgeschwindigkeit kann der Zeitpunkt der halben Höhe des Fluoreszenzsignals herangezogen und als Vergleichswert verwendet werden. Alle ThT-Assays wurden in 96-Well-Platten unter Zusatz von ThT in einer Konzentration von 10 μ M ThT pro Well durchgeführt. Es wurde ein Probenvolumen von 200 μ l je Well verwendet. Die Fluoreszenz wurde in einem Tekan M 1000 unter folgenden Bedingungen gemessen:

Exzitationswellenlänge 442 nm

Emissionswellenlänge 482 nm

Integrationszeit 20 μ s

Mehrfachmessung pro Well in 3x3-Quadrat

Detektion der Fluoreszenz unterhalb der Platte

Bei allen Messungen wurden als Kontrollen die verwendeten Puffer mit ThT mitgeführt und die gemessene Fluoreszenz musste konstant und unterhalb der Werte der Proteinproben liegen.

3.6 Rasterkraftmikroskopie

Die Rasterkraftmikroskopie (AFM) ist eine hochauflösende Methode zur Abbildung von Oberflächen. Das Prinzip des AFM ist in Abbildung 3.6.1 dargestellt. Die Probe wird auf eine Oberfläche, z. B. Glas oder Mica, aufgebracht. Diese wird mit einem Cantilever mit feiner Spitze abgetastet. Je nach Änderung der Oberflächenbeschaffenheit verbiegt sich die Spitze. Die Bewegung der Spitze wird durch die Auslenkung eines Laserstrahls gemessen, der auf die Spitze fokussiert wird und von dort auf eine Photodiode reflektiert wird. Dadurch kann ein Bild von der Oberfläche erzeugt werden. AFM-Messungen wurden im Rahmen dieser Arbeit zur Abbildung von A β 42-Aggregaten verwendet [25]. Die Messungen dienten ausschließlich zur Endpunktkontrolle der Aggregation des A β 42 durch den Nachweis von fibrillären Strukturen in der Probenlösung.

Die Probenlösungen wurden für 30 bis 40 min auf dem Mica inkubiert. Anschließend wurde das Mica dreifach mit 100 μ l Wasser gewaschen und im Stickstofffluss getrocknet. Die AFM-Messungen erfolgten im „Intermittent Contact“-Modus. Es wurden Cantilever des Typs OMCL-AC 160TS verwendet. Die Durchführung der AFM-Messungen erfolgte durch Stephanie Schiefer.

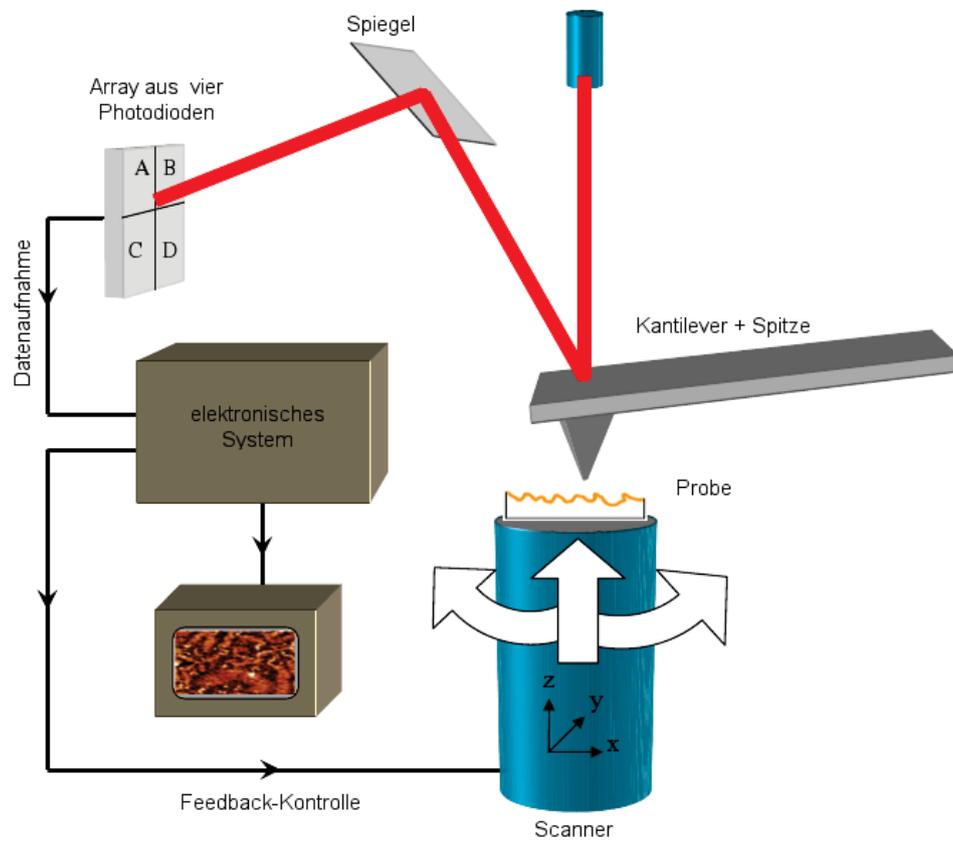


Abbildung 3.6.1: Prinzip der Funktionsweise von AFM-Messungen. Abbildung verändert nach [26]

4 A β 42: Charakterisierung des Ausgangsmaterials

Bei A β 42 handelt es sich um hydrophobes Protein von 4,5 kDa mit starker Aggregationsneigung. Bevor eine Analyse der Oligomere erfolgen kann, muss eine Untersuchung des Startmaterials erfolgen. Dies umfasst die absorptiven Eigenschaften einer A β 42-Lösung (UV-Spektrum, CD-Spektrum). Außerdem soll das monomere A β 42 als Startpunkt der Oligomerisation charakterisiert werden.

4.1 Das Absorptionsspektrum von A β 42

Für die folgenden Experimente ist es notwendig, die Extinktionskoeffizienten des A β 42 in Abhängigkeit von der Wellenlänge zu bestimmen. Dies ermöglicht bereits in der Planung von AUZ-Experimenten mit der Absorptionsoptik eine Abschätzung der zu wählenden Detektionswellenlänge in Abhängigkeit von der zu messenden A β 42-Konzentration. Außerdem kann bestimmt werden, welcher Konzentrationsbereich an A β 42 in AUZ-Experimenten verwendet werden kann, um ein Messsignal im linearen Bereich der Methode (0,1 - 1,2 OD) zu gewährleisten. Die Berechnung von Extinktionskoeffizienten von Proteinen erfolgte auf Basis der im Protein enthaltenen Cysteine, Thryptophane und Tyrosine [27]. Dies ist mit hoher Präzision für Extinktionskoeffizienten bei 280 nm möglich. Vor allem für kleinere Wellenlängen ist dies deutlich schwieriger. Im A β 42 sind ein Tyrosin und drei Phenylalanine enthalten, die vorwiegend zur Absorption beitragen. Der Extinktionskoeffizient des A β 42 bei 280 nm lässt sich auf $1.490 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ berechnen. Zur Aufnahme eines Absorptionsspektrums wurde die UZ mit Absorptionsoptik verwendet. Da die Messungen im Hochvakuum erfolgten, konnten Spektren zwischen 190 und 800 nm aufgenommen werden. A β 42 wurde in einer Konzentration von 96 μM in Sörensen gelöst. Der Puffer zeigt Eigenabsorption erst unterhalb von 210 nm. Durch Verdünnung des A β 42 nach jedem Spektrum direkt in den Messzellen konnten insgesamt vier Konzentrationen zwischen 23 und 96 μM vermessen werden. Vor der Verdünnung wurde die Probe aufgeschüttelt. Die Messungen erfolgten in Messzellen mit der Schichtdicke von 12 mm bei 3.000 rpm und 10 °C in einem Wellenlängenbereich zwischen 195 und 350 nm mit einer Wellenlängenauflösung von 1 nm und 30 Replikaten pro Messpunkt. Die Durchführung der Messung im Schwerfeld sorgte dafür, dass ungelöstes Material direkt zu Boden sank und nicht im Strahlengang verblieb. Die Absorption wurde an einer festen radialen Position zwischen 6,75 und 7 cm in Abhängigkeit von der Füllhöhe gemessen. Die Messkurven wurden mit dem „Global Extinction Fit“-Modul aus UltraScan ausgewertet. Signale unterhalb von 200 nm und oberhalb von 1,2 OD wurden nicht berücksichtigt. Der Fit erfolgte unter Verwendung von fünf Gauß-Kurven. Das resultierende Spektrum wurde auf den Extinktionskoeffizienten bei 280 nm von $1.490 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ normiert. Dadurch ist eine genaue Kenntnis über die tatsächlich vermessene A β 42-Konzentration nicht nötig. Die resultierende Änderung des Extinktionskoeffizienten in Abhängigkeit von der Wellenlänge zeigt Abbildung 4.1.1. Die Standardabweichung des Fits betrug $1,5 \cdot 10^{-2}$. Der Kurvenverlauf zeigt ein typisches Maximum bei 275 nm korrespondierend mit dem im A β 42 enthaltenen Tyrosin. Der Abfall des Extinktionskoeffizienten auf null oberhalb von 300 nm zeigt, dass Streuung aufgrund großer Partikel keine Rolle spielte. Für Messungen in der UZ standen Messzellen mit Mittelstücken der Schichtdicke von 3 und 12 mm zur Verfügung. Auf Basis des Gesetzes von Lambert-Beer kann in Abhängigkeit von der Wellenlänge und Schichtdicke die benötigte Konzentration an A β 42 für ein Absorptions-

signal von 0,1 bzw. 1,2 OD berechnet werden. Aus den Absorptionssignalen bei 210 (niedrigste Wellenlänge ohne Pufferabsorption) und 280 nm (typische Wellenlänge für Proteinmessungen) ergibt sich ein theoretisch messbarer Konzentrationsbereich an A β 42 von 1 μ M bis 2,7 mM (siehe Tabelle 4.1). Dies berücksichtigt weder eine mögliche Löslichkeitsgrenze des A β 42 noch das unterschiedliche Signal-/Rausch-Verhältnis von AUZ-Messungen bei maximalen Signalen von 0,1 bzw. 1,2 OD.

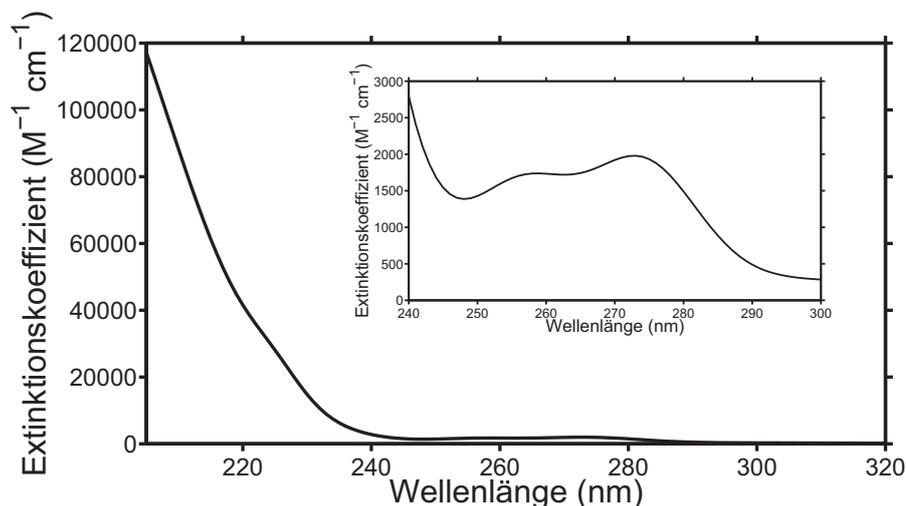


Abbildung 4.1.1: Extinktionskoeffizient von A β 42 in Abhängigkeit von der Wellenlänge. Es wurden Absorptionsspektren von vier A β 42-Konzentrationen zwischen 23 und 95 μ M in der UZ bei 10 °C und 3.000 rpm aufgenommen. Diese wurden mittels UltraScan gefittet und die resultierende Kurve auf den Extinktionskoeffizienten bei 280 nm normiert.

Tabelle 4.1: Theoretisch verwendbare A β 42-Konzentration in AUZ-Messungen bei 210 und 280 nm in Abhängigkeit von der Schichtdicke. Die Angabe erfolgt für Messzellen mit Mittelstücken der Schichtdicke von 3 und 12 mm. Die Extinktionskoeffizienten bei 210 und 280 nm wurden der Analyse mittels UltraScan entnommen und betragen 82.400 M $^{-1}$ cm $^{-1}$ und 1.490 M $^{-1}$ cm $^{-1}$. Die maximal und minimal mögliche messbare Absorption resultiert aus dem linearen Bereich der Methode der AUZ (0,1 bis 1,2 OD).

Schichtdicke und Absorption	210 nm	280 nm
3 mm und 0,1 OD	4 μ M	0,2 mM
3 mm und 1,2 OD	48 μ M	2,7 mM
12 mm und 0,1 OD	1 μ M	56 μ M
12 mm und 1,2 OD	12 μ M	0,7 mM

4.2 Sekundärstrukturbestimmung

Um das monomere A β 42 analysieren zu können, müssen Bedingungen gefunden werden, unter denen die Aggregation so weit wie möglich unterdrückt werden kann. Zu diesem Zweck wurden Sekundärstrukturbestimmungen mittels CD-Spektroskopie durchgeführt. In wässrigen Lösungen bei pH 7,4 aggregiert A β 42 unter zeitlicher Änderung des CD-Spektrums von einem Random-Coil-dominierten zu einem β -Faltblatt-dominierten Spektrum (siehe Kapitel 5). Bedingungen, unter denen möglichst keine A β 42-Aggregation stattfindet, sollten durch ein zeitlich unverändertes CD-Spektrum gekennzeichnet sein. Die Aggregation sollte deutlich über den typischen Messzeitraum eines SV-Laufes in der UZ (6 bis 10 h) unterdrückt werden. Getestet wurde das organische Lösungsmittel HFIP, das auch zur Vorbehandlung des A β -Materials verwendet wurde. HFIP induziert bei Proteinen eine α -helikale Sekundärstruktur [28]. Eine Aggregation des A β 42 unter Bildung von β -Faltblattstrukturen sollte ausgeschlossen sein. Es wurden 37 μ M A β 42 in verschiedenen HFIP-/NaP $_i$ -Mischungen zwischen 0 und 50 % HFIP-Anteil gelöst. CD-Spektren wurden über einen Zeitraum von 40 h aufgenommen. Abbildung 4.2.1 zeigt die Zunahme an α -helikalem Sekundärstrukturanteil mit zunehmender HFIP-Menge zum Zeitpunkt null. Ab 30 % HFIP-Anteil ist die A β 42-Lösung bis zu 40 h stabil (Daten nicht gezeigt). Bei einem Anteil von 10 % HFIP konnte kein CD-Signal gemessen werden. Dies lässt auf ein Präzipitieren des A β 42 schließen. SV-Läufe in der UZ zur Bestimmung des s -Wertes waren in den HFIP-/Wasser-Mischungen nicht möglich. Die hohe Dichte des HFIP ($\sim 1,6$ g/mL, für 99 % HFIP bei 25 °C, www.sigmaaldrich.com) und die Neigung zur Clusterbildung [29] ermöglichten keine Aufnahme von auswertbaren Sedimentationsprofilen.

Daher wurde nach Bedingungen für stabile A β 42-Lösungen in einem rein wässrigen Medium gesucht. Eine pH-Abhängigkeit der Fibrillenbildung von amyloiden Proteinen ist beschrieben [30]. 37 μ M A β 42 wurden in wässrigen Lösungen zwischen pH 2 und 12 gelöst. Um die Salzkonzentration in allen Lösungen möglichst gleich zu halten, wurde NaP $_i$ als Grundlage verwendet. Durch die Zugabe von Salzsäure bzw. Natronlauge wurde der pH-Wert ohne Berücksichtigung des Pufferbereiches variiert. Im sauren pH-Bereich wurde ein β -Faltblatt-dominiertes Spektrum gemessen. Messungen über drei Tage zeigten, dass die Lösungen nicht stabil waren (Daten nicht gezeigt). Eine Aggregation konnte nicht ausgeschlossen werden. Messungen im basischen pH-Bereich (oberhalb von pH 10) zeigten ein Random-Coil-dominiertes Spektrum mit dem typischen Minimum bei 198 nm (siehe Abbildung 4.2.2). Die Inkubation der Probe über mehrere Tage zeigte keine Änderung im CD-Spektrum. A β 42-Lösungen oberhalb von pH 10 sind stabil und können für SV-Läufe in der UZ verwendet werden.

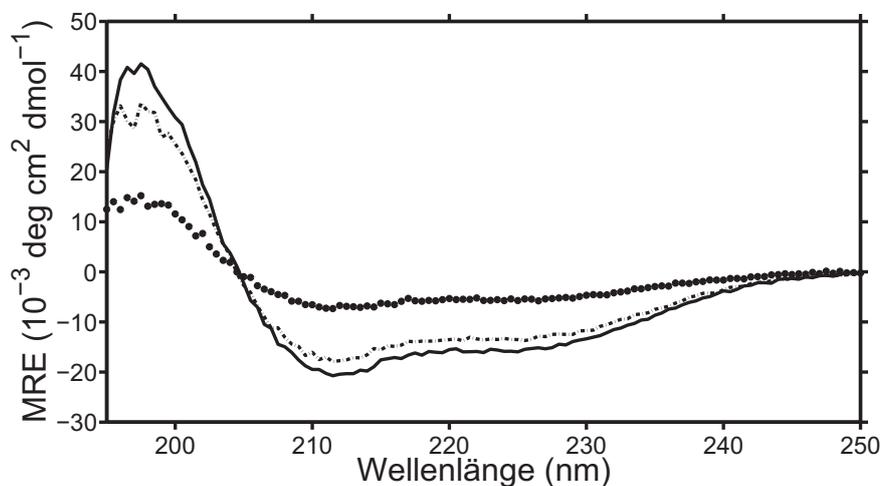


Abbildung 4.2.1: CD-Spektren von A β 42 in verschiedenen HFIP-/Wasser-Mischungen. Dargestellt sind die Spektren von 37 μ M A β 42 in 20 % (\bullet), 30 % (-.-) und 50 % (-) HFIP. Die Spektren wurden direkt nach dem Lösen des A β 42 aufgenommen. Mit zunehmender Konzentration an HFIP nimmt der α -helikale Sekundärstrukturanteil zu.

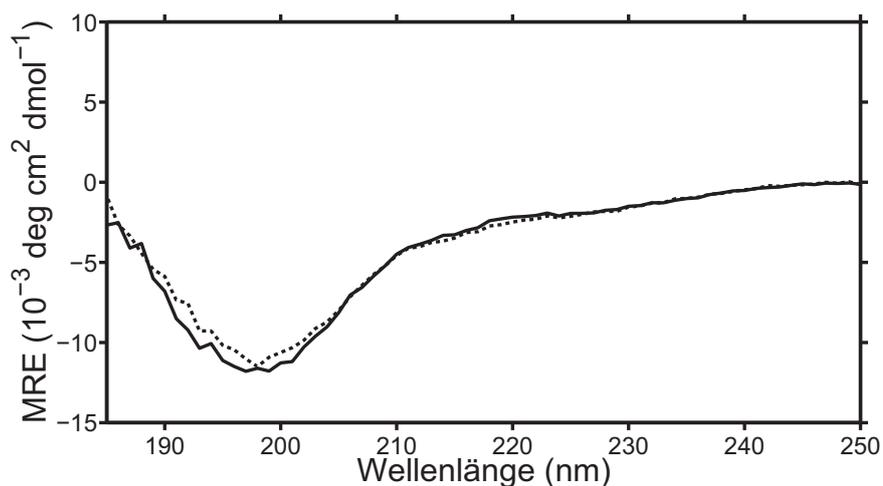


Abbildung 4.2.2: CD-Spektren von 37 μ M A β 42 bei pH 10,4. Die Spektren wurden zum Zeitpunkt 0 h (-) und nach 24 h (\cdot) Inkubation aufgenommen. Die Spektren sind durch Random-Coil-Strukturanteile dominiert und weisen das typische Minimum bei 198 nm auf.

4.3 AUZ zur Charakterisierung des A β 42-Monomers

In den vorangegangenen CD-Messungen konnte gezeigt werden, dass A β 42 bei pH 7,4 zum Zeitpunkt null und bei pH 10 über einen Zeitraum von mindestens 24 h ein Random-Coil-dominiertes Spektrum aufweist. Zur Bestimmung von s -Wert und Form des Monomers unter den beiden Lösungsbedingungen wurden SV-Läufe durchgeführt. 37 μ M A β 42 wurden, ausgehend von NaP $_i$, bei pH 10,5 gelöst. Der SV-Lauf wurde bei 40.000 rpm und 20 °C durchgeführt. Die GA-Analyse lieferte eine Spezies mit einem Anteil von mehr als 50 % mit einem $s_{20,w}$ -Wert von 0,7 S und ein f/f_0 von 1,33. Über die Svedberg-Gleichung kann dieser das Molekulargewicht des A β 42-Monomer zugeordnet werden (siehe Abbildung 4.3.1). Der Fit lieferte als Lösung zwei weitere Spezies. Bei der 0,3-S-Spezies handelt es sich um ein Baseline-Dekonvolutionsproblem. In AUZ-Messungen von langsam sedimentierenden Proteinen (< 2 S) ist die Bestimmung der Baseline schwierig, da zu keinem Zeitpunkt radiale Bereiche nahe des Meniskus von Partikeln befreit sind. Auch maximale Drehzahlen der UZ reichen nicht aus. In der Auswertung resultiert dies in einer Spezies mit kleinem s -Wert (< 0,3 S) und hohem Reibungskoeffizienten ($f/f_0 > 2$). Es handelt sich nicht um eine real sedimentierende Spezies, sondern um ein Artefakt. Die Spezies von 5 S deutet auf nicht vollständig aufgelöstes A β 42 hin. Der Anteil liegt allerdings unterhalb von 5 %. Die $c(s)$ -Verteilung lieferte die gleichen Ergebnisse.

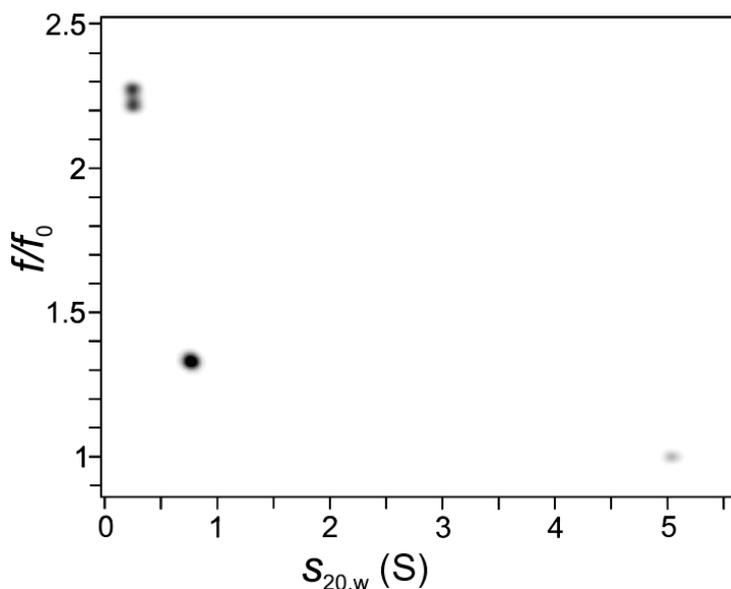


Abbildung 4.3.1: GA-Analyse des SV-Laufes von A β 42 bei pH 10,5. 37 μ M A β 42 wurden, ausgehend von NaP $_i$, bei pH 10 gelöst. Der SV-Lauf wurde bei 40.000 rpm und 20 °C durchgeführt. Die Hauptspezies (> 50 %) entspricht dem monomeren A β 42 mit einem $s_{20,w}$ -Wert von 0,7 S und einem f/f_0 von 1,33.

Bei pH 7,4 aggregiert A β 42. Direkt nach dem Lösen des Proteins liegen neben den Oligomeren in Abhängigkeit von der eingesetzten A β 42-Menge mindesten 50 % Monomer in Lösung vor. Die SV-Läufe können sowohl zur Charakterisierung des Monomers als auch der Oligomere herangezogen werden. Für die Oligomercharakterisierung siehe Kapitel 5.3. In dem Experiment wurden SV-Läufe von A β 42-Konzentrationen zwischen 5 und 200 μ M bei 50.000 und 60.000 rpm durchgeführt. Die $c(s)$ -Verteilungen von 12 Datensätzen lieferten für das Monomer einen $s_{20,w}$ -Wert von $0,62 \pm 0,023$ S und ein f/f_0 von $1,5 \pm 0,08$.

Die Experimente zeigten, dass die Form des monomeren A β 42 von den Lösungsmittelbedingungen abhängig ist (siehe 4.2). Im basischen pH-Bereich ist das Monomer kompakter und sedimentiert folglich schneller. Unter beiden pH-Bedingungen weist das Monomer eine Random-Coil-

Struktur auf. Die kompaktere Form bei pH 10 könnte Interaktionen mit anderen A β 42-Molekülen unterbinden. Aus zeitlichen Gründen konnten keine weiteren Experimente durchgeführt werden, um die Ursache näher zu untersuchen.

Das Teilprogramm „Modeling s, D and f from MW for 4 basic shapes“ von UltraScan wurde verwendet, um den hydrodynamischen Radius des Monomers bei pH 7,4 zu bestimmen. Ein oblater Partikel mit der Masse des Monomers von 4.515 Da, einem \bar{v} von 0,7377 cm³/g und einem $s_{20,w}$ -Wert von 0,62 S hätte ein f/f_0 von 1,54. Dies liegt innerhalb der bestimmten Fehlergrenzen. Der hydrodynamische Radius einer Kugel mit gleichem Volumen beträgt 10,97 Å. Dies ist in guter Übereinstimmung mit dem Ergebnis von 9 Å aus Messungen mittels Fluoreszenzkorrelationspektroskopie [31].

Tabelle 4.2: Bestimmung von $s_{20,w}$ und f/f_0 von monomerem A β 42 bei pH 7,4 und 10,5.

pH-Wert	$s_{20,w}$	f/f_0
7,4	0,62 S	1,5
10,5	0,70 S	1,3

5 Die Aggregation des A β 42

Das in NaP_i gelöste monomere A β 42 wurde im vorangegangenen Kapitel charakterisiert. Im Folgenden wird die Aggregation des Proteins untersucht. Unter Verwendung der AUZ werden die Oligomere charakterisiert, die nach dem Lösen des A β 42 in NaP_i nachweisbar sind. Es wird außerdem untersucht, ob sich der Aggregationsverlauf durch Veränderungen der Lösungsmittelbedingungen beeinflussen lässt.

5.1 Charakterisierung der Aggregation des A β 42 in NaP_i

Für die Analyse der Aggregation wurde NaP_i als Lösungsmittel verwendet. Die niedrige Ionenstärke verlangsamt den Aggregationsprozess des A β 42. Der Verzicht auf NaCl ergibt außerdem eine höhere Transparenz des Puffers im fernen UV-Bereich. NaP_i ist sehr gut für CD-Messungen geeignet. Die Aggregationsgeschwindigkeit des A β 42 in NaP_i ist von der A β 42-Konzentration und der Temperatur abhängig. Die Aggregation wurde unter physiologisch relevanter Temperatur von 37 °C untersucht. Die ThT-Kinetik von 40 μ M A β 42 lieferte eine sigmoide Kurve, die die Zunahme an Fluoreszenzsignal über die Zeit zeigt (siehe Abbildung 5.1.1). Als Maß für die Geschwindigkeit der Aggregation dient der Zeitpunkt der halben Signalthöhe. Dieser lag bei ca. 6 h. Ergänzend zu der ThT-Messung wurde eine Kinetik der Sekundärstrukturumlagerung einer identisch vorbehandelten A β 42-Lösung mittels CD-Spektroskopie durchgeführt. In einem Reaktionsgefäß wurden 37 μ M A β 42 bei 37 °C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden CD-Spektren aufgenommen. Nach dem Lösen weist das CD-Spektrum ein ausgeprägtes Minimum bei 198 nm auf. A β 42 liegt vorwiegend in Random-Coil-Struktur vor. Nach 5 h Inkubation weist das Spektrum ein Maximum bei 195 nm und ein Minimum bei 217 nm auf. Eine Umfaltung des A β 42 in eine vorwiegend β -Faltblatt-reiche Struktur erfolgt. Abbildung 5.1.2 zeigt links exemplarisch vier CD-Spektren zwischen 0 und 5 h Inkubation. Um einen Eindruck über den zeitlichen Verlauf der Strukturänderung zu erhalten, wurde das CD-Signal bei den für Random Coil (198 nm) bzw. β -Faltblatt (217 nm) typischen Wellenlängen gegen die Inkubationszeit aufgetragen (siehe 5.1.2 rechts). Der sich ergebende Kurvenverlauf jeder Wellenlänge zeigt Ähn-

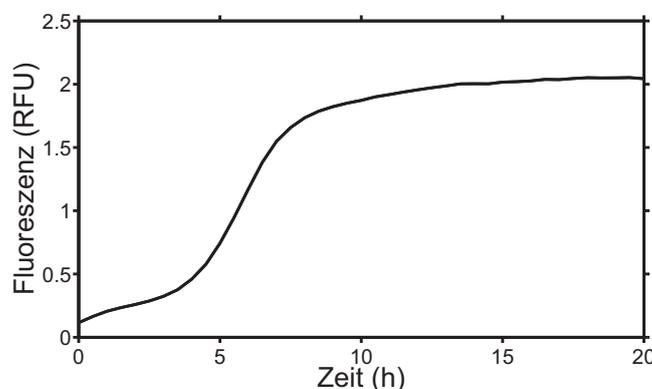


Abbildung 5.1.1: ThT-Kinetik von 40 μ M A β 42 in NaP_i bei 37 °C. Dargestellt ist das Fluoreszenzsignal in Abhängigkeit von der Zeit. Die halbe Höhe des Signals wurde nach ca. 6 h erreicht.

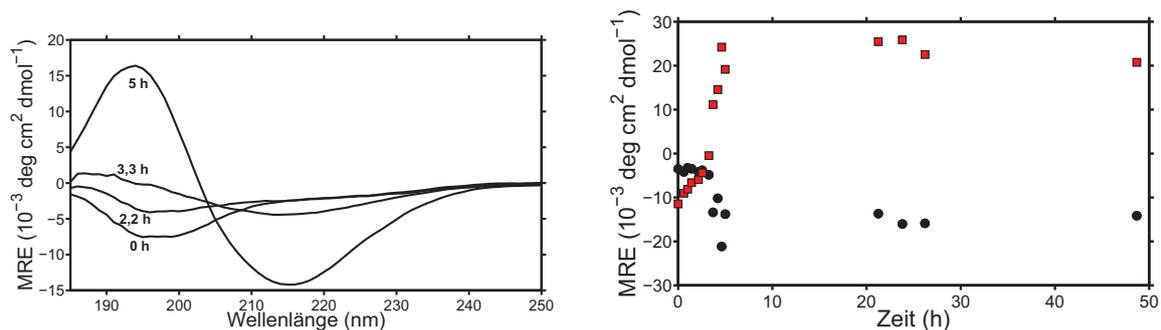


Abbildung 5.1.2: CD-Messungen von 37 μM A β 42 in NaP_i bei 37 °C. Links sind exemplarisch CD-Spektren der inkubierten Lösung zu verschiedenen Zeitpunkten gezeigt. Rechts ist die zeitliche Änderung des CD-Signals bei 195 nm (■) und 217 nm (●) über einen Zeitraum von 50 h gezeigt.

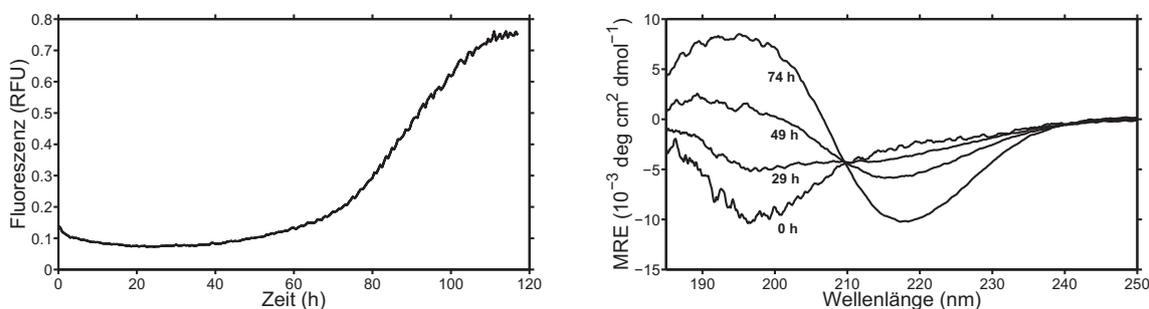


Abbildung 5.1.3: ThT-Kinetik und CD-Spektren von 40 μM A β 42 bei 20 °C. Links ist der Verlauf der ThT-Kinetik gezeigt. Die halbmaximale Signalthöhe wurde nach ca. 86 h erreicht. Rechts sind die CD-Spektren einer identisch vorbehandelten Probe gezeigt.

lichkeiten mit dem Signalverlauf einer ThT-Kinetik. Der Verlauf der Kurve beider Wellenlängen ist komplementär zueinander. Innerhalb der ersten zwei Stunden zeigt das CD-Signal kaum eine Änderung. Zwischen zwei und fünf Stunden erfolgte eine rasche Signaländerung, die anschließend in einem Plateau endet und auch nach 50 h noch bestehen bleibt. Aufgrund der geringen Anzahl an Datenpunkten zwischen 5 und 20 h ist allerdings das Plateau im Vergleich zur ThT-Kinetik deutlich schlechter zu bestimmen. Unter der Annahme der Plateauhöhe aus den Datenpunkten oberhalb von 20 h lässt sich die halbe Höhe der Kurve im Falle beider Wellenlängen mit etwa 4 h bestimmen. Die Sekundärstrukturumlagerung von A β 42 erfolgt im gleichen Zeitrahmen wie die Zunahme an Fluoreszenzsignal in den ThT-Messungen. Bei der Aggregation des A β 42 erfolgt eine Bildung von ThT-positiven Aggregaten unter Umwandlung der Sekundärstruktur von Random Coil zu β -Faltblatt.

Identisch vorbehandelte Proben von 40 μM A β 42 wurden bei 20 °C inkubiert. In der ThT-Messung wurde die halbmaximale Höhe des Fluoreszenzsignals nach ca. 86 h erreicht (siehe Abbildung 5.1.3 links). Ergänzend aufgenommene CD-Spektren zeigten einen Übergang von einem Random-Coil-dominierten Spektrum zu einem β -Faltblatt-dominierten Spektrum (siehe Abbildung 5.1.3 rechts). Ein positives CD-Signal bei 195 nm (entspricht Maximum im β -Faltblattspektrum) wurde erst nach 49 h gemessen. Dies entspricht einer 10-fachen Verlangsamung der Sekundärstrukturumwandlung gegenüber 37 °C.

Durch die Verwendung von 5 anstelle von 40 μM A β 42 wurde der Einfluss der Konzentration auf die Aggregationsgeschwindigkeit untersucht. Es wurde eine ThT-Kinetik dieser Probe bei 37 °C durchgeführt (siehe Abbildung 5.1.4). Die halbmaximale Signalthöhe wurde nach ca. 56 h erreicht. Dies entspricht einer 9-fachen Verlangsamung der Aggregation bei Reduktion der Konzentration

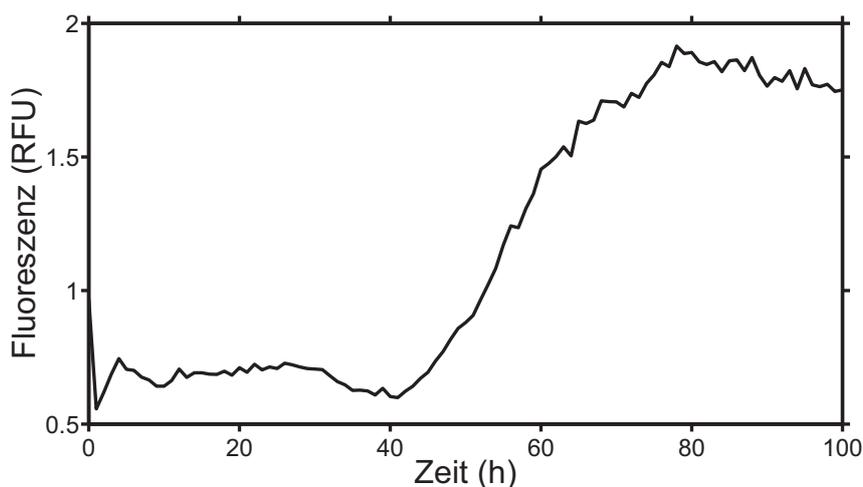


Abbildung 5.1.4: ThT-Kinetik von 5 μ M A β 42 bei 37 °C. Das Protein wurde in NaP_i gelöst. Die halbmaximale Signalthöhe wurde nach ca. 56 h erreicht.

um das 8-fache. Eine Messung dieser Konzentration im CD war nicht möglich.

Die Messungen zeigten, dass eine Reduktion der A β 42-Konzentration und der Temperatur die Aggregation verlangsamen. Dies deutet auf die Beteiligung hydrophober Wechselwirkungen bei der Aggregation hin. Die Beeinflussbarkeit der Aggregationsgeschwindigkeit ist für die Durchführung von AUZ-Messungen relevant. Zur Bestimmung der Oligomerverteilung in A β 42-Proben kann durch Wahl der Konzentration bzw. Messtemperatur sichergestellt werden, dass die Aggregation in der Probe während der Zentrifugation nicht in die steile Wachstumsphase übergeht.

Um einen Überblick über die Morphologie der entstehenden Aggregate zu erhalten, wurden AFM-Messungen durchgeführt. A β 42 wurde in NaP_i in einer Konzentration von 40 μ M gelöst und bei 37 °C inkubiert. Die Probe wurde zum Zeitpunkt 0 h und nach 6 h auf Mica an Luft abgebildet. Mit einem hydrodynamischen Radius von 9 Å liegt das A β 42-Monomer unterhalb der Detektionsgrenze der Methode. Daher ist zum Zeitpunkt null nur die Oberfläche des Mica zu sehen. Mit fortschreitender Aggregation erfolgt die Bildung von globulären und fibrillären Strukturen (siehe Abbildung 5.1.5). AFM eignet sich als bildgebendes Verfahren, um die fortschreitende Aggregation des A β 42 darzustellen [32]. In dieser Arbeit wurde diese Methode als Endpunktkontrolle eingesetzt, um durch den Nachweis von Fibrillen eine Aggregation des A β 42 zu überprüfen.

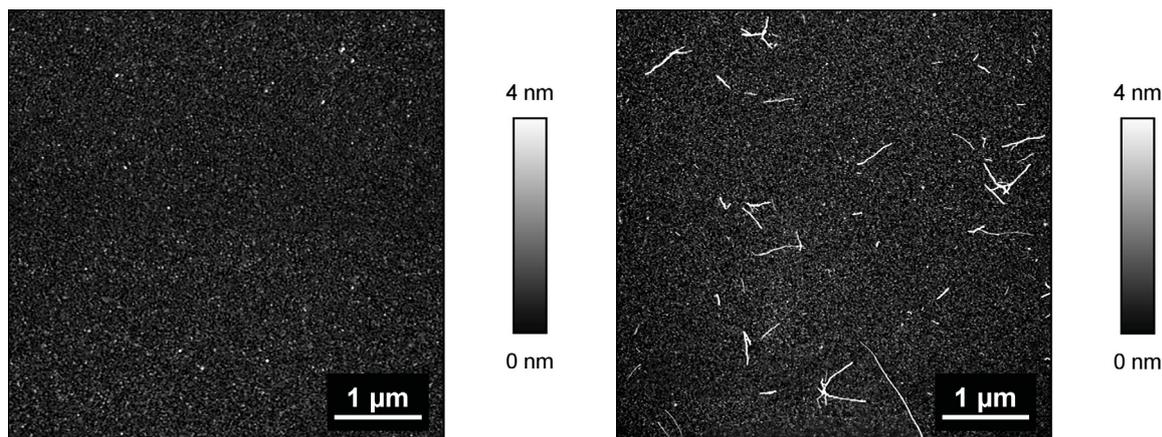


Abbildung 5.1.5: AFM-Messungen von $A\beta 42$ zu verschiedenen Zeitpunkten der Aggregation. 40 μM $A\beta 42$ wurden in NaP_i gelöst und bei 37 °C inkubiert. Gezeigt sind AFM-Messungen zum Zeitpunkt 0 (links) und nach 6 h Inkubation. Die Messungen wurden auf Mica an Luft durchgeführt.

5.2 Die Suche nach dem Dimer

In den bisher durchgeführten AUZ-Messungen konnten für das monomere $A\beta 42$ bei pH 7,4 ein $s_{20,w}$ -Wert von 0,62 S und ein f/f_0 von 1,5 bestimmt werden. Eine Aggregation des $A\beta 42$ konnte durch CD- und ThT-Messungen nachgewiesen werden. Es stellt sich die Frage nach dem ersten Oligomer des $A\beta 42$ auf dem Weg zur Fibrille. Als kleinstes Aggregat ist die Bildung eines $A\beta 42$ -Dimers denkbar. In der Literatur werden Dimere des $A\beta 42$ als Grundbaustein für toxische Oligomere und Dimere des $A\beta 40$ als stabile Homodimere unter physiologischen Bedingungen diskutiert [33, 34]. In keiner AUZ-Messung konnte ein dimeres $A\beta 42$ beobachtet werden. Im Folgenden wird untersucht, ob die Detektion eines Dimers mittels AUZ überhaupt möglich ist.

Zu diesem Zweck wurde ein Sedimentationsprofil auf Basis der Lamm-Gleichung simuliert. Zur Simulation wurde das Teilprogramm „Finite Elements Simulation“ von UltraScan verwendet. Zur Vereinfachung wurde angenommen, dass Monomer und Dimer als zwei unabhängige, nicht interagierende Spezies in Lösung in einem Verhältnis von 1:1 vorliegen. Für das Monomer wurden die Parameter aus der pH 7,4-Analyse verwendet. Das Dimer besitzt das 2-fache Molekulargewicht und das gleiche \bar{v} wie das Monomer. Bezüglich der Form wird angenommen, dass durch die Dimerisierung das Aggregat kompakter wird. f/f_0 des Dimers wird demnach kleiner als 1,5. Tabelle 5.1 fasst die verwendeten Parameter für das Monomer und Dimer zusammen. Um die bestmögliche Trennung zu gewährleisten, wurde der SV-Lauf mit einer Maximalgeschwindigkeit von 60.000 rpm simuliert. Um möglichst realistische Messbedingungen zu simulieren, wurde mögliches Rauschen auf den Daten simuliert. Die verwendeten Parameter für die Simulation des SV-Laufes sind in Tabelle 5.2 zusammengefasst. Das generierte Sedimentationsprofil wurde gespeichert. Die Auswertung erfolgte sowohl über die $c(s)$ -Verteilung als auch den GA. Die resultierenden $s_{20,w}$ -Verteilungen zeigten in beiden Fällen zwei Hauptkomponenten, die dem Monomer (0,7 S) bzw. Dimer (1,2 S) des $A\beta 42$ zugeordnet werden konnten (siehe Abbildung 5.2.1). Die $c(s)$ -Verteilung

Tabelle 5.1: Ausgangswerte von monomerem und dimerem $A\beta 42$ für die Simulation des Sedimentationsprofils.

	Molekulargewicht	$s_{20,w}$	f/f_0	Konzentration
Monomer	4.515 Da	0,65 S	1,5	0,5 OD
Dimer	9.030 Da	1,16 S	1,3	0,5 OD

Tabelle 5.2: Simulationsparameter für den SV-Lauf.

Rotorgeschwindigkeit	60.000 rpm
Rotorbeschleunigung	400 rpm/s
Dauer des SV-Laufes	10 h
Anzahl an aufgenommenen Scans	150
zeitlicher Scanabstand	3 min
radiale Auflösung	30 μm
Meniskusposition	5,9 cm
Bodenposition	7,2 cm
zufälliges Rauschen	0,25 % der OD
Ti-Noise	0,2 % der OD
Ri-Noise	0 % der OD

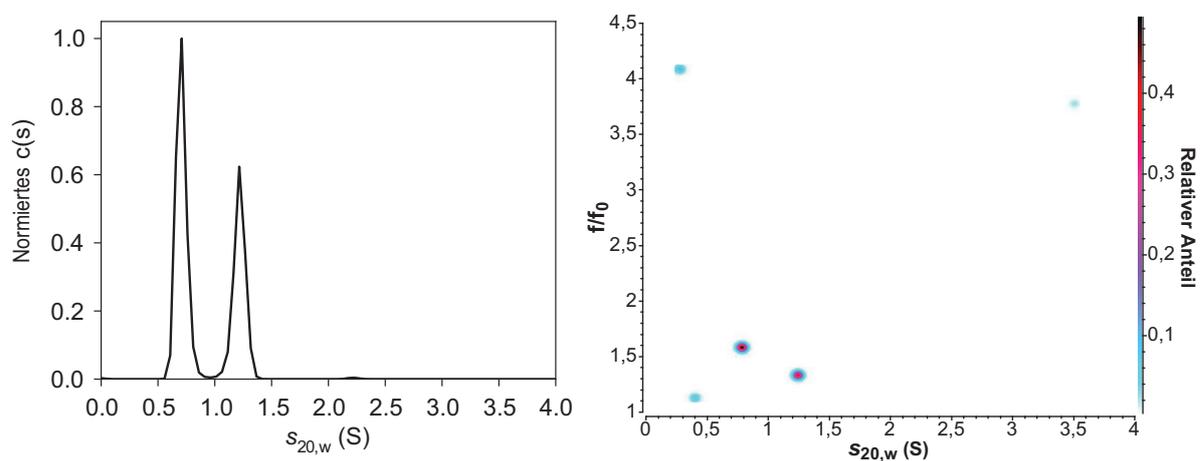


Abbildung 5.2.1: Auswertung des simulierten Sedimentationsprofils. Simuliert wurde die Sedimentation einer 1:1-Mischung von monomerem und dimerem A β 42 als nicht interagierende Spezies. Die Daten wurden mit UltraScan erzeugt und sowohl mittels $c(s)$ -Verteilung (links) als auch GA (rechts) analysiert. Die $c(s)$ -Verteilung ist auf das maximale $c(s)$ normiert.

lieferte ein mittleres f/f_0 von 1,4. Die GA-Analyse lieferte ein f/f_0 für das Monomer von 1,6 und für das Dimer von 1,3. Der Anteil des Monomers in der $c(s)$ -Verteilung wurde mit 60 % und im GA mit 56 % bestimmt. Die Analysen lieferten Komponenten mit $s_{20,w}$ -Werten größer als 2 S. Deren Anteile lagen unter 1 % und resultierten vermutlich aus dem simulierten Rauschen. Die s -Werte unter 0,5 S können dem Baseline-Dekonvolutionsproblem, das auch bei realen Messdaten von A β 42 auftritt, zugeordnet werden. Die Auswertung der Daten ließ folgende Schlüsse zu. Monomeres und dimeres A β 42 können mittels AUZ nebeneinander detektiert werden. Die Abweichung der gefitteten $s_{20,w}$ -Werte von den für die Simulation verwendeten Parametern betrug weniger als 0,1 S. Die Bestimmung des Formparameters mittels GA-Analyse ergab das größere f/f_0 für das Monomer, auch wenn dies um 0,14 höher lag als bei der Simulation vorgegeben. Die Bestimmung der Anteile an Monomer und Dimer zeigte in keinem Fall die simulierte 1:1-Mischung. In beiden Auswertungsprozeduren wurde das Dimer unterbewertet, am deutlichsten in der $c(s)$ -Verteilung. Dies wurde drastischer, je geringer der Anteil an Dimer für die Simulation des Sedimentationsprofils gewählt wurde (Daten nicht gezeigt). Ein geringerer Anteil an Dimer erschwert die Bestimmung der hydrodynamischen Parameter in der Auswertung. Hier nähert man sich der Auflösungsgrenze der Methode, bei der zwei Partikel mit 0,5 S Unterschied noch nebeneinander detektiert werden können. Um in A β 42-Lösungen bei pH 7,4 kein Dimer zu detektieren, müsste der Anteil deutlich unterhalb von 10 % liegen. Es wurden Messungen über einen Konzentrationsbereich von 5 bis 280 μM durchgeführt und es konnte kein Partikel mit einem s -Wert korrespondierend mit einem Dimer gefunden werden. Auch eine Schulter am Monomerpeak in der $c(s)$ -Verteilung, die auf einen geringen Anteil eines Dimers hindeuten würde, trat nicht auf. Auf dieser Basis ist davon auszugehen, dass keine Dimere des A β 42 in NaP_i gebildet werden. Zur Kontrolle wurde das Sedimentationsprofil vom A β 42-Monomer unter den vorangegangenen Parametern simuliert und ausgewertet. Der $s_{20,w}$ -Wert konnte auf 0,03 S und f/f_0 auf 0,05 genau bestimmt werden (Daten nicht gezeigt). Die Auswertung zeigte auch hier das bekannte Baseline-Dekonvolutionsproblem.

Nach der Simulation der Dimere wurde versucht, mit einem Dimerkonstrukt AUZ-Messungen durchzuführen. Cys-A β 40 formt in Lösung aufgrund der sich bildenden Disulfidbrücke Dimere. Das Cys-A β 40 wurde in 6 M Guanidiniumhydrochlorid gelöst und über eine Superdex 75-Größenausschlussssäule gegeben. Als Laufpuffer wurde NaP_i verwendet. Der Peak korrespondierend mit der Retentionszeit des Monomers wurde gesammelt, auf 20 μM mittels NaP_i eingestellt und für die AUZ-Messungen verwendet. Das Material wurde durch Stephanie Schiefer und Adeline Bieker bereitgestellt. Durch Zugabe von TCEP zur Lösung kann die Disulfidbrücke gebrochen werden. In Abhängigkeit der TCEP-Konzentration sollten neben dem Monomer unterschiedliche Anteile an Dimeren in der Lösung vorliegen. Mittels SV-Läufen sollten sich Monomer und Dimer nachweisen lassen. Es wurden SV-Läufe unter Zusatz von 0, 20, 200 und 2.000 μM TCEP bei 60.000 rpm durchgeführt. Die $c(s)$ -Verteilung lieferte eine Hauptkomponente, deren s -Wert sich in Abhängigkeit von der TCEP-Konzentration verschiebt (siehe Abbildung 5.2.2). Ohne den Zusatz von TCEP liegt der $s_{20,w}$ -Wert bei 0,91 S mit einem f/f_0 von 1,6. Durch Zugabe von 200 μM TCEP verringerte sich der $s_{20,w}$ -Wert auf 0,85 S (f/f_0 1,6) und bei Zugabe von 2.000 μM auf 0,73 S (f/f_0 1,5). Das monomere Cys-A β 40 besitzt ein Molekulargewicht von 4.433 Da. Unter Verwendung der Svedberg-Gleichung kann ein Protein dieser Masse und eines \bar{v} von 0,7316 cm^3/g einen $s_{20,w}$ -Wert von maximal 0,97 S besitzen. Die detektierte Spezies im SV-Lauf mit 0 und 20 μM TCEP kann dem Dimer zugeordnet werden. Im SV-Lauf mit 2.000 μM TCEP ist die Spezies dem Monomer zuzuordnen. Ein Dimer mit einem $s_{20,w}$ von 0,73 S würde einen deutlich höheren Formparameter aufweisen ($f/f_0 > 2$). Der SV-Lauf mit 200 μM TCEP lieferte einen $s_{20,w}$ -Wert zwischen dem des Monomers und des Dimers. Die Ursache könnte ein schnelles Monomer-Dimer-Gleichgewicht sein, welches eine Trennung von Monomer und Dimer verhindert. Möglicherweise erfolgt hier ein ständiger Zerfall und Neubildung von Dimeren. Die $c(s)$ -Verteilung liefert in diesem Fall einen s -Wert, der in Abhängigkeit vom Monomer- und Dimeranteil zwischen dem eigentlichen s -Wert des Monomers bzw. Dimers liegt. Dieses Experiment

bestätigt die Annahme in der Simulation, dass ein dimeres $A\beta$ einen messbar größeren s -Wert als das Monomer aufweist. Sollte $A\beta_{42}$ in Lösung ein Monomer-Dimer-Gleichgewicht bilden, müssten Messungen verschiedener Konzentrationen das vorliegende Gleichgewicht auch in Richtung Dimer verschieben können. Die Bestimmung von s -Werten, die zu groß für ein Monomer wären, wäre die Folge. Dies war in keiner der durchgeführten Messungen der Fall. Dies unterstützt die Vermutung, dass $A\beta_{42}$ in NaP_i keine Dimere bildet.

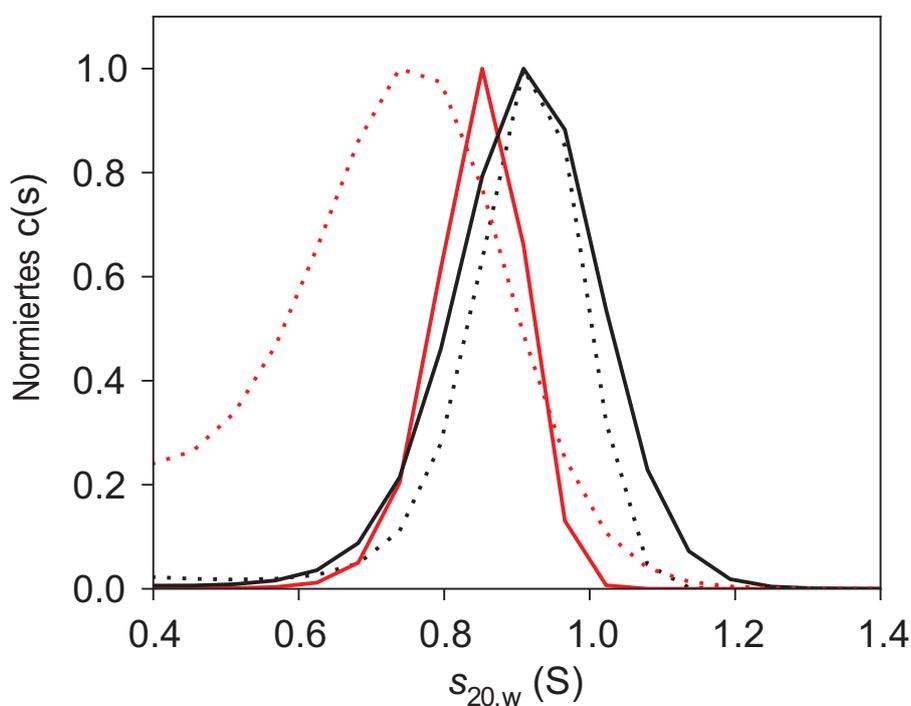


Abbildung 5.2.2: $c(s)$ -Verteilung von Cys- $A\beta_{40}$ unter Einfluss von TCEP. 20 μM Cys- $A\beta_{40}$ wurden in NaP_i unter Zusatz von 0 (-), 20 μM (\bullet), 200 μM (-) und 2 mM (\bullet) TCEP gelöst. Es wurden SV-Läufe bei 15 $^\circ\text{C}$ und 60.000 rpm durchgeführt. Die $c(s)$ -Verteilungen wurden auf das maximale $c(s)$ normiert.

5.3 Oligomergrößenverteilung von A β 42

Zur Untersuchung der Größenverteilung von Oligomeren in A β 42-Lösungen wurden SV-Läufe durchgeführt. Mittels AFM wurde gezeigt, dass die Aggregation des A β 42 mit zunehmender Zeit zur Bildung von globulären und fibrillären Strukturen führt. Erste SV-Läufe wurden von 50 μ M A β 42 in NaP_i nach dem Lösen (Zeitpunkt 0) und nach 15 h Inkubation bei 20 °C durchgeführt. Die Länge der AUZ-Messungen betrug 3,7 h bei einer Rotortemperatur von 20 °C und einer Rotorgeschwindigkeit von 50.000 (15 h) bzw. 60.000 rpm (0 h). Basierend auf den vorangegangenen ThT-Kinetiken ist eine Aggregation des A β 42 unter diesen Bedingungen während der Messung nicht zu erwarten. Das Ergebnis der SV-Läufe ist in Abbildung 5.3.1 dargestellt. Die $c(s)$ -Verteilung zeigt zum Zeitpunkt 0 h eine Hauptspezies mit einem $s_{20,w}$ von 0,6 S mit einem Anteil von 64 %, der dem Monomer zugeordnet werden konnte. 36 % der Probe sind größere Oligomere mit einem gewichtsgemittelten $s_{20,w}$ von 7,5 S. Das gewichtsgemittelte f/f_0 beträgt 1,45. Nach 15 h Inkubation der Probe reduziert sich der Anteil an detektierbarem Monomer auf 48,5 %. Der Anteil an Oligomeren betrug 51,5 % mit einem gewichtsgemittelten $s_{20,w}$ von 10,9 S. Das gewichtsgemittelte f/f_0 beträgt 1,6. Der Versuch zeigte, dass eine Aussage über die Größenverteilung der Oligomere mittels AUZ möglich ist und eine Änderung aufgrund der Vorinkubation detektierbar ist. Die Detektion distinkter Oligomere in Lösung ist schwierig, da zu jedem Zeitpunkt mehrere Oligomere vorliegen. Um verschiedene Oligomere in der $c(s)$ -Verteilung zu unterscheiden, sollten die korrespondierenden Peaks idealerweise Baseline-getrennten Gauß-Kurven entsprechen. Im Gegensatz zum Monomerpeak ist dies im Bereich zwischen 3 und 10 S (bei 0 h Inkubation) nicht der Fall. Die Oligomere in der A β 42-Lösung scheinen sich nur wenig in ihren s -Werten zu unterscheiden. Es kommt zur Überlappung der jeder Spezies zuzuordnenden theoretischen Gauß-Kurve. Die Auflösung zwischen den Aggregaten kann aber aufgrund der limitierten Trennstrecke und Rotorgeschwindigkeit nicht verbessert werden. Für die Auswertung wird

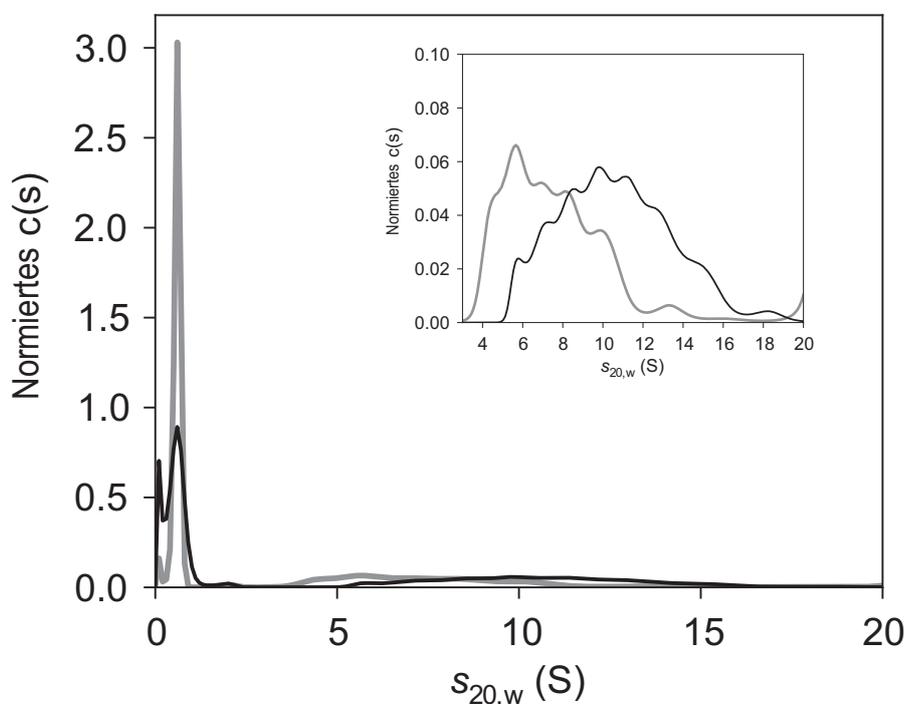


Abbildung 5.3.1: $c(s)$ -Verteilung von 50 μ M A β 42 zum Zeitpunkt 0 (grau) und nach 15 h (schwarz) Inkubation bei 20 °C. Die SV-Läufe wurden bei 50.000 (15 h) bzw. 60.000 rpm (0 h) und 20 °C durchgeführt. Mit zunehmender Inkubationszeit nimmt der Monomeranteil ab. Der gewichtsgemittelte $s_{20,w}$ der Oligomere verschiebt sich mit der Inkubation von 7,5 auf 10,9 S. Die $c(s)$ -Verteilungen sind auf die Fläche normiert.

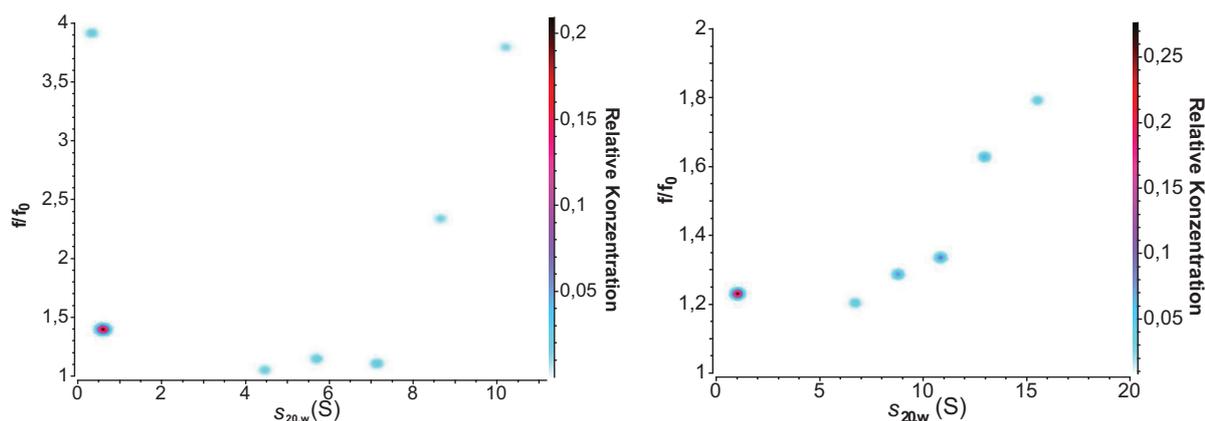


Abbildung 5.3.2: GA-Analyse von SV-Läufen A β 42 nach 0 (links) und 15 h (rechts) Inkubation bei 20 °C. Die SV-Läufe wurden bei 50.000 (15 h) und 60.000 rpm (0 h) durchgeführt. Die nachweisbaren Oligomere werden mit fortschreitender Inkubationszeit größer und ihre Form weicht zunehmend von der einer Kugel ab.

daher angenommen, dass eine definierte Spezies in der Mischung vorliegt, wenn ein Maximum auf der $c(s)$ -Kurve durch zwei deutliche Minima begrenzt wird. Die Angabe von Konzentrationsanteilen der jeweiligen Aggregate ist daher auch nur begrenzt möglich. Eine Anreicherung und Separation einzelner Aggregate scheint ein logischer Schritt, um detailliertere Informationen zu erhalten, ist aber aufgrund der Instabilität dieser nicht möglich. Solange die Aggregate in Lösung im Gleichgewicht sind, wird eine weitere Aggregation oder ein Zerfall verhindert. Die Auswertung mittels der $c(s)$ -Verteilung zeigt außerdem eine weitere Problematik auf. Da es sich bei den Proben immer um Gemische aus mehreren Oligomeren handelt, lässt das kalkulierte gewichtsgemittelte f/f_0 nur begrenzte Aussagen zu. Solange die Zusammensetzung durch das Monomer dominiert wird, kann f/f_0 diesem zugeordnet werden. Je weiter die Aggregation fortschreitet und je mehr Oligomere sich bilden, desto stärker unterliegt dieser Wert einer Mittelung. Der f/f_0 -Wert der 0-h-Messungen entspricht dem Wert, der für das Monomer in Kapitel 4.3 bestimmt wurde. In der Messung der Probe nach 15 h Inkubation steigt das f/f_0 , da sich der Anteil an Monomer reduziert und die Form der größeren Oligomere zunehmend auf den gewichtsgemittelten f/f_0 -Wert auswirkt. Um Aussagen über die Form der Oligomere zu erhalten, wurden die SV-Läufe zusätzlich über eine GA-Analyse ausgewertet (siehe Abbildung 5.3.2). Diese Analyse gestattet das Fitten der Messdaten innerhalb eines s -Wert- und f/f_0 -Bereiches. Die berechnete Verteilung zum Zeitpunkt 0 zeigt das Monomer bei 0,6 S und Oligomere bei 4, 6, 7 und 10 S. Der Formparameter für das Monomer liegt bei 1,45 und für die Oligomere zwischen 4 und 8 S unterhalb von 1,2. Die Auswertung des Datensatzes nach 15 h Inkubation zeigt, wie die $c(s)$ -Verteilung, eine Verschiebung der gebildeten Oligomere zu höheren s -Werten. Das berechnete f/f_0 nimmt mit zunehmender Oligomergröße zu. Dies bestätigt, dass das gewichtsgemittelte f/f_0 in der $c(s)$ -Verteilung größer wird. Auffällig ist, dass die Auswertung in diesem Fall nur zu 5 Oligomeren zwischen 5 und 15 S führt. Die Auswertung über die $c(s)$ -Verteilung legt die Vermutung nahe, dass es sich um mehr handeln könnte. Dies zeigt, dass eine Kombination beider Programme sinnvoll ist, um die entstandenen Oligomere möglichst genau zu charakterisieren.

Die vorangegangenen Messungen zeigten bereits den Einfluss der Inkubationszeit auf die Oligomergrößenverteilung. Um Informationen über die zum frühestmöglichen Zeitpunkt gebildeten Aggregate zu erhalten, wurden im Folgenden nur Messungen zum Zeitpunkt null betrachtet. Es wurden SV-Läufe von A β 42-Lösungen in einem Konzentrationsbereich zwischen 5 und 280 μ M durchgeführt. A β 42 wurde in vorgekühltem NaP_i gelöst und auf Eis bis zum Befüllen der Messzellen gelagert, um eine Aggregation weitestgehend zu unterdrücken. Um Proben mit hoher und niedriger Konzentration in einem AUZ-Lauf zu vermessen, wurden Mittelstücke mit einer

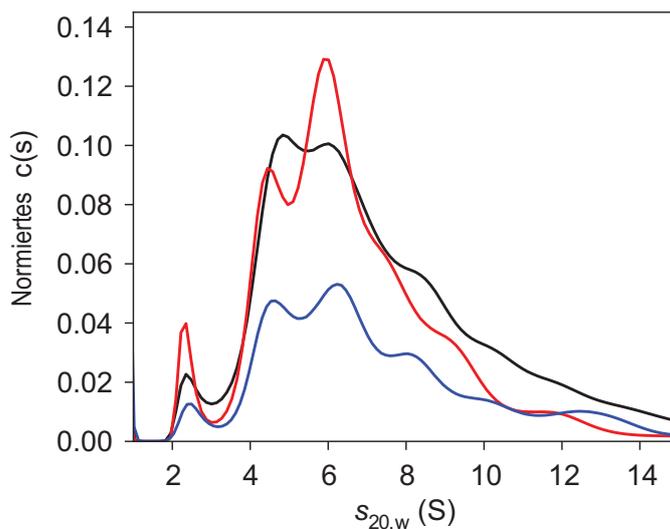


Abbildung 5.3.3: $c(s)$ -Verteilungen der SV-Läufe bei verschiedenen A β 42-Konzentrationen zum Zeitpunkt 0. Exemplarisch sind die Auswertungen für die Konzentrationen 20 (blau), 80 (schwarz) und 120 μM (rot) gezeigt. Dargestellt ist nur der Bereich zwischen 1 und 15 S. Der dominierende Monomerpeak ist nicht gezeigt. Die Verteilungen sind auf die Fläche normiert.

Tabelle 5.3: $s_{20,w}$ -Werte der detektierten A β 42-Oligomere.

$s_{20,w}$	Anzahl der Datensätze
$2,56 \pm 0,32$ S	11
$4,70 \pm 0,27$ S	10
$6,25 \pm 0,28$ S	9

Schichtdicke von 3 und 12 mm parallel verwendet. Die Messzellen wurden ebenfalls vorgekühlt. Die AUZ-Messungen erfolgten bei Rotortemperaturen von 10 bzw. 15 °C. Die Messwellenlänge wurde entsprechend der zu messenden Proben gewählt, um eine Absorption von mindestens 0,5 OD zu gewährleisten. Die SV-Läufe wurden bei 50.000 bzw. 60.000 rpm durchgeführt. Die Auswertung erfolgte über die $c(s)$ -Verteilung, um im ersten Schritt Informationen über die s -Werte der entstandenen Oligomere zu erhalten. Das wiederholte Auftreten von s -Werten bei verschiedenen Konzentrationen wurde als Bestätigung vorhandener distinkter A β 42-Oligomere gewertet. Abbildung 5.3.3 zeigt exemplarisch die $c(s)$ -Verteilungen der Konzentrationen 20, 80 und 120 μM . Aus allen durchgeführten Messungen konnten folgende mittlere $s_{20,w}$ -Werte für distinkte A β 42-Oligomere bestimmt werden (siehe Tabelle 5.3): $2,56 \pm 0,32$ S (basierend auf 11 Datensätzen), $4,7 \pm 0,27$ S (basierend auf 10 Datensätzen) und $6,25 \pm 0,28$ S (basierend auf 9 Datensätzen). Größere Oligomere sind in einigen Messungen ebenfalls bei ca. 8 und 10 S detektierbar, aber ein Fehler kann hier aufgrund der geringen Datenzahl nicht angegeben werden.

Für eine Zuordnung der Masse zu den bestimmten $s_{20,w}$ -Werten ist die Bestimmung der Form unablässig. Anhand der AFM-Messungen zu frühen Zeiten in der Aggregation lässt sich eine eher globuläre Struktur der sich früh bildenden Oligomere vermuten. Die Auswertung von SV-Läufen ohne Inkubation des A β 42 mittels GA-Analyse lieferte für die Oligomere f/f_0 -Werte unterhalb von 1,2. Die Bestimmung des Formparameters, vor allem in Oligomermischungen mit geringem Anteil, ist schwierig. f/f_0 -Werte können mit einer Genauigkeit von ca. 0,1 bestimmt werden. Eine Unterscheidung zwischen einer idealen Kugelform ($f/f_0 = 1$) und einer schwach oblaten Form ist daher nicht möglich. Für globuläre Oligomere kann angenommen werden, dass f/f_0 kleiner

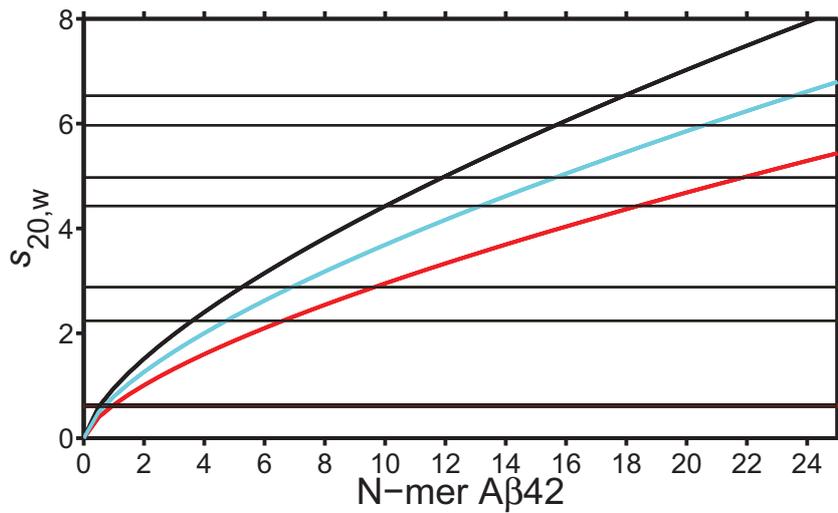


Abbildung 5.3.4: A β 42-Oligomergröße gegen $s_{20,w}$ bei konstantem f/f_0 . Die Kurvenverläufe entsprechen den Formparametern von 1 (schwarz), 1,2 (cyan) und 1,5 (rot). Als Horizontalenpaare sind die $s_{20,w}$ -Wertgrenzen (von unten nach oben) vom Monomer, 2,56-S-, 4,7-S- und 6,25-S-Oligomer des A β 42 eingetragen.

als 1,5 (Form des monomeren A β 42) ist. Als mittlerer f/f_0 -Wert von globulären Proteinen wird zur Berechnung der Molekulargewichte ein f/f_0 von 1,2 angenommen [35]. Auf Basis der Svedberg-Gleichung und der Stokes-Einstein-Beziehung kann für eine zunehmende Oligomergröße bei konstanter Form der resultierende $s_{20,w}$ -Wert berechnet werden.

$$s_{20,w} = \left[\frac{\left(\frac{M * n}{\pi * N_A} \right)^2}{\bar{v} * \frac{3}{4}} \right]^{1/3} * (1 - \bar{v} * \rho) * (f/f_0 * 6 * \eta)^{-1}$$

Für die Berechnung wird die Masse von A β 42 ($M = 4.514,1$ Da), die Anzahl an A β 42-Molekülen (n), die Avogadro-Konstante (N_A), das partiell spezifische Volumen von A β 42 ($\bar{v} = 0,7377$ cm³/g), die Dichte (ρ) und Viskosität (η) von Wasser bei 20 °C zugrunde gelegt. Abbildung 5.3.4 stellt die Oligomergröße des A β 42 gegen den $s_{20,w}$ dar, für ein f/f_0 von 1, 1,2 und 1,5. Die minimal mögliche Anzahl an A β 42-Einheiten eines Oligomers liegt in einer Kugel vor und die maximal mögliche Anzahl bei einem f/f_0 von 1,2. Je größer das Oligomer ist, desto unsicherer ist die Molekulargewichtsangabe, wenn nicht zwischen 1 und 1,2 unterschieden werden kann. Für das kleinste Oligomer von $2,56 \pm 0,32$ S liegt die Anzahl an A β 42-Molekülen zwischen 4 und 6, für das Oligomer mit $4,7 \pm 0,27$ S zwischen 10 und 15 und für das Oligomer mit $6,25 \pm 0,28$ S zwischen 16 und 23.

Zur Untersuchung weiterer sich bildender Oligomere wurden im nächsten Schritt A β 42-Lösungen im Konzentrationsbereich von 20 und 50 μ M 3 h bei 20 °C direkt in den AUZ-Messzellen inkubiert und anschließend SV-Läufe durchgeführt. Die Inkubation in den Messzellen sollte die Einflüsse auf die Probe so gering wie möglich halten. Aufgrund der zunehmenden Oligomergröße wurde versucht, die Auflösung im Bereich der Oligomere oberhalb von 6 S durch geringere Rotordrehzahlen (nur 40.000 rpm) zu erhöhen. Dies hat Einbußen der Genauigkeit der Bestimmung der Oligomergrößen im Bereich unterhalb von 6 S zur Folge. Die Auswertung der Daten wurde ebenfalls durch die Zunahme der Oligomeranzahl bei geringem Oligomeranteil erschwert. Daher wurde versucht, durch eine zusammenfassende Darstellung aller Läufe (12 Stück) ohne die Durchführung eines globalen Fits möglichst viele zusätzliche Informationen über die Oligomere

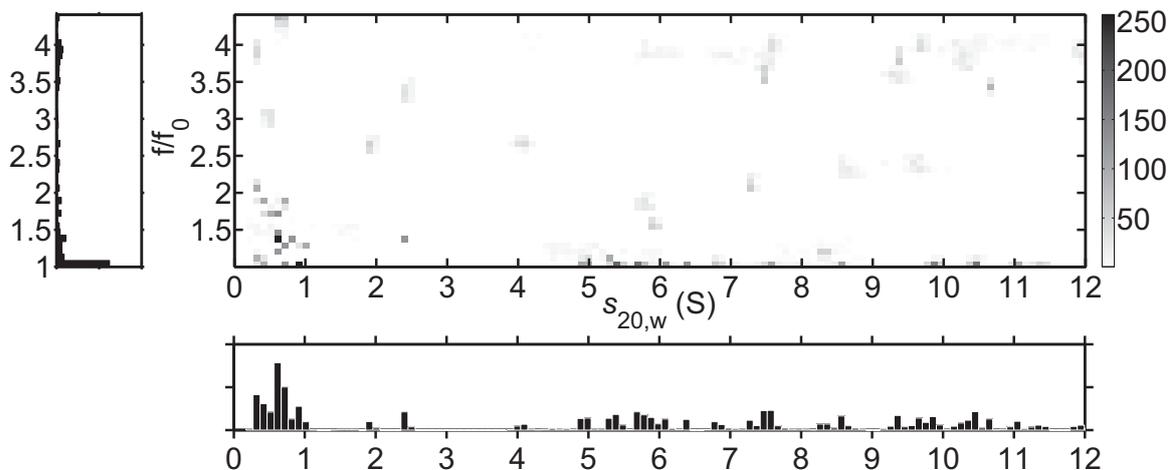


Abbildung 5.3.5: Zusammenfassung von 12 SV-Läufen nach GA-MC-Analyse mittels smoothhist2D-Funktion in MatLab. Es wurden SV-Läufe von 20 und 50 μ M A β 42 nach 3 h Inkubation bei 20 °C durchgeführt. Die Ergebnisse der GA-MC-Analyse nach 50 Iterationen je Datensatz wurden in einer $s_{20,w}$ gegen f/f_0 -Auftragung dargestellt, mit der Anzahl an Datenpunkten pro Bin in der dritten Dimension. Die Bingröße beträgt 0,1 S x 0,1 f/f_0 , die Histogramme links und unten summieren zeilenweise die Einträge auf.

zu erhalten. Die SV-Läufe wurden mittels GA-Analyse ausgewertet. Die anschließende Monte-Carlo-Analyse jedes Datensatzes lieferte 50 einzelne Verteilungen pro SV-Lauf. Diese wurden mittels der MatLab-Funktion `smoothhist2D` [36] als $s_{20,w}$ gegen f/f_0 dargestellt (siehe Abbildung 5.3.5). Da Messungen bei unterschiedlichen Konzentrationen und Rotorgeschwindigkeiten verwendet wurden, sind die aus den einzelnen GA-Analysen enthaltenen Anteilsangaben nicht vergleichbar. Für die Auftragung von $s_{20,w}$ gegen f/f_0 wurden daher alle Wertepaare gleichgewichtet. Über die Daten wurde ein Raster zum Binnen mit der Größe 215 x 40 gelegt. Dies entspricht einer Auflösung des $s_{20,w}$ -Wertes von 0,1 S, vergleichbar zur $c(s)$ -Verteilung, und des f/f_0 von 0,1. Alle Datenpunkte innerhalb eines Bins werden zusammengefasst und ihre Anzahl als dritte Dimension (Graustufe) wiedergegeben. Je dunkler ein Bin eingefärbt ist, desto mehr Datenpunkte aus verschiedenen Messungen treffen dort zusammen. Zusätzlich werden die Daten auf einem Histogramm separat für f/f_0 und $s_{20,w}$ zusammengefasst. Das $s_{20,w}$ -Histogramm kann mit der $c(s)$ -Darstellung verglichen werden. Das Maximum bei ca. 0,6 S kann dem monomeren A β 42 zugeordnet werden. Dessen f/f_0 ist an dem dunkelsten Bin mit mehr als 200 Datenpunkten bei etwa 1,5 abzulesen. Aufgrund der verschiedenen Laufbedingungen bei den verwendeten SV-Läufen ist die Streuung sowohl im s -Wert- als auch f/f_0 -Bereich größer als bei den Messungen aus der Konzentrationsreihe. Bei 2,4 S zeigt das $s_{20,w}$ -Histogramm ein Maximum, das im $s_{20,w}$ - f/f_0 -Diagramm einen korrespondierenden Bin in der Höhe von 1,3 f/f_0 aufweist. Dieser ist mit dem bereits detektierten 2,5-S-Oligomer vergleichbar. Entgegen der bisherigen Annahme deutet dies auf eine asymmetrischere Form des Oligomers hin. Anhand der Abbildung 5.3.4 kann für dieses Oligomer eine Größe von 5 bis 7 A β 42-Peptiden auf Basis eines f/f_0 zwischen 1,2 und 1,3 angenommen werden. Die Abbildung 5.3.5 zeigt weiterhin Oligomere zwischen 5 und 10 S. Deren f/f_0 -Werte liegen alle nahe 1. Für die bereits bestimmten Oligomere bei 4,7 und 6,25 S ist daher ein Formparameter von 1 gegenüber 1,2 zur Bestimmung der Peptidanzahl anzunehmen. Es würde sich demnach um Oligomere aus 10 bis 12 bzw. 16 bis 18 A β 42-Peptiden handeln. Die

Tabelle 5.4: Oligomere des A β 42 in NaP $_i$.

$s_{20,w}$	Zahl an A β 42-Peptiden
$2,56 \pm 0,32$ S	5 - 7
$4,70 \pm 0,27$ S	10 - 12
$6,35 \pm 0,28$ S	16 - 18
7,5 S	22
8,5 S	27
10 S	34

Bestimmung von distinkten Oligomeren in dem $s_{20,w}$ - f/f_0 -Diagramm ist schwierig. Es können Oligomere bei ca. 5 und ca. 6 S identifiziert werden, die den in der $c(s)$ -Verteilung identifizierten Oligomeren entsprechen könnten. Größere Oligomere bei 7,5 S (22mer), 8,5 S (27mer) und ca. 10 S (34mer) scheinen ebenfalls gebildet zu werden. Aufgrund der abnehmenden Anzahl an Datenpunkten in den entsprechenden Bins nimmt die Verlässlichkeit der Daten mit zunehmender Größe der Oligomere ab. Die Identifizierung von Oligomeren in vorinkubierten A β 42-Lösungen ist deutlich schwieriger als in Lösungen ohne Inkubation, da die Anzahl gebildeter Oligomere deutlich zunimmt. Diese Messungen können daher nur als Richtlinien verwendet werden und eignen sich weniger für detaillierte s -Wertbestimmungen. Aus zeitlichen Gründen konnten keine weiteren Daten erhoben werden, um diese Oligomere näher zu charakterisieren. Datenpunkte oberhalb eines f/f_0 von 3,5 liegen an der oberen Grenze des bei der Auswertung gewählten f/f_0 -Bereiches. Es handelt sich hierbei um mathematische Artefakte der Fitroutine und nicht um in der Lösung vorhandene Oligomere.

Zusammenfassend zeigten die Experimente die Bildung von verschiedenen A β 42-Oligomeren in Lösung (siehe Tabelle 5.4). Hierbei handelt es sich um das 5-7mer, 10-12mer und das 16-18mer. Weiterhin deuten die Messungen auf die Bildung von Oligomeren aus 22, 27 und 34 A β 42-Peptiden hin. Für die drei größten Aggregate kann aufgrund der geringen Datenmenge kein Fehler und daher kein Größenbereich angegeben werden.

5.4 Einfluss von Metallionen auf die Aggregation

Die Aggregation von A β 42 wurde bisher nur in dem Niedrigsalzpuffer NaP_i untersucht. Für das Verständnis der Aggregation in physiologischer Umgebung müssen die Einflüsse von höheren Konzentrationen an Salzen berücksichtigt werden. Daher wurde versucht, eine Pufferzusammensetzung zu wählen, die dem CSF möglichst ähnlich ist. Auf Phosphat/Hydrogenphosphat als Pufferkomponenten konnte nicht verzichtet werden, da das physiologische Carbonat-/Hydrogencarbonat-System ohne CO₂-Begasung pH-instabil ist. Die Zusammensetzung des verwendeten artifiziellen CSF (aCSF) ist in Tabelle 5.5 beschrieben. In ThT-Kinetiken von 20 μ M A β 42 gelöst in aCSF konnte über einen Zeitraum von 40 h kein Anstieg der Fluoreszenz gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Es konnte nicht geklärt werden, ob dieser Effekt auf einer Änderung der Aggregationsgeschwindigkeit des A β 42 oder einer geringeren Löslichkeit des A β 42 beruhte. Daher wurden ThT-Kinetiken in NaP_i unter Zusatz von nur einem der zweiwertigen Ionen durchgeführt. Zusätzlich wurde der Einfluss von Kupfer- und Zinkionen getestet. Für alle im folgenden Experiment verwendeten Ionen sind vielfältige Wechselwirkungen mit A β 42 beschrieben. Die in der Literatur beschriebenen Auswirkungen auf die A β 42-Aggregation sind meist abhängig von der verwendeten Konzentration bzw. dem eingesetzten A β 42-Metallionenverhältnis [37]. In dieser Arbeit wurden 40 μ M A β 42 eingesetzt. Es wurden physiologisch relevante Metallionenkonzentrationen getestet [38] (890 μ M Ca²⁺, 800 μ M Mg²⁺, 2 μ M Cu²⁺ und 0,5 μ M Zn²⁺). Die Metallionen wurden in Form ihrer Chloride im Puffer gelöst. Zusätzlich wurde in einem zweiten Experiment A β 42 in PBS und PBSCM gelöst, um die Auswirkung von Chloridionen auf die Aggregation zu untersuchen und eine Kombinationslösung mit Ca²⁺ und Mg²⁺ zu testen. Abbildung 5.4.1 zeigt die aufgenommenen ThT-Kinetiken bei 37 °C. Der Vergleich der halben Höhen der Kurven zeigt eine Beschleunigung der Aggregation durch Mg²⁺ und Ca²⁺ und eine Verlangsamung der Aggregation durch Cu²⁺ und Zn²⁺ gegenüber NaP_i. Um eine Änderung der Aggregationsgeschwindigkeit durch Cu²⁺ und Zn²⁺ zu bewirken, ist nur ein Vierhundertstel der Konzentration von Ca²⁺ oder Mg²⁺ nötig. Durch einen Einsatz von Kupfer- und Zinkionen im Überschuss zu A β 42 (8:1 bzw. 15:1) konnte die Aggregation vollständig inhibiert werden (Daten nicht gezeigt). Dies könnte auf die in der Literatur beschriebene Komplexbildung des A β 42 durch die beiden Metallionen hindeuten [7, 37]. Der Zusatz von Chloridionen beschleunigte ebenfalls die Aggregation gegenüber NaP_i. Die ThT-Kinetik in PBSCM wies keinen sigmoiden Verlauf auf. Die Bestimmung einer halbmaximalen Höhe war nicht möglich. Es war ein schwacher Anstieg des Fluoreszenzsignals über die Zeit messbar. Dies deutet entweder auf eine langsame Aggregation oder auf eine schlechte Löslichkeit des A β 42 hin. Aussagen über die Einflüsse der Salze auf die Aggregation des A β 42 in ihrer Kombination ist aus diesen Messungen nicht möglich. Liegt nur ein zweiwertiges Ion in Lösung vor, kann auf Basis der chaotropen Reihe dessen Einfluss auf die Aggregation vorausgesagt werden [39, 40]. Unterstützend wurden CD-Messungen von 37 μ M A β 42 gelöst in PBS bzw. PBSCM durchgeführt. Die zeitliche Sekundärstrukturänderung des A β 42 unter Inkubation bei 37 °C erfolgte schneller in PBS und PBSCM als in NaP_i. Abbildung 5.4.2 zeigt die zeitliche Änderung des CD-Signals bei 198 nm bzw. 217 nm. Die Zunahme des β -Faltblatt-Anteils erfolgte innerhalb von 2,5 h in PBS. In PBSCM lag das gesamte Material nahezu von Beginn an in β -Faltblatt-Struktur vor. In NaP_i dauerte die Umwandlung im Ver-

Tabelle 5.5: Zusammensetzung des verwendeten aCSF nach www.alzet.com

Na ⁺ (aq)	150 mM
K ⁺ (aq)	3 mM
Ca ²⁺ (aq)	1,4 mM
Mg ²⁺ (aq)	0,8 mM
PO ₄ ³⁻ (aq)	1 mM
Cl ⁻ (aq)	155 mM

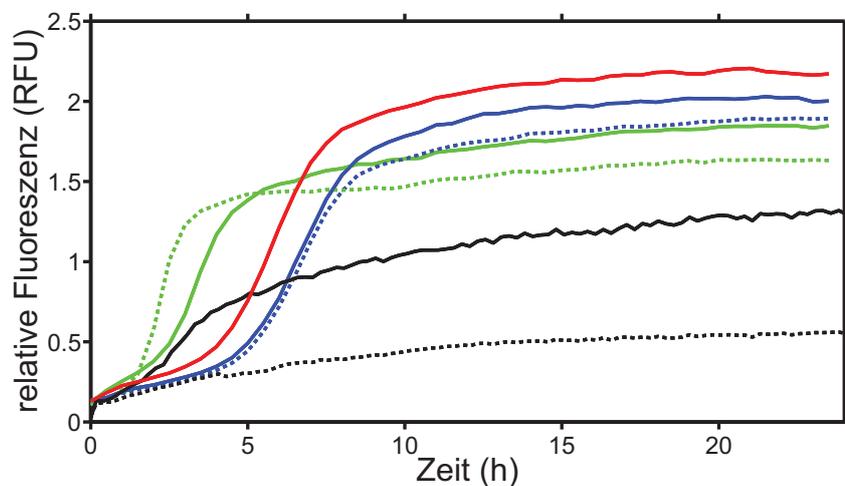


Abbildung 5.4.1: ThT-Kinetiken von $40 \mu\text{M}$ $\text{A}\beta_{42}$ unter Zusatz verschiedener Metallionen. $\text{A}\beta_{42}$ wurde in NaP_i (-) und in NaP_i unter Zugabe von Ca^{2+} (-), Mg^{2+} (- -), Cu^{2+} (- -) und Zn^{2+} (-) -Ionen gelöst. In einer separaten Messung wurde $\text{A}\beta_{42}$ in PBS (-) und PBSCM (- -) gelöst. Die Messungen erfolgten bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

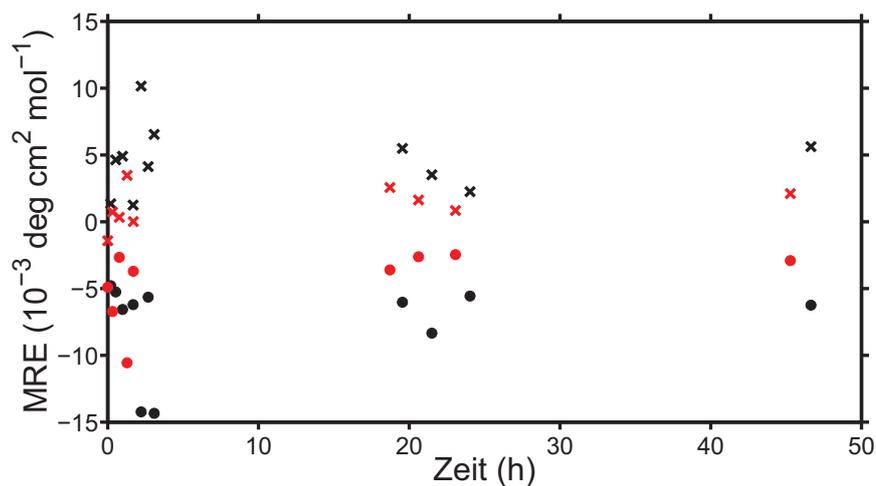


Abbildung 5.4.2: Zeitliche Änderung des CD-Signals von $37 \mu\text{M}$ $\text{A}\beta_{42}$ gelöst in PBS (schwarz) bzw. PBSCM (rot). Dargestellt ist das CD-Signal bei 195 (Kreuz) und 217 nm (Punkt) gegen die Zeit für jeden der beiden Puffer. Die $\text{A}\beta_{42}$ -Lösungen wurden bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert.

gleich dazu 4 h (siehe Abbildung 5.1.2). Es ist möglich, dass die schnelle Aggregation in PBSCM zur Bildung großer A β 42-Aggregate führt, die aus dem Strahlengang absinken. Dies würde das im Vergleich zum PBS aufgenommene niedrigere CD-Signal zu jedem Messzeitpunkt erklären. Das Absinken von A β 42-Aggregaten stellt in der ThT-Messung ebenfalls ein Problem dar, da nur Material im Laserfokus detektiert werden kann. Es sind weitere Experimente nötig, um zu klären, ob die Aggregation des A β 42 in aCSF durch die vorliegenden Salze stark verlangsamt wird oder gebildete Aggregate zu schnell zu Boden sinken, um detektiert werden zu können.

5.5 Einfluss von Proteinen auf die Aggregation

Zu den Interaktionspartnern von A β 42 gehören nicht nur Salze, sondern auch in CSF vorliegende Proteine. Um A β 42-Proteinwechselwirkungen zu untersuchen, wurden zwei Proteine ausgewählt, von denen Wechselwirkungen mit A β 42 beschrieben wurden. Das HSA stellt den Hauptbestandteil in CSF und Blut dar. Es dient im Organismus unter anderem als Transportprotein und kann aufgrund seiner geringen Bindungsspezifität als Wechselwirkungspartner für A β 42 eine Rolle spielen [8]. ApoE ist ein Lipoprotein, das in mehreren Isoformen auftreten kann. Es spielt eine essenzielle Rolle in der Verstoffwechslung triglyzeridreicher Lipoproteinbestandteile und ist unter anderem an der Bindung an „low density lipoprotein“-Rezeptoren beteiligt. Die Isoform ApoE4 ist ein Risikofaktor für eine Ausprägung der Alzheimerschen Demenz. Wechselwirkungen zwischen ApoE und A β sind in der Literatur beschrieben [41, 42]. In dieser Arbeit wurde die am häufigsten vorkommende Isoform, das ApoE3, als Wechselwirkungspartner von A β 42 untersucht. Es wurden ThT-Kinetiken von 20 μ M in NaP $_i$ unter Zusatz von 3 μ M HSA bzw. 0,3 μ M ApoE3 bei 37 °C durchgeführt. Die verwendeten Konzentrationen an HSA und ApoE3 beruhen auf physiologisch relevanten Mengen [8, 43]. Abbildung 5.5.1 zeigt die ThT-Kinetiken. Im Vergleich zur NaP $_i$ -Kontrolle verlangsamten die zugesetzten Proteine die Aggregation. Dieser Effekt war am stärksten beim ApoE3 ausgeprägt. Erste AUZ-Messungen zur Detektion von A β 42-HSA- bzw. A β 42-ApoE3-Komplexen wurden durchgeführt, lieferten allerdings keine Ergebnisse. Für den Nachweis von Komplexen sind weitere AUZ-Messungen unter Verwendung der selektiven Fluoreszenzmarkierung eines der beiden Komplexbildungspartner nötig.

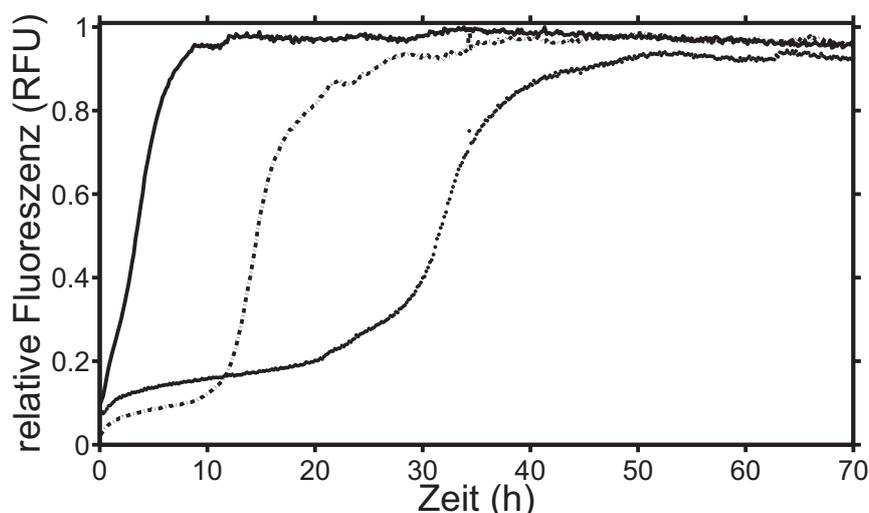


Abbildung 5.5.1: ThT-Kinetik von 20 μ M A β 42 unter Zusatz von HSA und ApoE3. Gezeigt ist die NaP $_i$ -Kontrolle (-), die Probe unter Zusatz von 3 μ M HSA (·) und 0,3 μ M ApoE3 (---). Die Kurven wurden normiert.

6 AUZ mit Fluoreszenzdetektionssystem

Als neues Detektionssystem für die AUZ wurde das FDS von AVIV angeschafft. Dies ermöglicht die Detektion von fluoreszierenden Partikeln während der Zentrifugation. Im Bereich der Proteinanalytik stellt die FDS einen deutlichen Fortschritt gegenüber der Absorptionsoptik dar. Die meisten Proteine weisen ein Absorptionsspektrum mit vergleichbaren Maxima hinsichtlich der Absorptionswellenlänge auf. Eine Unterscheidung mehrerer Proteine in einer Mischung kann daher nur erfolgen, wenn die s -Werte der einzelnen Proteine bekannt sind. Deutlich schwieriger wird dies bereits, wenn Lösungsmittel verwendet werden, die ebenfalls im gleichen Wellenlängenbereich absorbieren. Dies hat vor allem Bedeutung bei Arbeiten mit humanen, tierischen oder pflanzlichen Extrakten, deren Absorptionsspektren in der Regel sehr breit sind. Ein zugegebenes Zielprotein kann über Absorptionsdetektion nur schwierig detektiert werden. Durch Markierung des Zielproteins mit einem Fluoreszenzfarbstoff ist eine selektive Detektion mittels FDS möglich. Die meisten Lösungsmittel weisen außerdem meist nur eine geringe Eigenfluoreszenz auf [44]. Weiterhin weist das FDS eine höhere Sensitivität und Spezifität als die Absorptionsoptik auf. Dadurch ist eine Reduktion der Konzentration des verwendeten Zielproteins gegenüber der Absorptionsmessung möglich. Weiterhin ist eine Bestimmung von Bindungskonstanten im pikomolaren Konzentrationsbereich möglich [45]. In diesem Kapitel sollen die Besonderheiten bei der Bedienung des FDS für AUZ-Messungen vorgestellt werden. Außerdem wird der Frage nach möglichen Fluoreszenzmarkierungen des A β 42 nachgegangen sowie der Frage nach dem Nutzen des FDS für die Detektion von A β 42-Oligomeren.

6.1 Die Bedienung des FDS

Der prinzipielle Aufbau des FDS ist in 3.2 beschrieben. Bei der Bedienung der UZ mit dem FDS ist auf folgende Punkte zu achten. Für das FDS wird eine Counterbalance zur Kalibration verwendet, die mit 100 nM FITC in 10 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan-HCl-Puffer pH 8,0 plus 100 mM Kochsalz gefüllt ist. Die Lösung sollte zweimal pro Jahr erneuert werden oder wenn der benötigte Gain zur Detektion 70 % überschreitet. Derzeit wird die Betriebssoftware AOS 2 des Herstellers AVIV verwendet. Im Gegensatz zur Betriebssoftware von Beckman Coulter für die Absorptionsoptik kann diese alle Funktionen der Zentrifuge steuern (inklusive Temperatur und Vakuumpumpe). Beim Start der Software werden bereits alle Parameter der Maschine übernommen und die Einstellungen des letzten verwendeten Laufes geladen. Alle Einstellungen, die direkt an der UZ vorgenommen wurden, werden dabei überschrieben (z. B. Temperatur). Weiterhin sollte auf die angezeigten Vakuumwerte (Druck in der Rotorkammer) in der AOS geachtet werden. Die Software berechnet den angegebenen Rotorkammerdruck (Angabe in Micron) aus der Spannung an der Vakuumpumpe über eine Funktion mit vier Parametern. Sind diese nicht korrekt, kann es zu Abweichungen von der Anzeige an der UZ kommen. Um eine reibungslose Funktion zu gewährleisten, sollten beide Werte möglichst übereinstimmen. Auf jeden Fall ist sicherzustellen, dass die korrekten Werte unterhalb von 200 Micron angezeigt werden, da dort der Laser eingeschaltet wird und alle Läufe durchgeführt werden. Der Laser wird ab einem Vakuumwert unterhalb von 175 Micron eingeschaltet und benötigt eine Aufwärmphase von ca. 5 min, bevor dieser verwendet werden kann. Bevor eine Messung gestartet werden kann, muss daher unter Umständen nicht nur auf ein ausreichend hohes Vakuum, sondern auch auf den Laser gewartet werden. Ist der Laser aufgewärmt, können bei 3.000 rpm radiale Kalibration und Einstellung der Fokushöhe im „Fluorescence focusing tool“ erfolgen. Die radiale

Kalibration sollte unter den optimalen Einstellungen an Fokushöhe und Signalverstärkungsfaktor (Gain) auf der Counterbalance erfolgen. Für die anschließende Messung muss die Fokushöhe auf die Messzelle angepasst werden. Für Mittelstücke der Schichtdicke 3 mm lag diese etwa bei 2.500 μm , bei 12 mm bei etwa 3.400 μm (siehe hierzu 6.2). Die Verwendung von Messzellen mit verschiedenen Schichtdicken in einem Lauf ist nicht möglich, da die Fokushöhe nur global definiert werden kann. Nach Abschluss der Fokushöheneinstellung ist erneut der verwendete Gain auf der Counterbalance zu prüfen. Dieser muss so gewählt werden, dass das Signal zwischen 500 und 3.000 RFU liegt. Andernfalls kann die Software nicht die Position der Messzellen im Rotor bestimmen. Der sogenannte „magnet angle“ wird nicht gefunden. Im Anschluss kann die Gaineinstellung für alle zu messenden Zellen erfolgen. Je geringer die Fluoreszenzintensität der Probenlösung, desto höher muss der Gain gewählt werden. Es kann derzeit nur ein Gain pro Zelle gewählt werden. Soll eine Zelle bei mehreren Gains vermessen werden, muss die Option „all cells at all gains“ aktiviert werden. Für jeden Gainwert werden dann separat alle Messungen über jede Zelle abgespeichert. Dies kann sinnvoll sein, wenn in den Zweisektormittelstücken zwei Proben verschiedener Fluoreszenzintensität vermessen werden sollen. Es ist zu beachten, dass der zeitliche Abstand zwischen zwei Scans des gleichen Gains größer wird, je mehr Gains für eine Messung verwendet werden. Grundsätzlich können beide Sektoren mit Probe gefüllt werden, da im Gegensatz zur Absorptionsoptik keine Referenz benötigt wird. Dies erhöht den Probendurchsatz in einem 8-Loch-Rotor auf 14 Proben pro Lauf. Der Wert des Gains wird in der Software in Prozent der maximal möglichen Detektorspannung angegeben. Diese überdeckt einen Bereich von 0 bis 1.000 V. Die Spannung wird durch einen 12-Bit-A/D-Wandler in digitale Zahlen zwischen 0 und 4.095 umgewandelt. Diese Spannungsangabe ist in jeder Scandatei im Header unter der Angabe „Voltage“ zu finden. Die prozentualen Angaben werden derzeit nur im AOS verwendet. Zusätzlich zum Gain verfügt die Software über die Option eines programmierbaren Gainverstärkers (PGA). Dieser ermöglicht eine Verstärkung des Signals in vier Stufen. Durch die Anpassung von Gain und PGA kann das optimale Signal-/Rausch-Verhältnis für jede Messzelle eingestellt werden. Für alle durchgeführten Fluoreszenzmessungen in dieser Arbeit hat es sich als günstig erwiesen, den PGA auf 1 zu belassen und nur den Gain einzustellen. Für alle Messungen wurde der Gain so gewählt, dass ein Signal zwischen 2.000 und 3.500 RFU erhalten wurde. Eine Variation der radialen Auflösung eines Scans und der Anzahl an Rotorumdrehungen, die je Datenpunkt gemittelt werden, ist in der aktuellen Version des AOS nicht möglich. Daten können mit einer radialen Auflösung von 20 μm aufgenommen werden und jeder Datenpunkt ist der Mittelwert aus fünf Rotorumdrehungen.

6.2 Die Wahl der Schichtdicke des Mittelstückes

Für Messungen in der Absorptionsoptik richtet sich die Auswahl der Schichtdicke des Mittelstückes nach der Konzentration der Probe. Dem Lambert-Beerschen Gesetz folgend kann eine niedrige Konzentration durch eine größere Schichtdicke ausgeglichen werden, um höhere Absorptionswerte bei gleicher Wellenlänge zu erzielen. Das eingestrahelte Licht passiert die Messzelle, bevor der nicht absorbierte Anteil auf den Detektor trifft. Bei der Fluoreszenzmessung erfolgt die Detektion des von der Probe emittierten Lichtes. Dieses wird in 0° zum eingestrahelten Laserlicht detektiert. Um ein möglichst hohes Fluoreszenzsignal am Detektor zu erhalten, muss der Laserfokus innerhalb der Probe liegen. Je tiefer dieser in der Probe ist, desto stärker werden Effekte die das Anregungslicht und das Emissionslicht abschwächen (Quenchingeffekte, „inner filter effect“). Daher sollte der Laserfokus knapp unterhalb des oberen Fensters der Messzelle liegen. Die gesamte Schichtdicke der Messzelle wird nicht ausgenutzt. Die Verwendung von 3-mm-Mittelstücken ist ausreichend und bietet außerdem den Vorteil eines geringeren Probenverbrauchs (100 μL) gegenüber den 12-mm-Mittelstücken (400 μL). Es muss allerdings auf die Position des Mittelstückes innerhalb der Messzelle geachtet werden. Der Laserfokus des FDS kann nur über eine begrenzte Höhe verstellt werden. Daher ist die Verwendung von Gehäusen mit angehobenem

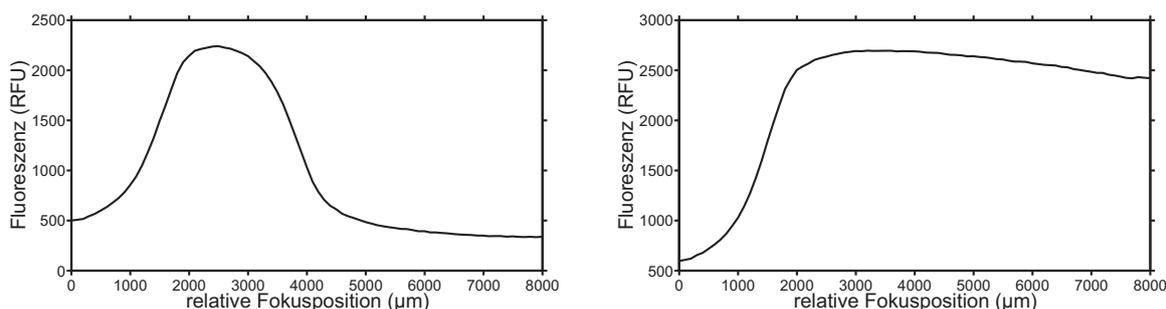


Abbildung 6.2.1: Fokusscan mit dem FDS durch eine Messzelle mit 3 bzw. 12 mm Schichtdicke. Es wurde die Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Fokushöhe für eine Messzelle mit einem 3-mm-Mittelstück (links) und einem 12-mm-Mittelstück (rechts) aufgenommen. Die Sektoren wurden mit Fluoresceinlösung gefüllt.

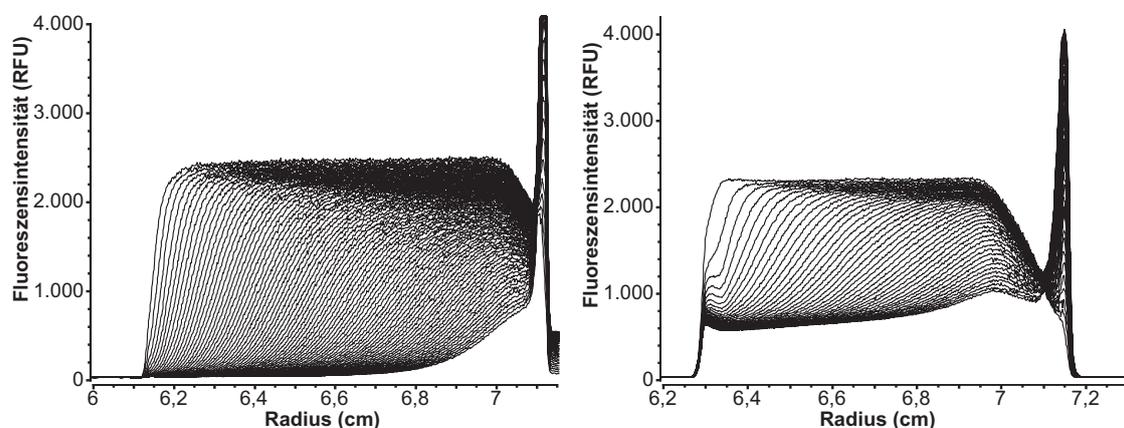


Abbildung 6.2.2: Sedimentationsprofile nach SV-Läufen in der AUZ, detektiert mittels FDS. Gezeigt sind typische Sedimentationsprofile, die in Messzellen mit Mittelstückchen der Schichtdicke 3 mm (links) und 12 mm (rechts) aufgenommen wurden. Im Bereich des Messzellenbodens zeigt das Profil des 12-mm-Mittelstückes eine deutlich stärkere Abschattung des Laserlichtes.

Zellenboden nötig. Dies stellt sicher, dass das obere Fenster der Messzelle mit 3-mm-Mittelstück an vergleichbarer Position zu dem oberen Fenster einer Messzelle mit 12-mm-Mittelstück ist. Abbildung 6.2.1 zeigt den Fokusscan durch eine Messzelle mit 3-mm- und 12-mm-Mittelstück. Das Intensitätsmaximum der Kurve stellt die optimale Position des Fokus dar. Für Mittelstücke der Schichtdicke 3 mm lag dies bei ca. 2.500 μm und für Mittelstücke der Schichtdicke 12 mm bei ca. 3.400 μm . In Abbildung 6.2.2 sind typische Sedimentationsprofile für Messungen in beiden Mittelstücktypen dargestellt. Der Meniskus ist im Gegensatz zu einer Absorptionsmessung nicht durch einen Brechungseffekt erkennbar. Die Meniskusposition ist im Bereich des ersten steilen Anstiegs der Sedimentationsgrenzschichten zu suchen. Um die Meniskusposition zu bestimmen, wurden im Anschluss an einen SV-Lauf mit dem FDS drei Scans mit der Absorptionsoptik unter gleichen Bedingungen durchgeführt, um dort diese zu bestimmen. Ist die Fokusposition richtig eingestellt, unterschieden sich die aufgenommenen Sedimentationsprofile kaum von der einer typischen Absorptionsmessung. Den Einfluss der Fokusposition ist in Bodennähe zu beobachten. Der Zellenboden liegt bei 7,14 cm. In beiden Fällen nimmt das Messsignal bereits vorher ab. Die konfokale Optik des FDS bedingt einen kegelförmigen Strahlengang des Laserlichtes zwischen der Fokallinse und dem Fokus in der Lösung. Je näher dieser Kegel dem Boden kommt, desto mehr Laserlicht trifft auf das Mittelstück und wird reflektiert und gelangt nicht mehr in die Lösung. Aufgrund der tieferen Fokusposition im 12-mm-Mittelstück nimmt das Signal bereits ab

einer radialen Position von 6,9 cm ab. Die Verwendung eines 3-mm-Mittelstückes gewährleistet hier eine längere Messstrecke. In Sedfit kann diese Signalabnahme prinzipiell angefitet werden [46]. Dies ist allerdings nur möglich, solange sich diese Änderung in allen Scans gleichermaßen beschreiben lässt. Für die Auswertung wurde daher auf diesen zusätzlichen Parameter verzichtet und stattdessen der Auswertungsbereich eingegrenzt, um diesen Bodeneffekt auszuschließen. Durch die Verwendung von den 3-mm-Messzellen tritt dieser Effekt nur auf den letzten 0,14 cm auf und verkürzt die auswertbare Trennstrecke nur geringfügig. Eine Verwendung von Messzellen mit 3-mm-Mittelstücken ist im FDS zu bevorzugen.

6.3 Die Fluoreszenzmarkierung

Um Partikel mittels FDS zu detektieren, müssen diese bei einer Wellenlänge von 488 nm anregbar sein und oberhalb von 505 nm emittieren. Fluoreszieren die Partikel nicht von allein, stehen grundsätzlich zwei Möglichkeiten zur Verfügung. Entweder wird ein Fluoreszenzfarbstoff kovalent mit dem Partikel verknüpft oder der Fluoreszenzfarbstoff kann der Partikellösung zugesetzt werden und bindet nicht kovalent an diese. Dieser Abschnitt beschäftigt sich mit der geeignetsten Markierungsmethode des A β 42 für die Untersuchung der Aggregation.

6.3.1 Nicht kovalente Fluoreszenzmarkierung

Das Prinzip der Verwendung von nicht kovalenten Fluoreszenzfarbstoffen wird im ThT-Assay bereits genutzt. Das ThT bindet unter einem fluoreszenzverstärkenden Effekt an β -Faltblatt-reiche Strukturen. Aufgrund des Emissions- und Exzitationsspektrums kann ThT nicht mit dem FDS verwendet werden. Ein Fluoreszenzfarbstoff mit ähnlichen Eigenschaften ist das DCVJ [47, 44]. Durch Bindung an amyloide Strukturen wird die freie Rotation innerhalb des Moleküls eingeschränkt und es kommt zur Fluoreszenzverstärkung. Die Löslichkeit von DCVJ in wässrigen Lösungen ist deutlich geringer als die von ThT. Die Stammlösungen von 1 mg/mL enthält daher 50 % Ethanol. Das Exzitationsspektrum von 400 μ M DCVJ weist zwei Maxima bei 455 und 485 nm auf. Das Emissionsmaximum liegt bei 508 nm (Abbildung 6.3.1 links). Die Spektren von DCVJ nach der Zugabe zu vorinkubiertem A β 42 (20 μ M über 7 d bei 37 °C) mit einer Endkonzentration von 20 μ M zeigt Abbildung 6.3.1 rechts. Das Exzitationsspektrum zeigt wie zuvor Maxima an den gleichen Wellenlängen. Das Maximum im Emissionsspektrum ist zu 500 nm verschoben. Das Fluoreszenzsignal ist in beiden Spektren mindestens um den Faktor 10 stärker als bei der Messung des freien DCVJ, da nur ein Zwanzigstel der zuvor verwendeten Konzentration in der A β 42-Lösung enthalten ist. Auch wenn das Emissionsmaximum des gebundenen DCVJ unterhalb des Cutoff des FDS liegt, kann der Farbstoff aufgrund des breiten Spektrums verwendet werden. Damit erfüllt das DCVJ die grundlegenden Anforderungen an einen Fluoreszenzfarbstoff für die Detektion mit dem FDS. Außerdem konnte bereits die Bindung an vorinkubiertes A β 42 gezeigt werden. Um die Anwendung des DCVJ als Marker für die Aggregation zu prüfen, wurde eine Messung analog zur Methode der ThT-Kinetik durchgeführt. Zwanzig μ M A β 42 wurden unter Zugabe von DCVJ inkubiert und das Signal im Tekan über die Zeit aufgenommen. Es wurde bei 488 nm angeregt und bei 505 nm detektiert. Die Bandbreite betrug 5 nm. Zur Einstellung des Gains am Tekan und als Kontrolle wurde bereits vorinkubiertes A β 42 mit DCVJ versetzt. Abbildung 6.3.2 zeigt die resultierenden Kurvenverläufe. Der Fluoreszenzsprung resultiert aus

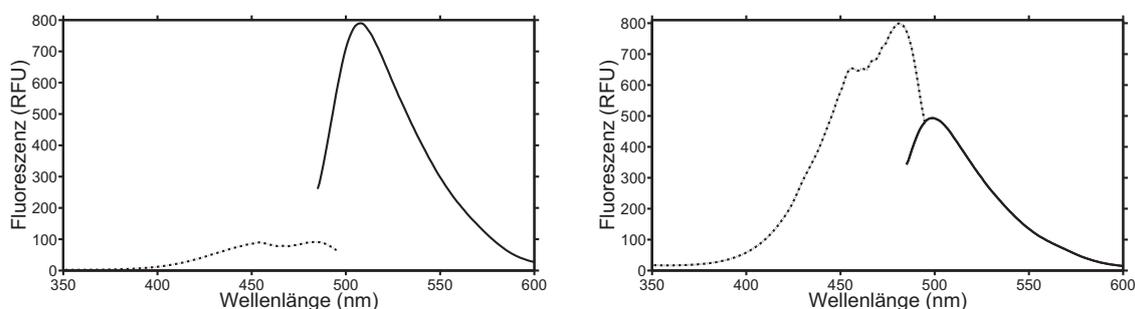


Abbildung 6.3.1: Exzitations- und Emissionsspektren von DCVJ in freiem und gebundenem Zustand. Gezeigt sind die Exzitations- (---) und Emissionsspektren (-) von 400 μ M DCVJ frei in Lösung (links) und 20 μ M DCVJ in Anwesenheit von A β 42 (rechts). Das A β 42 wurde in einer Konzentration von 20 μ M für 7 d bei 37 °C vorinkubiert. Die Exzitation wurde bei 505 nm detektiert und für die Emission erfolgte die Anregung bei 488 nm.

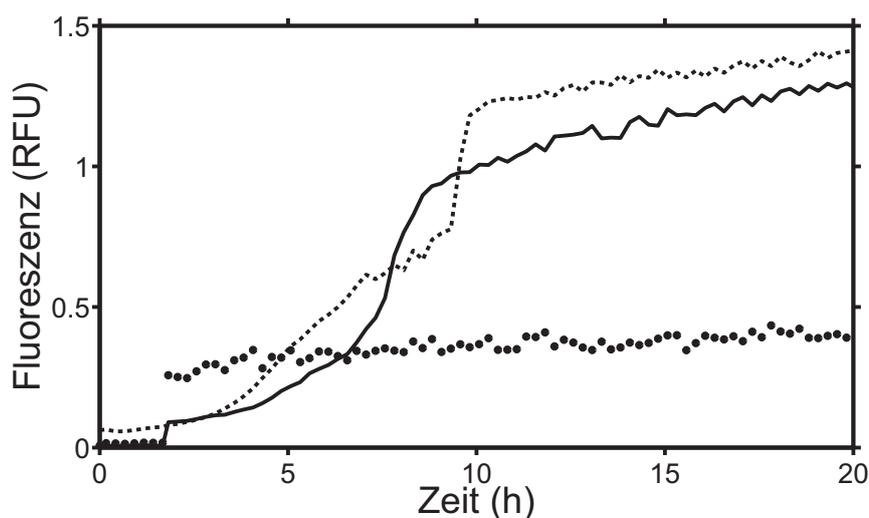


Abbildung 6.3.2: DCVJ-Kinetik von 20 μM $\text{A}\beta\text{42}$ bei 37 °C. Das vorinkubierte $\text{A}\beta\text{42}$ (●) diente zur Kontrolle des Gains am Tekan. Der Sprung in der Fluoreszenz zeigt eine Nacheinstellung des Gains. Monomeres $\text{A}\beta\text{42}$ (-) wurde analog der Durchführung einer ThT-Kinetik mit 20 μM DCVJ als Fluoreszenzmarker vermessen. Das Fluoreszenzsignal zeigt wie bei der ThT-Kontrolle (- -) einen Anstieg über die Zeit. Die Plateaus beider Messungen laufen nach 10 h parallel zueinander.

einer Gainänderung, da in der Kontrolle das Signal zu niedrig war. Die Fluoreszenzänderung des aggregierenden $\text{A}\beta\text{42}$ entspricht einer sigmoiden Kurve mit einer halbmaximalen Höhe von ca. 7 h. Die Messung ist vergleichbar mit der mitgeführten ThT-Kinetik. Das Fluoreszenzsignal nimmt über die Zeit zu und die Plateaus in der DCVJ- und ThT-Messung laufen parallel. Die Messung zeigte, dass mit DCVJ die fortschreitende $\text{A}\beta\text{42}$ -Aggregation nachgewiesen werden kann. Das Signal des vorinkubierten $\text{A}\beta\text{42}$ ist niedriger als das Plateau der aggregierenden Probe. Dies resultiert aus dem Absinken der großen Aggregate aus dem Fokus der Optik und einer damit einhergehenden erniedrigten Konzentration an löslichem Material. Dass die ThT-Kinetik keinen eindeutig sigmoiden Kurvenverlauf lieferte, könnte auf ein Absinken von Material aus dem Laserfokus oder das Vorhandensein einer Luftblase hindeuten. Um zu klären, an welche Oligomere des $\text{A}\beta\text{42}$ das DCVJ bindet, wurde ein SV-Lauf unter Verwendung des FDS durchgeführt. Zwanzig μM $\text{A}\beta\text{42}$ wurden für 3 h bei 20 °C inkubiert. Vor dem SV-Lauf wurden 15 μM DCVJ zur Lösung gegeben. Außerdem wurde eine $\text{A}\beta\text{42}$ -Probe ohne vorherige Inkubation untersucht. Bereits anhand der Sedimentationsprofile ist der größte Vorteil der Markierung mit DCVJ erkennbar. Der SV-Läufe wurden bei 50.000 rpm und 20 °C durchgeführt. Der Nachweis von Oligomeren erfolgte bisher immer in Gegenwart einer großen Menge an monomerem $\text{A}\beta\text{42}$. Dieses erschwert mit seinem kleinen s -Wert die Auswertung, da zu keinem Zeitpunkt der Sedimentation radiale Bereiche in der Messzelle frei vom Monomer sind. Die Bestimmung der Baseline ist daher schwierig. Dieses Baseline-Dekonvolutionsproblem wird durch die Software mathematisch mit dem Fit einer kleinen Komponente mit hohem f/f_0 gelöst (siehe 4.1). Da DCVJ nicht an Monomere bindet, werden nur die Oligomere detektiert. Außerdem ist der Anteil an emittiertem Licht durch freies DCVJ gegenüber dem gebundenen deutlich geringer. Daher geht das Signal des freien DCVJ im Rauschen unter. Die Bestimmung der Baseline ist deutlich besser. Abbildung 6.3.3 zeigt ein typisches Sedimentationsprofil von $\text{A}\beta\text{42}$ aufgenommen mit der Absorptionsoptik und dem FDS nach DCVJ-Zugabe im Vergleich. In der FDS-Messung wird deutlich eine Baseline erreicht. Das Vorhandensein von Monomeren zeigt sich in den Scans der Absorption durch die zunehmende Einstellung eines Gleichgewichtsprofils und der starken Rückdiffusion gekennzeichnet durch den gemeinsamen Schnittpunkt der Kurven bei 6,95 cm. Dies fehlt in der FDS-Messung.

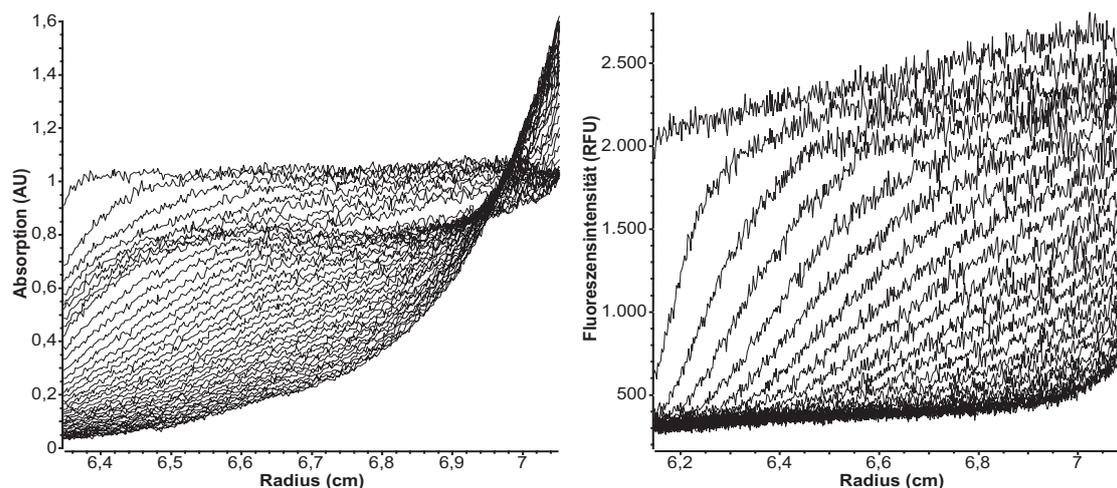


Abbildung 6.3.3: Typisches Sedimentationsprofil von A β 42 mit und ohne Detektion des Monomers bei 50.000 rpm. Die Abbildung links zeigt eine typische Absorptionsmessung von A β 42. Die frühen Scans sind durch die Sedimentation großer Partikel gekennzeichnet und die späten durch die des Monomers. Das Monomer ist die Ursache für die sichtbare Rückdiffusion mit dem Schnittpunkt der Scans bei 6,95 cm. Die rechte Abbildung zeigt die FDS-Messung nach Zugabe von DCVJ. Da das Monomer nicht gebunden wird, zeigt das Profil keine Rückdiffusion kleiner Partikel.

Die Auswertung der SV-Läufe des A β 42 mittels FDS zeigt unabhängig von der Inkubationszeit das Vorhandensein von Oligomeren oberhalb von 5 S. Kleinere Oligomere sowie das Monomer konnten nicht detektiert werden. Abbildung 6.3.4 zeigt exemplarisch die GA-Analyse der nicht inkubierten A β 42-Probe. Oligomere sind bei 5,6 S, 7,7 S, 10,3 S, 16,7 S, 24 S und 42 S in der Probe vorhanden. Alle Oligomere zwischen 5 und 10 S weisen ein f/f_0 nahe eins auf. Die drei kleinsten Oligomere können den bereits mit der Absorptionsoptik bestimmten Oligomeren zugeordnet werden (siehe 5.3). Da keine Aussage über die Zahl an angelagerten DCVJ-Molekülen pro Oligomer möglich ist, kann für die Massenzunahme der Oligomere durch die DCVJ-Bindung keine gesicherte Abschätzung erfolgen. Der s -Wertunterschied zwischen FDS- und Absorptionsmessung könnte auf die Bindung des DCVJ zurückgeführt werden. Eine Korrektur der Dichte und Viskosität auf das aus dem DCVJ-Stock stammende restliche Ethanol wurde nicht durchgeführt. Der verbleibende Anteil in der Probe ist kleiner als 2 % und wurde vernachlässigt. Die SV-Läufe bestätigen zwar die bisherigen Untersuchungen, zeigen allerdings auch, dass die Bindung von DCVJ an A β 42 eine minimale Größe der Oligomere voraussetzt. Um Informationen über die früh gebildeten Oligomere in der Aggregation des A β 42 zu erhalten, ist dieser Farbstoff nicht geeignet. Problematisch ist auch die Bestimmung der Anzahl an bindenden DCVJ-Molekülen je Oligomer. Mit zunehmender Oligomergröße ist auch eine höhere Zahl an bindendem DCVJ zu erwarten. Dies erschwert die Bestimmung der Anzahl an A β 42-Peptiden pro Oligomer. Weitere Messungen wurden daher mit diesem Fluoreszenzfarbstoff nicht durchgeführt.

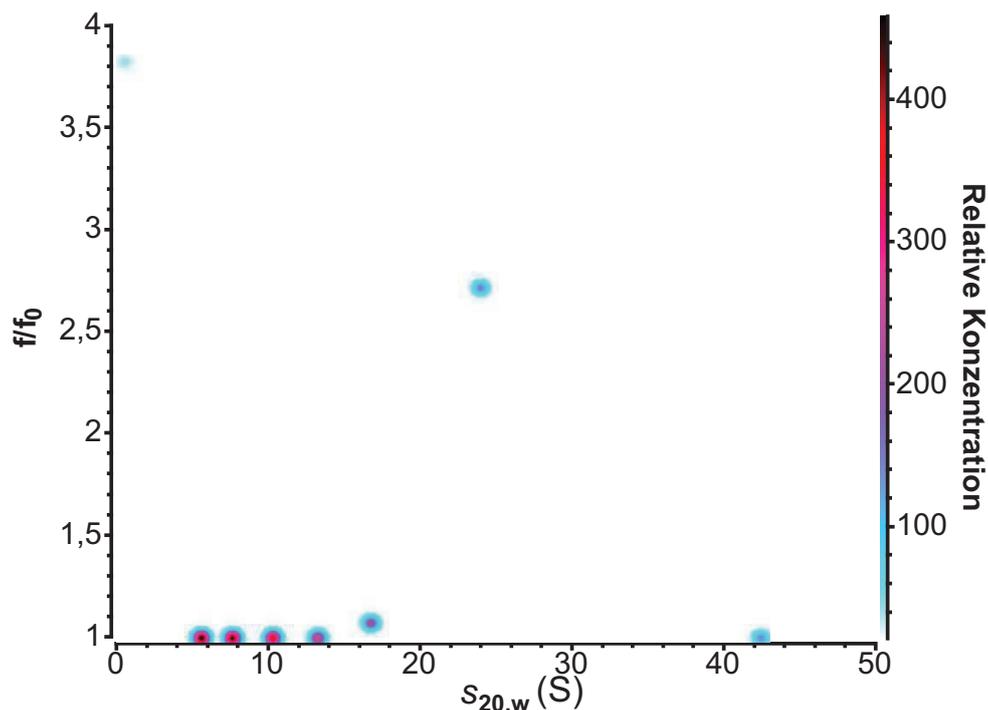


Abbildung 6.3.4: GA-Analyse des SV-Laufes mittels FDS von 20 µM A β 42 markiert mit DCVJ. Das A β 42 wurde ohne vorherige Inkubation bei 20 °C vermessen. Vor der AUZ-Messung wurden der Probe 15 µM DCVJ zugesetzt. Der SV-Lauf wurde bei 50.000 rpm und 20 °C durchgeführt.

6.3.2 Kovalente Fluoreszenzmarkierung

Die Auswahl eines Fluoreszenzfarbstoffes zur kovalenten Verknüpfung mit A β 42 richtet sich nach verschiedenen Gesichtspunkten. Dieser muss ein passendes Emissions- und Exzitationspektrum für die Messung mit dem FDS besitzen. Bei A β 42 handelt es sich um ein kleines Protein von nur 4,5 kDa. Der Fluoreszenzfarbstoff sollte daher möglichst klein sein, um Wechselwirkungen mit dem A β 42 zu vermeiden und keinen Einfluss auf die Aggregation des A β 42 zu haben. Unter diesen Gesichtspunkten eignen sich am ehesten Fluoreszenzfarbstoffe mit einem Fluoresceingrundgerüst. Im Rahmen dieser Arbeit wurden FITC, OregonGreen488 und AlexaFluor488 in Betracht gezogen. Diese unterscheiden sich zum Teil erheblich in ihren photophysikalischen Eigenschaften. Der Extinktionskoeffizient von FITC ist mit $67.000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ bei pH 7 niedriger als der von OregonGreen488 ($68.000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) oder AlexaFluor488 ($72.000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Vom Anregungslicht wird am wenigsten durch das FITC absorbiert. Aber auch die Quantenausbeute, das Verhältnis von absorbierten zu emittierten Photonen, ist mit 0,71 beim FITC am geringsten. Für OregonGreen488 und AlexaFluor488 liegt diese bei etwa 0,92 [48, 49]. FITC weist außerdem die geringste Photostabilität und die höchste pH-Sensibilität der drei Fluoreszenzfarbstoffe auf. Für die Auswahl des richtigen Fluoreszenzfarbstoffes ist außerdem entscheidend, dass die Löslichkeit des A β 42 nicht herabgesetzt wird. Ein hydrophiler Fluoreszenzfarbstoff ist zu bevorzugen. Die größte Hydrophilität besitzt das AlexaFluor488 aufgrund der enthaltenen Sulfonsäure- und Aminogruppen. Auf dieser Basis ist das AlexaFluor488 die beste Wahl. Allerdings sind die Kosten für diesen um den Faktor 10 höher als beim FITC. Aus Kostengründen wurde trotz der schlechteren photophysikalischen Eigenschaften FITC-markiertes A β 42 für den Großteil der Versuche verwendet. OregonGreen488-markiertes A β 42 wurde nicht für Aggregationsstudien eingesetzt, da das verwendete Ausgangsmaterial in massenspektrometrischen Untersuchungen keine ausreichende Reinheit aufwies (Daten nicht gezeigt). Das AlexaFluor488-markierte A β 42 wurde erst zu einem späteren Zeitpunkt erworben, daher konnten aus Zeitgründen nur wenige Mes-

sungen durchgeführt werden. Die Fluoreszenzmarkierung des A β 42 erfolgt unter Verwendung eines Linkers zwischen dem Fluoreszenzfarbstoff und der Asparaginsäure in Position eins. Für die FITC-Markierung wurde ein β -Alanin eingefügt und für die Markierung mit AlexaFluor488 eine Maleimidgruppe. Für alle fluoreszenzmarkierten Proteine wurde für die Auswertung von AUZ-Messungen \bar{v} unter Berücksichtigung des Linkers und Fluoreszenzfarbstoffes berechnet (siehe 3.3).

6.4 SV-Analysen von fluoreszenzmarkiertem A β 42

Es wurden SV-Läufe von Alexa488-A β 42, OG488-A β 42 und FITC-A β 42 durchgeführt. Für Messungen mit dem FITC-A β 42 musste bei gleicher Konzentration immer ein höherer Gain für Messungen mit dem FDS gewählt werden als bei Alexa488-A β 42. Dies spiegelt die Unterschiede in den photophysikalischen Eigenschaften der Fluorophore wider (Daten nicht gezeigt). Abbildung 6.4.1 zeigt die $c(s)$ -Verteilungen nach SV-Läufen von 1 μ M FITC-A β 42, 400 nM OG488-A β 42 und 500 nM Alexa488-A β 42. Aufgrund der unterschiedlichen Markierungen des A β 42 sind die ermittelten $s_{20,w}$ -Werte verschieden. Für das jeweilige Monomer wurden folgende $s_{20,w}$ -Werte bestimmt: 0,86 S Alexa488-A β 42, 0,70 S OG488-A β 42, 0,78 S FITC-A β 42. Die Verteilungen von FITC-A β 42 und OG488-A β 42 zeigen ein Oligomer zwischen 1,5 und 2 S. Dieses konnte in verschiedenen, unabhängigen Messungen in einem Konzentrationsbereich zwischen 100 nM und 1 μ M A β 42 nachgewiesen werden. Aufgrund des größeren Molekulargewichtes ist in der $c(s)$ -Verteilung von Alexa488-A β 42 erst bei ca. 3 S ein Oligomer detektierbar. Auf Basis der Svedberg-Gleichung konnte in Abhängigkeit von der Fluoreszenzmarkierung des A β 42 diesem Oligomer etwa die Größe eines 5 bis 7meres zugeordnet werden. Der relative Anteil des Oligomers lag zwischen 4 und 10 %. Um zu prüfen, ob es sich bei diesem Partikel um ein Oligomer des A β 42 oder ein Artefakt der Fitroutine handelt, wurden SV-Läufe von FITC-A β 42 bei Temperaturen zwischen 10 und 30 °C bei 60.000 rpm durchgeführt. Es wurden 500 nM und 1 μ M FITC-A β 42 in Sörensen gelöst. Die UZ und der Rotor wurden vor jedem Lauf auf die entsprechende Temperatur equilibriert. Die A β 42-Lösungen wurden vor jedem neuen SV-Lauf nicht erneuert, sondern nur aufgeschüttelt. Es wurde aufgrund der geringen Größe der Partikel angenommen, dass kaum Materialverluste

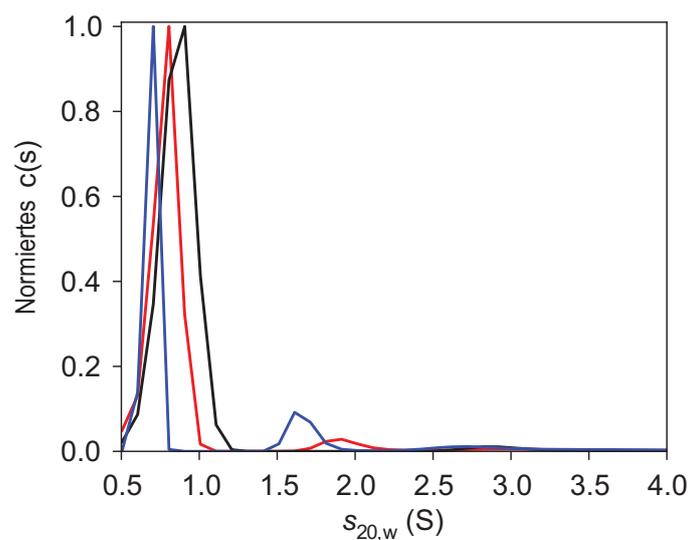


Abbildung 6.4.1: $c(s)$ -Verteilungen der SV-Läufe verschiedener fluoreszenzmarkierter A β 42-Konstrukte. Die SV-Analysen von 1 μ M FITC-A β 42 (rot), 500 nM Alexa488-A β 42 (schwarz) und 400 nM OG488-A β 42 (blau) zeigen das jeweilige Monomer und ein Oligomer zwischen 1,5 und 3 S in Abhängigkeit von der Markierung des A β 42.

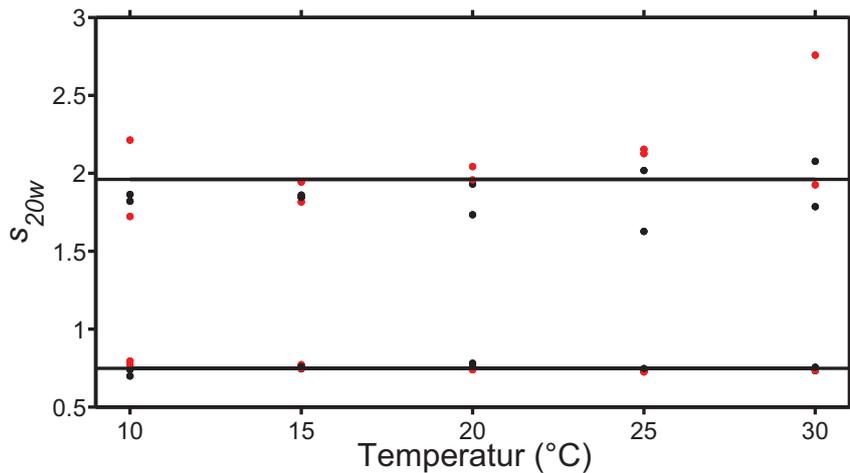


Abbildung 6.4.2: Bestimmung der $s_{20,w}$ -Werte für das Monomer und ein Oligomer des FITC-A β 42 bei verschiedenen Temperaturen. Es wurden SV-Läufe von 500 nM (rot) und 1 μ M (schwarz) FITC-A β 42 in einer Doppelbestimmung zwischen 10 und 30 °C durchgeführt. Die Proben wurden vor jedem SV-Lauf aufgeschüttelt. Die UZ und der Rotor wurden vor dem Start der Messung auf die entsprechende Temperatur equilibriert und die SV-Läufe bei 60.000 rpm durchgeführt. Die Datenauswertung erfolgte mittels $c(s)$ -Verteilung. Der Mittelwert aller $s_{20,w}$ -Werte über alle Konzentrationen und Temperaturen ist für das Monomer und das Oligomer jeweils als Horizontale eingetragen.

durch Adsorption an den Boden der Messzelle erfolgen und eine Aggregation innerhalb des Messzeitraumes aufgrund der geringen Konzentration unterbunden wird. Die Gesamtfluoreszenz vor jedem SV-Lauf blieb gleich, das Aufschütteln erfolgte ohne Materialverluste. Die temperaturabhängige Änderung von Viskosität und Dichte des Puffers führt zu Änderungen im apparenten s -Wert von Monomer und dem 1,9-S-Partikel. Eine anschließende Normierung der apparenten s -Werte auf die Dichte und Viskosität von Wasser bei 20 °C liefert für alle Messungen temperaturunabhängig die gleichen $s_{20,w}$ -Werte. Handelt es sich bei dem 1,9-S-Partikel um ein Artefakt, liefert die SV-Analyse immer den gleichen apparenten s -Wert. Nach der Normierung weist der berechnete $s_{20,w}$ -Wert eine temperaturabhängige Verteilung zwischen 1,46 S (Messung bei 30 °C) und 2,4 S (Messung bei 10 °C) auf. Die Auswertung erfolgte über die $c(s)$ -Verteilung. Die temperaturabhängige Änderung von \bar{v} des FITC-A β 42 wurde ebenfalls berücksichtigt. Abbildung 6.4.2 zeigt die Verteilung der $s_{20,w}$ -Werte für das Monomer und das Oligomer in Abhängigkeit von der Temperatur für die beiden gemessenen Konzentrationen an FITC-A β 42. Die Bestimmung des Monomers ist unabhängig von der Temperatur mit hoher Präzision möglich. Der $s_{20,w}$ liegt bei $0,75 \pm 0,02$ S und der f/f_0 bei $1,4 \pm 0,07$ (basierend auf 14 Datensätzen). Die größte Streuung zeigen die Daten von 10 °C, da dort die Sedimentation aufgrund der höchsten Dichte und Viskosität am langsamsten und am wenigsten weit erfolgt. Das Oligomer zeigt aufgrund seines geringen Anteils von maximal 10 % in der Probe eine größere Schwankung bei der $s_{20,w}$ -Wertbestimmung. Der Anteil nimmt mit zunehmender Temperatur auf bis zu 2 % ab. Dies lässt die Vermutung zu, dass sich das Oligomer in einem schnellen Gleichgewicht mit dem Monomer befindet. Die Änderung des Oligomeranteils in Abhängigkeit von der Temperatur deutet auf ein solches Gleichgewicht hin. Die Temperaturabhängigkeit ist in der Literatur anhand von *in-silico*-Versuchen für Oligomere des A β_{10-35} gezeigt [50]. Frühere Messungen bei 30 °C zeigten allerdings Anteile des Oligomers von bis zu 10 % (Daten nicht gezeigt). Um die Temperaturabhängigkeit dieses Monomer-Oligomer-Gleichgewichtes zu bestätigen, sind weitere Experimente nötig. Der $s_{20,w}$ des Oligomers in dieser Messreihe wurde mit $1,96 \pm 0,24$ S bestimmt. Eine Abnahme des $s_{20,w}$ mit zunehmender Temperatur ist nicht erkennbar. Das Experiment bestätigt die Annahme,

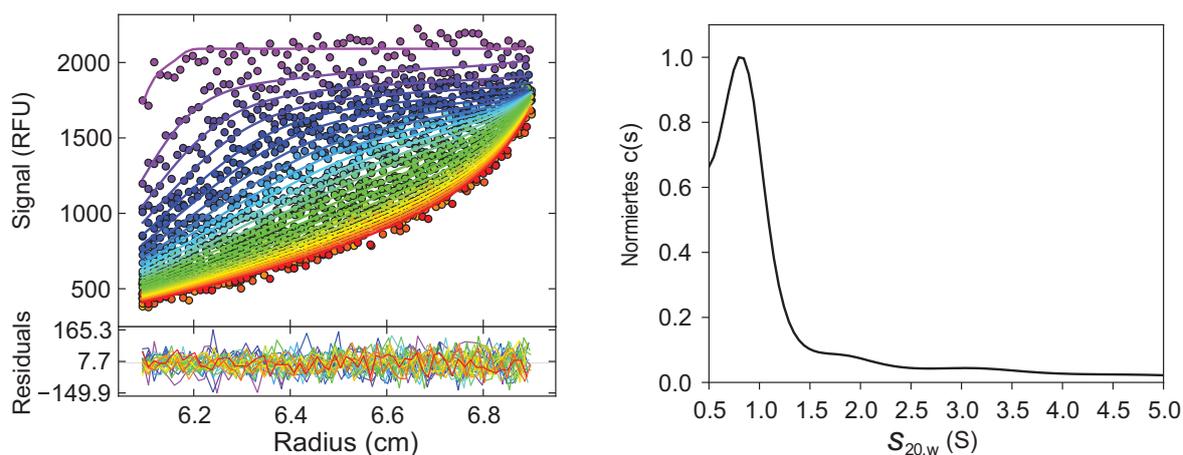


Abbildung 6.4.3: Sedimentationsprofil und $c(s)$ -Verteilung der niedrigsten getesteten Konzentration an OG488-A β 42. Es wurde ein SV-Lauf von 2,5 nM OG488-A β 42 bei 79 % Gain und einem PGA von 8 in einer Messzelle der Schichtdicke 12 mm durchgeführt. Links ist das Sedimentationsprofil mit den Fitkurven gezeigt und rechts die $c(s)$ -Verteilung. Der RMSD betrug 6 % des Plateausignals. Der $s_{20,w}$ des Monomers wurde mit 0,84 S bestimmt.

dass es sich bei dem nachgewiesenen Oligomer nicht um ein Artefakt aus dem Fit handelt.

Im nächsten Versuch sollte die Sensitivität des FDS getestet werden. Für diesen Versuch wurde OG488-A β 42 verwendet, da es gegenüber dem FITC eine höhere Quantenausbeute bietet. Die in SV-Läufen verwendete Konzentration konnte bis auf 2,5 nM reduziert werden. Der SV-Lauf wurde bei 50.000 rpm mit einem Gain von 79 % und einem PGA von 8 durchgeführt. Das Plateausignal lag bei 2.000 RFU. Die SV-Messung liefert unter diesen Bedingungen noch eindeutig voneinander unterscheidbare Sedimentationsgrenzschichten (Abbildung 6.4.3 links). Die Auswertung über die $c(s)$ -Verteilung liefert ein $s_{20,w}$ von 0,84 S. Der RMSD dieser Messung liegt bei 6 % des Ausgangssignals. Bei den sonstigen Messungen wurden RMSD-Werte unter 3 % erreicht. Oligomere konnten bei diesen Messungen nicht mehr eindeutig zugeordnet werden (Abbildung 6.4.3 rechts). Messungen von 100 nM OG488-A β 42 lieferten RMSD-Werte von 1 % in der Analyse. Eine weitere Absenkung der Konzentration ist möglich, da das PMT noch nicht bei 100 % Spannung verwendet wurde. Eine Auswertung von Sedimentationsprofilen bei Plateauhöhen unterhalb von 1.000 RFU ist ebenfalls möglich, reduziert allerdings das Signal-/Rausch-Verhältnis drastisch. Eine Senkung der zu verwendenden A β 42-Konzentration in den pikomolaren Konzentrationsbereich ist wahrscheinlich. Unter der Verwendung der Absorptionsoptik ließ sich nur eine minimale Konzentration von 1 μ M A β 42 messen. Durch die Verwendung des FDS konnte die minimal messbare Konzentration an A β 42 um den Faktor 400 gesenkt werden.

Die Versuche mit fluoreszenzmarkiertem A β 42 zeigten, dass die Detektion des Monomers und eines 1,96-S-Oligomers über verschiedene Konzentrationen und Temperaturen möglich ist. Die Messungen deuten auf ein temperaturabhängiges Monomer-Oligomer-Gleichgewicht hin. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das FDS über einen Temperaturbereich von 10 bis 30 °C zur Messung genutzt werden kann. Leider sind Messungen bei physiologischen Temperaturen (35 bis 38 °C) mit dem FDS nicht möglich, da der Laser nicht aktiv gekühlt werden kann und daher bei 35 °C zum Schutz vor Beschädigung abgeschaltet wird. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Sensitivität des FDS ausreichend ist, um SV-Läufe von 2,5 nM OG488-A β 42 durchzuführen.

6.5 Die Oligomerisierung von fluoreszenzmarkiertem A β 42

Die Analyse von SV-Läufen von nicht inkubiertem fluoreszenzmarkiertem A β 42 zeigte keine Anwesenheit von Oligomeren in einem Konzentrationsbereich zwischen 100 nm und 1 μ M. Auch nach Inkubation über einen Zeitraum von 5 Tagen konnten keine Oligomere detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Diese Messungen stehen im Gegensatz zu den bisherigen SV-Läufen von A β 42 mit der Absorptionsoptik, die auch bei Konzentrationen von 5 μ M die Anwesenheit von Oligomeren zeigten. In der Literatur sind AUZ-Messungen mittels Absorptionsoptik beschrieben, in denen Aggregate in A β 42-OG488-A β 42-Mischungen bestimmt wurden [51]. Um auszuschließen, dass diese Beobachtungen auf den Einfluss des Fluoreszenzfarbstoffes zurückzuführen sind, wurde die Aggregationsfähigkeit von FITC-A β 42 untersucht. Zwanzig μ M FITC-A β 42 wurden zu diesem Zweck bei 37 °C über 5 Tage inkubiert. Anschließend wurde ein SV-Lauf mit dem FDS bei 50.000 rpm durchgeführt. Für die Messung wurde die Probe 1:2 mit Sørensen verdünnt. Nach Abschluss wurde die Probe in der Messzelle aufgeschüttelt und erneut ein SV-Lauf mit der Absorptionsoptik bei 214 nm durchgeführt. Das Ergebnis der Auswertung ist in Abbildung 6.5.1 dargestellt. Die c(s)-Analyse des FDS-Laufes (links) zeigt zwei Hauptpeaks korrespondierend zum Monomer (0,7 S) und dem typischen Peak des Baseline-Dekonvolutionsproblems (0,2 S). Größere Oligomere sind nicht detektierbar. Die c(s)-Analyse der Absorptionsmessung zeigt das Monomer und eine breite Verteilung an Oligomeren. Monomer und Oligomere liegen im Verhältnis 1:1 vor. AFM-Messungen von 1 μ M FITC-A β 42 gelöst in PBS zeigten nach 5 Tagen Inkubation die Anwesenheit von Fibrillen (siehe Abbildung 6.5.2). Die Versuche zeigten, dass FITC-A β 42 aggregiert und wie A β 42 in der Lage ist, Fibrillen zu bilden. Die Abwesenheit der Oligomere in den FDS-Messungen muss daher aus der Detektionsmethode resultieren. Wahrscheinlich ist ein Quenchen des Fluoreszenzfarbstoffes. Aufgrund der Aggregation liegen die Farbstoffmoleküle innerhalb eines Oligomers zu dicht beieinander, was eine Energieübertragung zwischen diesen ermöglicht. Eine Abgabe von Photonen wird damit unterbunden und das FDS ist blind für größere Oligomere des A β 42. Der Effekt des Fluoreszenz-Selbstquenchens zwischen benachbarten Fluorophoren ist in der Literatur beschrieben und wird z. B. in zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen ausgenutzt, um die Aggregation von A β 42 zu untersuchen [52].

Aufgrund des Fluorophorquenchens ist für eine Untersuchung der Oligomere eine Mischung aus markiertem und unmarkiertem A β 42 günstiger. Dadurch wird der Abstand zweier benachbarter Fluorophore im Oligomer erhöht und das Quenchen reduziert. Um das Mischungsverhältnis zwischen markiertem und unmarkiertem A β 42 zu bestimmen, bei dem Oligomere nachweisbar sind, wurden SV-Läufe verschiedener Mischungen durchgeführt. Ausgehend von 1 μ M FITC-A β 42 wurden Mischungen unter Zusatz von 1 bis 14 μ M A β 42 hinzugefügt. Dadurch wurde ein Konzentrationsbereich von 1 bis 15 μ M A β 42 und ein Mischungsverhältnis von 0:1 bis 14:1 A β 42:FITC-A β 42 abgedeckt. Von Proben wurden SV-Läufe vor und nach 24 h Inkubation bei 37 °C mit dem FDS durchgeführt. Die Inkubation sollte die Menge an Oligomeren in der Probe erhöhen. Die Aggregationsgeschwindigkeit war bei allen Proben aufgrund der zunehmenden Gesamtkonzentration verschieden. Es wurde angenommen, dass nach 24 h in jeder Probe Oligomere entstanden sind. Aus den Absorptionsmessungen ist bekannt, dass 5 μ M A β 42-Lösungen bereits zum Zeitpunkt null Oligomere aufweisen. Vorversuche zeigten bereits, dass ein Mischungsverhältnis von 10:1 A β 42 zu FITC-A β 42 eine Detektion von Oligomeren ermöglicht (Daten nicht gezeigt). Abbildung 6.5.3 zeigt exemplarisch die Sedimentationsprofile und die c(s)-Analyse der Mischungsverhältnisse 4:1 (oben) und 10:1 (unten) nach der Inkubation. Sowohl anhand der Sedimentationsprofile als auch der c(s)-Verteilungen lässt sich erkennen, dass im Mischungsverhältnis 10:1 Oligomere detektiert werden können. Der Anteil beträgt ca. 30 %. Im 4:1-Verhältnis konnte nur ein Oligomer bei 2 S detektiert werden, das bereits bei den Messungen ohne Inkubation beschrieben wurde (siehe 6.4). Aus dem Experiment ergab sich ein Mischungsverhältnis von mindestens 6:1, ab dem Oligomere oberhalb von 5 S detektiert werden konnten. Dies bedeutet für die Untersuchung der Oligomerverteilung von A β 42, dass unterhalb einer Gesamtkonzen-

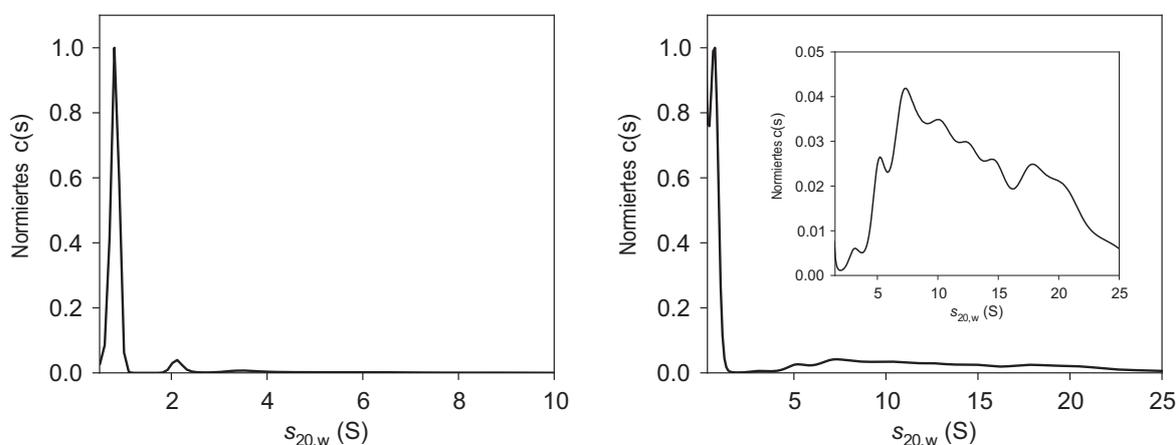


Abbildung 6.5.1: Vergleich der Detektion von FITC-A β 42 mittels FDS und Absorptionsoptik. 20 μ M FITC-A β 42 wurden in Sörensen gelöst und 5 Tage bei 37 °C inkubiert. Vor der Messung erfolgte eine 1:2-Verdünnung im Puffer. Links ist die $c(s)$ -Verteilung des SV-Laufes mittels FDS gezeigt. 90 % des Signals können dem Monomer zugeordnet werden. Rechts ist die $c(s)$ -Verteilung des SV-Laufes mit Absorptionsoptik gezeigt. Das Inlett zeigt den s -Wertbereich der Oligomere. Monomer und Oligomere liegen im Verhältnis 1:1 vor. Die $c(s)$ -Verteilungen wurden auf das maximale $c(s)$ normiert.

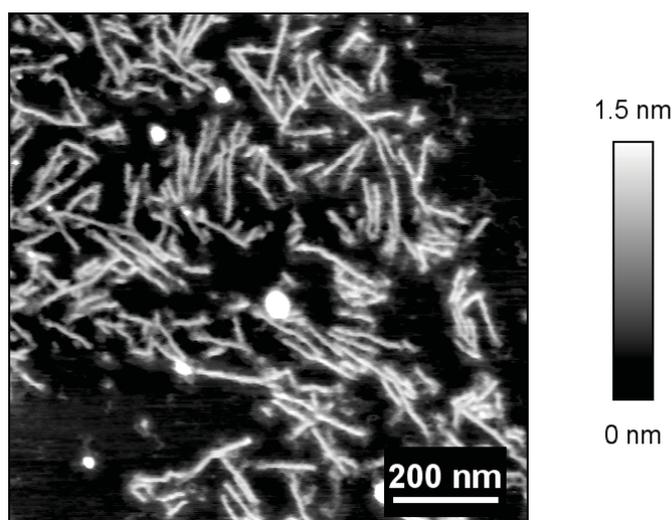


Abbildung 6.5.2: Nachweis von FITC-A β 42-Fibrillen mittels AFM. 1 μ M FITC-A β 42 wurden in PBS gelöst und bei 37 °C über 5 Tage inkubiert. Anschließend wurde die Probe auf Mica an Luft abgebildet.

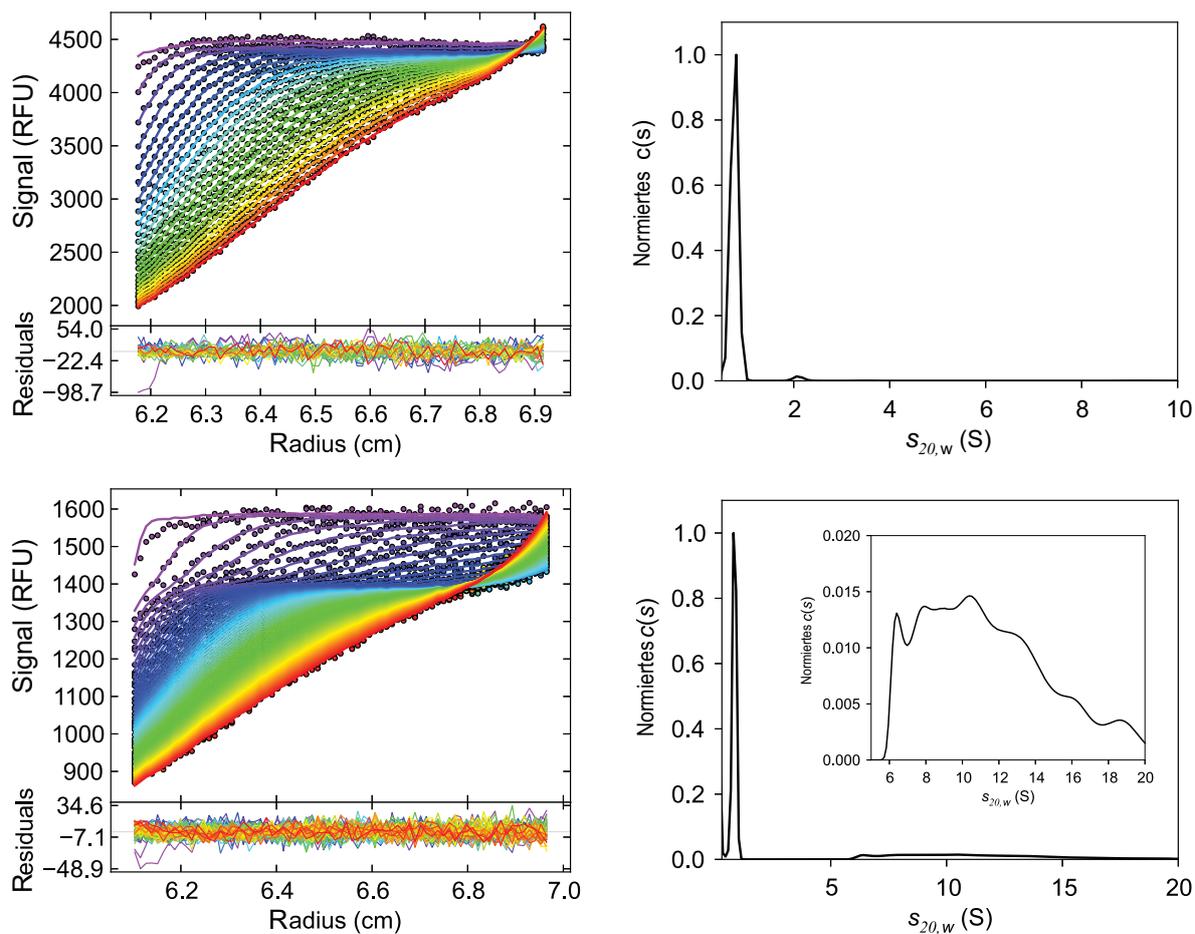


Abbildung 6.5.3: Sedimentationsprofile und $c(s)$ -Verteilungen von A β 42-FITC-A β 42-Mischungen. Die Abbildung zeigt die Sedimentationsprofile und $c(s)$ -Verteilungen exemplarisch für die Mischungen 4:1 (oben) und 10:1 (unten) nach 24 h Inkubation bei 37 °C. Oligomere können nur in der 10:1-Mischung detektiert werden (siehe Inlett). Der Anteil beträgt ca. 30 %. Die $c(s)$ -Verteilungen sind auf das maximale $c(s)$ normiert.

tration von 1 μ M nicht mehr als 140 nM ($\frac{1}{7}$ der Gesamtkonzentration) fluoreszenzmarkiertes Material eingesetzt werden dürften. Für FITC-A β 42 liegt eine optimale Konzentration für AUZ-Messungen zwischen 200 und 500 nM. Die Bestimmung von großen Oligomeren im nanomolaren Konzentrationsbereich ist deutlich schwieriger als von Oligomeren unterhalb von 4 S. Des Weiteren ist zu beachten, dass mit geringerem Anteil an fluoreszenzmarkiertem Material auch die Zahl an Fluoreszenzfarbstoffmolekülen pro Oligomer abnimmt. Für ein gleichbleibendes Fluoreszenzsignal müsste daher die Konzentration des Oligomers größer werden. Es muss daher vor jedem Experiment abgewogen werden, welche *s*-Wertbereiche an Oligomeren untersucht werden sollen und welches Mischungsverhältnis für ein gutes Signal-/Rausch-Verhältnis noch vertretbar ist. Andernfalls kann es sein, dass Oligomere nicht detektiert werden, weil deren Signal unter die Nachweisgrenze fällt. Die Wahl eines anderen Fluoreszenzfarbstoffes anstelle des FITC ist sinnvoll, um die Detektionsgrenze des markierten A β 42 nach unten zu verschieben.

Die Versuche zur Aggregation von reinem fluoreszenzmarkiertem A β 42 zeigten, dass ein Selbstquenchen der Fluoreszenzfarbstoffmoleküle in Oligomeren auftritt. Die Verwendung von Mischungen aus markiertem und unmarkiertem A β 42 ermöglicht die Detektion von A β 42-Oligomeren in Lösung. Ein Mischungsverhältnis von mindestens 6:1 A β 42:FITC-A β 42 ließ den Nachweis von Oligomeren oberhalb von 5 S zu.

6.6 Verwendung des FDS für EQ-Läufe

Bisher wurden mit dem FDS nur für SV-Läufe durchgeführt. Für den Test des FDS zur Aufnahme von EQ-Läufen wurden 100 nM OG488-A β 42 bei pH 12, ausgehend von NaP_i, gelöst, um die Aggregation des A β 42 zu unterbinden. Für diesen Versuch wurde OregonGreen488 als Fluoreszenzfarbstoff verwendet, da dieser eine höhere pH-Stabilität als FITC aufweist. Es wurden Titanmesszellen mit 12 mm Schichtdicke verwendet. Bei 3.000 rpm wurden Gain und Fokushöhe festgelegt. Bei Verwendung der Absorptionsoptik würde gegenüber den SV-Läufen die radiale Auflösung erhöht werden sowie die Messung im Schritt-Modus mit mindestens 7 Replikaten pro Messpunkt durchgeführt werden. In der aktuellen Version des AOS konnten nur die auch bisher verwendeten Einstellungen bezüglich Auflösung und Replikatanzahl getestet werden. Der EQ-Lauf wurde bei 20 °C durchgeführt. Der EQ-Lauf wurde mit folgenden Rotorgeschwindigkeiten und Laufzeiten zur Einstellung des Gleichgewichtes programmiert:

29 h bei 50.000 rpm

18 h 15 min bei 55.000 rpm

14 h 45 min bei 60.000 rpm

Am Ende jeder Laufzeit wurden 10 Scans im Abstand von 15 min aufgenommen. Der Messzeitraum über 150 min stellt sicher, dass sich die Probe nach der berechneten Zeit im Gleichgewicht befindet. Außerdem muss vor jeder Messreihe der Laser neu angeschaltet und vorgewärmt werden, da sich dieser nach ca. 20 min ohne Datenaufnahme abschaltet. Die Scananzahl stellt sicher, dass mehrere Scans bei gleichmäßiger Laserleistung aufgenommen werden.

Die Auswertung der Messung erfolgt mit dem Teilprogramm „Global Equilibrium Analysis“ in UltraScan. Dem Fit wurde ein Ein-Komponenten-Modell zugrunde gelegt. Anschließend wurde eine Monte-Carlo-Analyse mit 5.000 Iterationen durchgeführt. Der Fit lieferte ein Molekulargewicht zwischen 4,71 kDa und 4,75 kDa. Abbildung 6.6.1 zeigt links die Überlagerung zwischen den Messdaten und Fitkurven für die drei Rotorgeschwindigkeiten. Rechts sind die Residuals der Fits dargestellt. Die Abweichungen zwischen Fitkurve und Messdaten liegt für Fluoreszenzdaten im typischen Größenbereich. Das erwartete Molekulargewicht für OG488-A β 42 liegt bei 5,0 kDa. Dies entspricht einer Abweichung von 6 %. Eine mögliche Ursache könnte in der Ungenauigkeit bei der Annahme des \bar{v} begründet liegen. Der Wert wurde auf Basis des Tabellenwerkes von Durchschlag [19] berechnet. Bei OG488-A β 42 handelt es sich um ein zusammengesetztes Molekül aus Aminosäuren und Fluoreszenzfarbstoff. Die Kalkulation von \bar{v} könnte daher eine höhere Ungenauigkeit aufweisen, als es für eine reine Aminosäurekette der Fall ist. Einen weiteren Beitrag für die Abweichung könnte die Bestimmung der Baseline durch die Software liefern. Diese ist nur in den letzten Kurvenverläufen (60.000 rpm) in einem kleinen Bereich bestimmbar. Für eine stärkere Sedimentation des OG488-A β 42 reichen die Zentrifugalkräfte in der UZ nicht aus. Dies ist ein generelles Problem bei der Arbeit mit kleinen Molekülen. In dem durchgeführten Experiment konnte gezeigt werden, dass das FDS auch für EQ-Läufe verwendet werden kann und die Auswertung der Fluoreszenzdaten erfolgreich durchgeführt werden konnte. Es konnten Molekulargewichtsbestimmungen bei einer Konzentration von nur 100 nM OG488-A β 42 mit geringem Fehler durchgeführt werden.

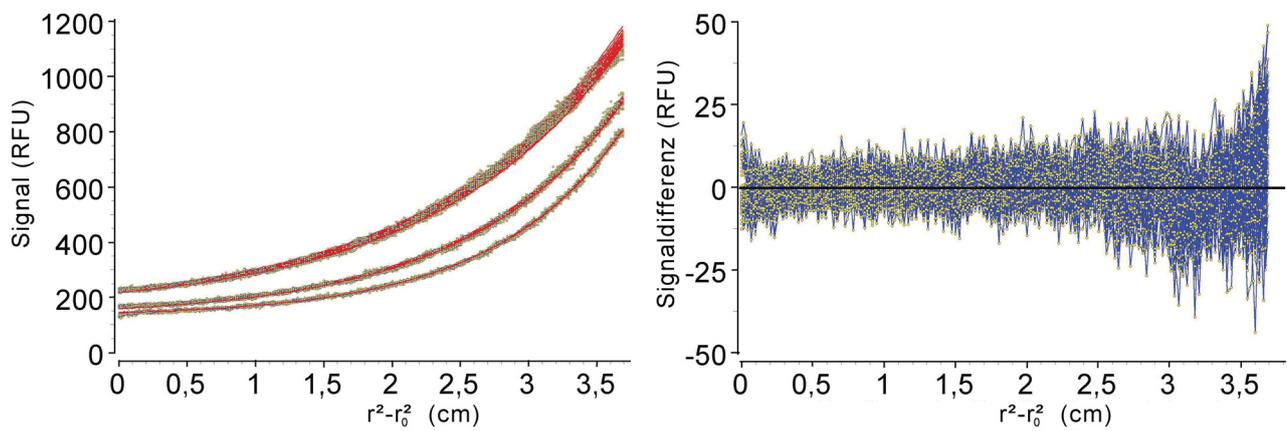


Abbildung 6.6.1: Auswertung eines EQ-Laufs mit dem FDS von OG488-A β 42. 100 nM OG488-A β 42 wurden bei pH 12 gelöst. Die Messdaten wurden bei 50.000, 55.000 und 60.000 rpm aufgenommen. Links ist die Überlagerung der Messdaten mit den Fitkurven dargestellt. Rechts sind die Residuals gezeigt. Die Daten wurden mit einem 1-Komponenten-Modell in UltraScan gefittet.

7 A β 42 in physiologischer Umgebung

Bisher wurde die Oligomerbildung des A β 42 in verschiedenen Puffern und unter Zusatz verschiedener Additive untersucht. Für eine grundlegende Charakterisierung sind diese vereinfachten Systeme sinnvoll. Offen bleibt allerdings die Frage, ob die Beobachtungen auch auf A β 42 in seiner natürlichen Umgebung zutreffen. A β 42 ist im menschlichen Organismus im CSF und Blutplasma nachweisbar [53]. CSF wurde als Untersuchungsmedium ausgewählt. Zum einen wird A β 42 im Gehirn durch die Spaltung des membrangebundenen APP gebildet. CSF kann daher als erstes Solvent betrachtet werden. Zum anderen ist die Gesamtproteinkonzentration (dominiert durch Serumalbumin) im CSF niedriger als im Blutplasma. Dieses Kapitel beschäftigt sich daher mit der Frage, ob AUZ-Messungen in dem komplexen physiologischen System CSF möglich sind. Weiterhin soll untersucht werden, ob das CSF Einfluss auf die Oligomerbildung des A β 42 nimmt.

7.1 Charakterisierung des verwendeten CSF

In den bisher durchgeführten AUZ-Messungen erfolgte eine Sedimentation des A β 42 nur in Gegenwart von Salzen. Im CSF liegen im Vergleich dazu hohe Proteinkonzentrationen (vorwiegend HSA) vor, die zu radial abhängigen Viskositäts- und Dichteänderungen während der AUZ-Messungen führen können. Die Auswertung von SV-Läufen ist damit nicht möglich. Außerdem beeinflussen große Mengen an schnell sedimentierenden Partikeln die Bestimmung der Anteile und *s*-Werte von langsam sedimentierenden Partikeln (Johnston-Ogston-Effekt) [54]. In CSF gelöstes A β 42 würde in Gegenwart größerer Mengen Serumalbumin sedimentieren. Der Johnston-Ogston-Effekt könnte daher zumindest für das Monomer und kleinere Oligomere eine Rolle spielen. In diesem Abschnitt soll die erste Charakterisierung des CSF beschrieben werden.

Das verwendete CSF ist gepoolt und wurde von lebenden Spendern entnommen. Das Material ist unbehandelt und enthält keine Zusätze zur Konservierung, es wurde lediglich durch einen Filter von 0,2 μm filtriert. Bei den Spendern handelte es sich nicht um Personen, bei denen Alzheimersche Demenz oder eine andere neurodegenerative Erkrankung diagnostiziert wurde. Das Material wurde nicht auf übertragbare Krankheiten getestet und musste daher als potenziell infektiös behandelt werden. Daher mussten alle Materialien, die mit dem CSF Kontakt hatten, im Anschluss autoklaviert oder mit Dismozon behandelt werden. Alle Messungen in der AUZ erfolgten daher ausschließlich in Messzellen mit Titanmittelstücken. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C. Das verwendete CSF war eine klare, farblose Flüssigkeit. Der optische Eindruck ließ auf die Abwesenheit von Blut schließen, das bei der Punktion des Rückenmarks manchmal das CSF verunreinigt. Zur Bestimmung des Proteingehaltes und der Einschätzung der Absorption des CSF im UV-Bereich wurde ein Absorptionsspektrum zwischen 220 und 300 nm aufgenommen (siehe Abbildung 7.1.1). Die Messung wurde in der AUZ in einer Messzelle mit einem 3-mm-Titanmittelstück bei 3.000 rpm bei 20 °C durchgeführt. Als Referenz wurde Wasser im zweiten Sektor mitgeführt. Das Spektrum zeigt ein Maximum bei 279 nm von 0,46 OD, typisch für ein Proteinspektrum. Basierend auf der Annahme, dass die Absorption primär durch das Serumalbumin ($\epsilon_{279\text{nm}} = 0,531 \text{ g}^*\text{L}^{-1}*\text{cm}^{-1}$) bedingt wird, kann eine Konzentration von 2,89 g/L berechnet werden. Mit kleiner werdender Wellenlänge nimmt die Absorption des CSF drastisch zu. Die Verwendung als Pufferersatz für die Herstellung von A β 42-Lösungen zur Messung in der AUZ mittels Absorptionsoptik ist damit nicht möglich. A β 42-Konzentrationen unter 100 μM müssen bei der Verwendung einer Messzelle von 3 mm Schichtdicke bei Wellenlängen unterhalb

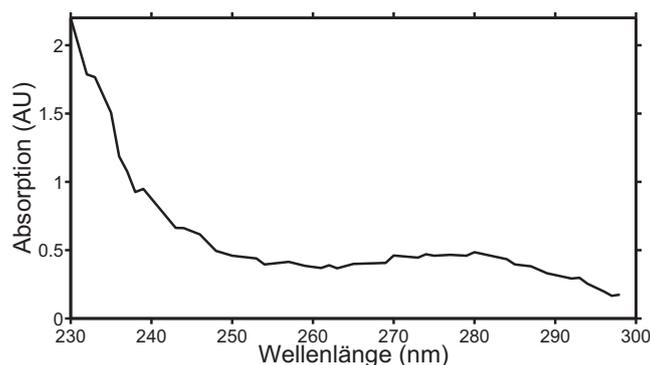


Abbildung 7.1.1: UV-Absorptionsspektrum des CSF. Das Spektrum wurde in der AUZ bei 3.000 rpm und 20 °C aufgenommen. Es wurde eine Messzelle mit 3-mm-Titanmittelstück verwendet.

von 230 nm detektiert werden. Die Eigenabsorption des CSF würde den größten Anteil am Gesamtsignal ausmachen und das Signal-/Rausch-Verhältnis im SV-Lauf für die Bestimmung des A β 42 drastisch reduzieren.

Zunächst sollten Informationen über die im CSF natürlicherweise enthaltenen Partikel gewonnen werden, die für die Absorption bzw. die Fluoreszenz des CSF verantwortlich sind. Es wurden SV-Läufe sowohl mit der Absorptionsoptik als auch dem FDS bei 40.000 rpm durchgeführt. Die Absorption wurde bei 238 nm detektiert und die Fluoreszenz bei einem Gain von 84 % und einem PGA von 1. Die Absorptionsmessung erfolgte bei einer Ausgangsplateauhöhe von 0,7 OD, die Fluoreszenzmessung bei 600 RFU. Die Eigenfluoreszenz des CSF ist gering, kann aber trotz des vergleichsweise niedrigen Ausgangssignals für SV-Läufe verwendet werden. Die Auswertung erfolgte mittels $c(s)$ -Analysen. Abbildung 7.1.2 zeigt die $c(s)$ -Verteilungen resultierend aus den Messungen mit den beiden Optiken. Mit der Absorptionsoptik konnten drei Komponenten mit 1,6 S, 4,2 S und 6,5 S identifiziert werden. Die Auswertung der FDS-Messung ergab zwei Komponenten mit 1,4 S und 4,2 S. Beide Detektionsmethoden liefern eine Hauptkomponente bei 4,2 S. Das Fehlen der 6,5-S-Komponente in der FDS-Messung könnte an ihrem geringen Anteil in der Probe oder der fehlenden Eigenfluoreszenz liegen. Dadurch ist eine Detektion unter den gewählten Gaineinstellungen nicht möglich. Eine Normierung des s -Wertes auf die Dichte und Viskosität von Wasser bei 20 °C konnte nicht durchgeführt werden, da die Dichte und Viskosität des CSF nicht bekannt sind (siehe 7.2). Die Messungen zeigten, dass die Komponente, die im CSF für den Hauptanteil der Absorption verantwortlich ist, ebenfalls den Hauptanteil der Eigenfluoreszenz ausmacht. Bei der 4,2-S-Komponente handelt es sich vermutlich um das monomere HSA und bei der 6,5-S-Komponente um die Dimerform. Um zu prüfen, ob HSA für die Eigenfluoreszenz des CSF verantwortlich ist, wurden SV-Läufe von 3 g/L HSA gelöst in PBS durchgeführt. Die verwendete Menge entspricht der theoretischen Proteinmenge im CSF. PBS wurde verwendet, um die Salzmengen im CSF widerzuspiegeln. Die $c(s)$ -Verteilungen der Absorptions- und FDS-Messung lieferten ein $s_{20,w}$ für das monomere HSA von 4,4 S (siehe Abbildung 7.1.3). In der Absorptionsmessung konnte ebenfalls das HSA-Dimer mit 6,8 S bestimmt werden. Die Versuche zeigten, dass die Eigenfluoreszenz des HSA ausreichend ist, um den $s_{20,w}$ -Wert des Monomers zu bestimmen. Bei den beobachteten Partikeln im CSF handelt es sich wahrscheinlich um das monomere und dimere HSA. Welcher Bestandteil des CSF mit 1,6 S detektiert wurde, konnte nicht geklärt werden. Der beobachtete s -Wertunterschied zwischen den Messungen im CSF und PBS kann auf die fehlende Korrektur der Dichte und Viskosität des CSF zurückgeführt werden. Die Größenordnung entspräche etwa der Dichte und Viskosität von PBS. Der Grund für die Eigenfluoreszenz des HSA wurde nicht untersucht. Diese könnte intrinsisch bedingt sein oder an einem fluoreszierenden Bindungspartner des HSA liegen, der natürlich in Blut und CSF vorliegt,

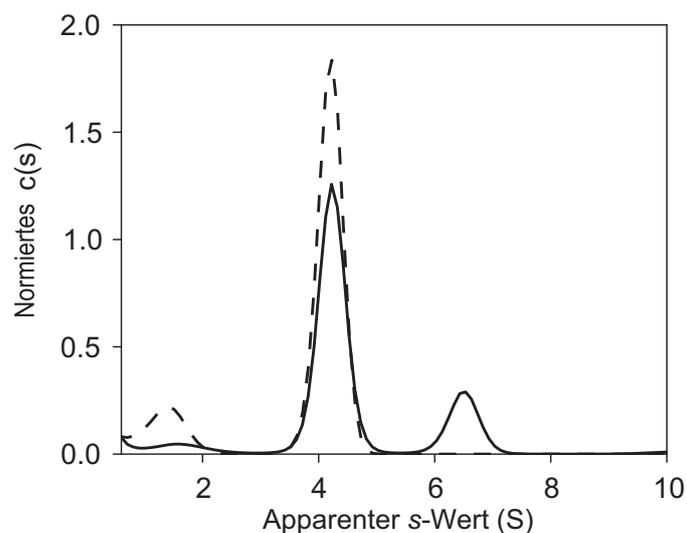


Abbildung 7.1.2: $c(s)$ -Verteilung im CSF nach SV-Lauf unter Detektion von Absorptionsoptik (-) bzw. FDS (- -). Es wurden SV-Läufe des CSF in einer Messzelle mit 3-mm-Titanmittelstück bei 40.000 rpm und 20 °C durchgeführt. Die Absorption wurde bei 238 nm und die Fluoreszenz bei 84 % Gain und PGA 1 detektiert. Die $c(s)$ -Verteilungen wurden auf die Fläche unter der Kurve normiert.

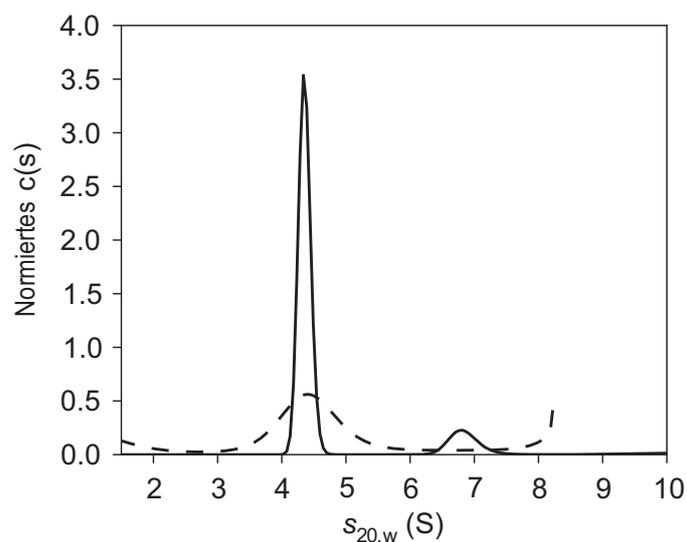


Abbildung 7.1.3: $c(s)$ -Verteilung des HSA nach SV-Lauf unter Detektion von Absorptionsoptik (-) bzw. FDS(- -). Es wurden SV-Läufe von 3 g/L HSA bei 40.000 rpm und 20 °C in Messzellen mit 3-mm-Titanmittelstück. Die Absorption wurde bei 275 nm und die Fluoreszenz bei 100 % Gain und PGA 1 detektiert. Das monomere HSA (4,4 S) ist mit beiden Optiken detektierbar. Die $c(s)$ -Verteilungen wurden auf die Fläche unter der Kurve normiert.

z. B. Bilirubin, und nicht bei der Gewinnung entfernt wird [55]. Lösungen von 3 g/L BSA, isoliert aus der Albuminfraktion des Blutes (sog. Fraktion V), zeigten ebenfalls Eigenfluoreszenz (Daten nicht gezeigt). Die Eigenfluoreszenz des BSA ist deutlich geringer als die des HSA (Anfangsplateauhöhe 250 RFU bei 75 % Gain und PGA 2), daher ist eine s -Wertbestimmung mit dem FDS nicht verlässlich möglich.

In diesem Abschnitt konnte gezeigt werden, dass CSF zur Messung in der AUZ geeignet ist. Aufgrund der starken HSA-Absorption ist eine Detektion lediglich mit dem FDS sinnvoll. In Abhängigkeit vom gewählten Gain kann die Eigenfluoreszenz des im CSF mit ca. 3 g/L enthaltenen HSA detektiert werden. Unter den Einstellungen, die bisher für die Detektion von fluorophormarkiertem A β 42 verwendet wurden, ist die Eigenfluoreszenz kaum detektierbar und sollte nicht vom Hintergrundrauschen unterschieden werden können.

7.2 Bestimmung von Dichte und Viskosität des CSF mittels AUZ

Einen wichtigen Schritt bei der Auswertung von AUZ-Daten stellt die Korrektur der apparent ermittelten s -Werte auf $s_{20,w}$ -Werte dar. Für einfache Puffersysteme wie NaP $_i$ oder PBS kann die Dichte und Viskosität mittels Sednterp (siehe 3.3.1) berechnet werden. Aus den vorangegangenen Messungen konnte bereits abgeleitet werden, dass der lösliche Anteil des CSF in etwa mit der Dichte und Viskosität des PBS vergleichbar ist. Dies berücksichtigt allerdings nur einen Teil des Systems CSF. Der Einfluss von gelösten Proteinen (HSA, Immunglobuline etc.) auf die Dichte und Viskosität ist schwerer abzuschätzen. Messungen mit einem Densitometer bzw. Viskosimeter könnten Werte liefern. Aufgrund des Infektionsschutzes, unter dem mit dem CSF gearbeitet werden musste, konnte kein Zugang zu solchen Geräten erhalten werden, um Messungen durchzuführen. Daher wurde versucht, diese Informationen mithilfe von AUZ-Messungen zu erhalten. Die Sedimentationsgeschwindigkeit ein und desselben Partikels ist bei identischen Zentrifugationsbedingungen nur von den Lösungsmitelegenschaften abhängig. Daher können mithilfe von Vergleichsmessungen mit einem Lösungsmittel mit bekannter Dichte und Viskosität Rückschlüsse auf die Dichte und Viskosität von CSF gezogen werden. Diese Annahme kann getroffen werden, wenn die Form oder der Oligomerisierungsgrad eines Testmoleküls nicht durch die Lösungsmitelegenschaften beeinflusst wird. Als Testmolekül wurden die Proteine GFP-1433 und GFP verwendet. GFP weist ein Emissionsmaximum bei 475 nm und ein Exzitationsmaximum bei 506 nm auf. Die Quantenausbeute beträgt 0,79 [56]. Für Messungen mit dem FDS ist es daher optimal geeignet. Die Proteine wurden ausgewählt, da sie einen höheren und einen niedrigeren $s_{20,w}$ als das HSA besitzen. Dies wurde in separaten SV-Läufen geprüft (Daten nicht gezeigt). Dadurch kann überprüft werden, ob der Einfluss des CSF auf Partikel mit unterschiedlicher Größe gleich ist. Das größere GFP-1433 sedimentiert immer in Anwesenheit des HSA. Das kleinere GFP sedimentiert nahe des Meniskus in einer zunehmend HSA-freien Zone und in Bodennähe in Gegenwart des HSA (Johnston-Ogston-Effekt).

Als Vergleichspuffer wurde PBS verwendet. GFP-1433 wurde in einer Konzentration von 6 μ M in PBS und 240 nM in CSF gelöst. Es wurden SV-Läufe bei 40.000 rpm und 20 °C durchgeführt. Die Detektion in PBS erfolgte mit der Absorptionsoptik bei 275 nm und in CSF mit dem FDS bei 63 % Gain und einem PGA von 1. Die erste Auswertung der SV-Läufe erfolgte mit Sedfit unter Verwendung des $c(s)$ -Modells, um Informationen über die Partikelverteilung zu erhalten. Als Dichte und Viskosität wurden in der Analyse die Werte von PBS angenommen. Die Verteilungen zeigten sowohl im PBS als auch im CSF die Anwesenheit von drei Komponenten (siehe Abbildung 7.2.1). Aus den Fits ergab sich in beiden Fällen ein gewichtsgemittelttes f/f_0 von 1,5. Der Formparameter und der Oligomerisierungsgrad des GFP-1433 sind in beiden Lösungsmitteln identisch. Auf Basis der Svedberg-Gleichung konnte der Hauptspezies (> 80 %) mit einem apparenten s -Wert von 5,2 S das Monomer und der 8-S-Spezies das Dimer zugeordnet werden. In der CSF-Messung zeigten Monomer und Dimer eine Verschiebung zu kleineren apparenten

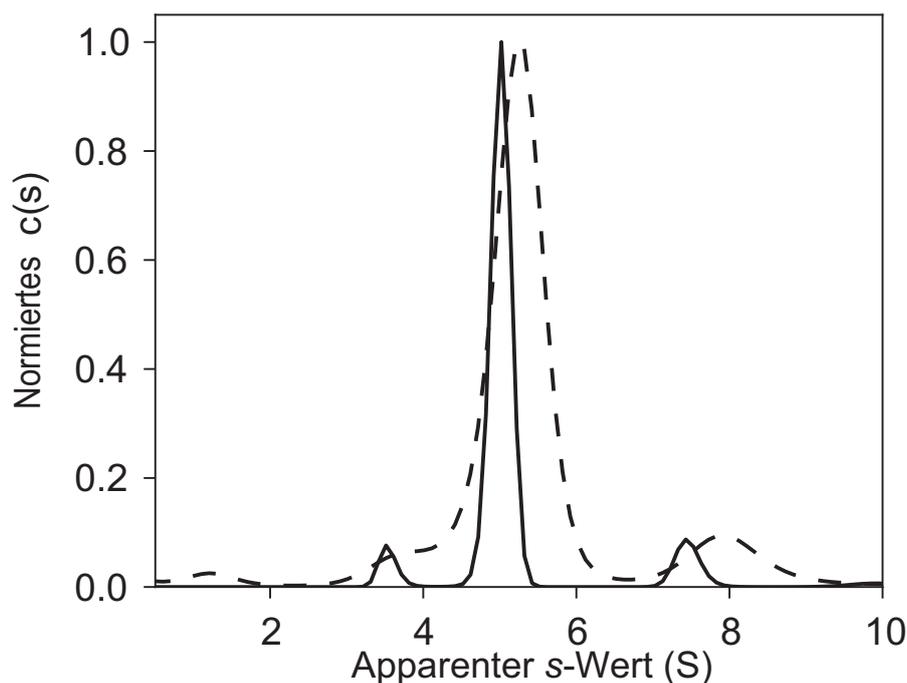


Abbildung 7.2.1: $c(s)$ -Verteilungen von GFP-1433 in PBS und CSF. Es wurden SV-Läufe von GFP-1433 in PBS (- -) und CSF (-) bei 40.000 rpm durchgeführt. Die Detektion erfolgte mittels Absorptionsoptik in PBS und dem FDS in CSF. Für erstere wurden 6 μM GFP-1433 gelöst und für zweitere 240 nM. Die Auswertung erfolgte für beide Messungen unter der Annahme der Dichte und Viskosität von PBS.

s -Werten (5 S und 7,5 S). Bei der dritten Komponente mit dem apparenten s -Wert unterhalb von 4 könnte es sich um ein Spaltprodukt handeln. Die Messungen zeigten, dass die Dichte bzw. Viskosität des CSF größer ist als die des PBS.

Zwei unbekannte Parameter bei der $c(s)$ -Analyse sind sowohl die Dichte als auch die Viskosität des CSF. Daher wurde ein alternatives Modell für die Analyse der Sedimentationsprofile verwendet, das Modell der nicht interagierenden diskreten Spezies. Dieses beschreibt die Änderung der Konzentration über den Radius und die Zeit einer Spezies sowie die Verbreiterung der Sedimentationsgrenzschicht nur in Abhängigkeit vom s -Wert und der Diffusionskonstanten. Es sind keine Kenntnisse über die Lösungseigenschaften nötig. Bei dem resultierenden s -Wert und Diffusionskoeffizienten handelt es sich um apparente Werte, die nur unter den Experimentbedingungen gelten. Die Sedimentationsprofile ließen sich unter der Annahme von zwei Komponenten fitten. Der Fit der PBS-Probe lieferte eine Hauptkomponente mit einem apparenten s -Wert von 5,16 S und einem apparenten Diffusionskoeffizienten von $5,86 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$. Aufgrund der Kenntnisse aus der $c(s)$ -Analyse handelt es sich bei dieser um das monomere GFP-1433. Unter Verwendung der Stokes-Einstein-Gleichung lässt sich mit diesen Werten und der bekannten Viskosität von PBS der hydrodynamische Radius (r) des monomeren GFP-1433 berechnen.

$$D_{\text{app}} = \frac{k_B * T}{6 * \pi * \eta_{\text{PBS}} * r}$$

Der hydrodynamische Radius beträgt 3,62 nm. Das Molekulargewicht (M) des GFP-1433 kann über die Svedberg-Gleichung mit der bekannten Dichte von PBS berechnet werden.

$$M = \frac{s_{\text{app}} * R * T}{D_{\text{app}} * (1 - \bar{v} * \rho_{\text{PBS}})}$$

Das Molekulargewicht des GFP-1433 beträgt 80,20 kDa.

Der Fit des Sedimentationsprofils aus dem CSF-Lauf lieferte den apparenten s -Wert (5,0 S) und den apparenten Diffusionskoeffizienten ($4,8 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$) für das GFP-1433 unter den Lösungsmittelbedingungen des CSF. Es gilt die Annahme, dass sich das Lösungsmittel nicht auf die Form und den Oligomerisierungsgrad des Testmoleküls auswirkt. Daher besitzt das GFP-1433 in PBS und CSF den gleichen hydrodynamischen Radius und das gleiche Molekulargewicht. Unter Kenntnis dieser Größen lässt sich über die Stokes-Einstein-Gleichung die Viskosität des CSF berechnen.

$$D_{\text{app}} = \frac{k_B * T}{6 * \pi * \eta_{\text{CSF}} * r_{\text{PBS}}}$$

Die Viskosität des CSF beträgt 1,23 cp. Dieser Wert liegt deutlich über dem des PBS (1,011 cp). Die Dichte des CSF kann über die Svedberg-Gleichung ermittelt werden.

$$M_{\text{PBS}} = \frac{s_{\text{app}} * R * T}{D_{\text{app}} * (1 - \bar{v} * \rho_{\text{CSF}})}$$

Die Dichte des CSF liegt bei $0,98 \text{ g/cm}^3$. Dieser Wert ist niedriger als der des PBS ($1,00537 \text{ g/cm}^3$). Dies spiegelt die Schwierigkeit in der Bestimmung der Lösungsmittelparame- ter wider. Um die Dichte und Viskosität mit hinreichender Genauigkeit zu bestimmen, muss auch die Bestimmung der hydrodynamischen Parameter des GFP-1433 eine hohe Genauigkeit aufweisen. So führen Abweichungen von $0,05 \text{ cm}^2/\text{s}$ in der Bestimmung des Diffusionskoeffizienten zu Abweichungen von $0,3 \text{ g/cm}^3$ in der Dichte. Diese Ungenauigkeit führt zu einer Unterbestimmung der Dichte und einer Überbestimmung der Viskosität. Der $s_{20,w}$ -Wert des GFP-1433 beträgt ausgehend von der PBS-Messung 5,33 S und ausgehend von der CSF-Messung 5,47 S. Die Abweichung von 0,14 S beruht wahrscheinlich auf der Ungenauigkeit bei der Bestimmung des Diffusionskoeffizienten. Dieser wird anhand der Form der Sedimentationsgrenzschicht bestimmt. Diese ist am besten in Systemen mit nur einer Spezies zu bestimmen, da heterogene Proben zu verbreiterten Grenzschichten führen [57]. Das verwendete GFP-1433 kann als Mehrkomponentensystem daher nicht die benötigte Genauigkeit liefern. Die s -Wertbestimmung weist im Gegensatz dazu eine deutlich höhere Genauigkeit auf. Diese beruht auf der Wanderungsgeschwindigkeit der Sedimentationsgrenzschicht. Diese ist einfacher zu bestimmen als die Änderung der Form. Dies wird auch dadurch deutlich, dass die s -Wertbestimmung des monomeren GFP-1433 unabhängig vom verwendeten Fitmodell für das jeweilige Lösungsmittel vergleichbare s -Werte lieferte. Um die Viskosität und Dichte von CSF mit höherer Präzision zu bestimmen, muss ein besser geeignetes Testmolekül verwendet werden.

Die Sedimentationsläufe von GFP wurden in PBS und CSF bei 45.000 rpm und $20 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt. Die verwendete Konzentration betrug jeweils 500 nM. Die Detektion erfolgte mit dem FDS. Die $c(s)$ -Verteilung der Sedimentationsprofile in PBS und CSF ergab, im Gegensatz zu den Messungen mit dem GFP-1433, verschiedene gewichtsgemittelte Formparameter für das GFP. Daher wurde zusätzlich eine Auswertung mittels GA-Analyse durchgeführt, um die individuellen Formparameter des in jeder Lösung auftretenden monomeren GFP zu vergleichen. Die Analyse erfolgte unter der Annahme der Dichte und Viskosität von PBS für beide Lösungsmittel. Die Analyse lieferte eine Hauptkomponente, die dem Monomer zugeordnet werden konnte ($> 70 \%$), und drei weitere Komponenten mit einem Anteil unter 18% (siehe Abbildung 7.2.2). Für eine Bestimmung der Dichte und Viskosität im CSF ist das GFP auch nicht besser geeignet als das GFP-1433, da es sich auch um ein Mehrkomponentensystem handelt. Die s -Werte des monomeren GFP zeigten ebenfalls wie in den Messungen des GFP-1433 eine Verschiebung im CSF (2,6 S) gegenüber dem PBS (2,9 S). Die GA-Analyse bestätigte die Auswertung der $c(s)$ -Analyse. Das f/f_0 des monomeren GFP ändert sich aufgrund des Lösungsmittels (1,1 in PBS, 1,3 in CSF). Daher kann nicht mehr davon ausgegangen werden, dass die gemessene Verschiebung im s -Wert nur von den Änderungen der Dichte und Viskosität des Lösungsmittels abhängt. Möglicherweise

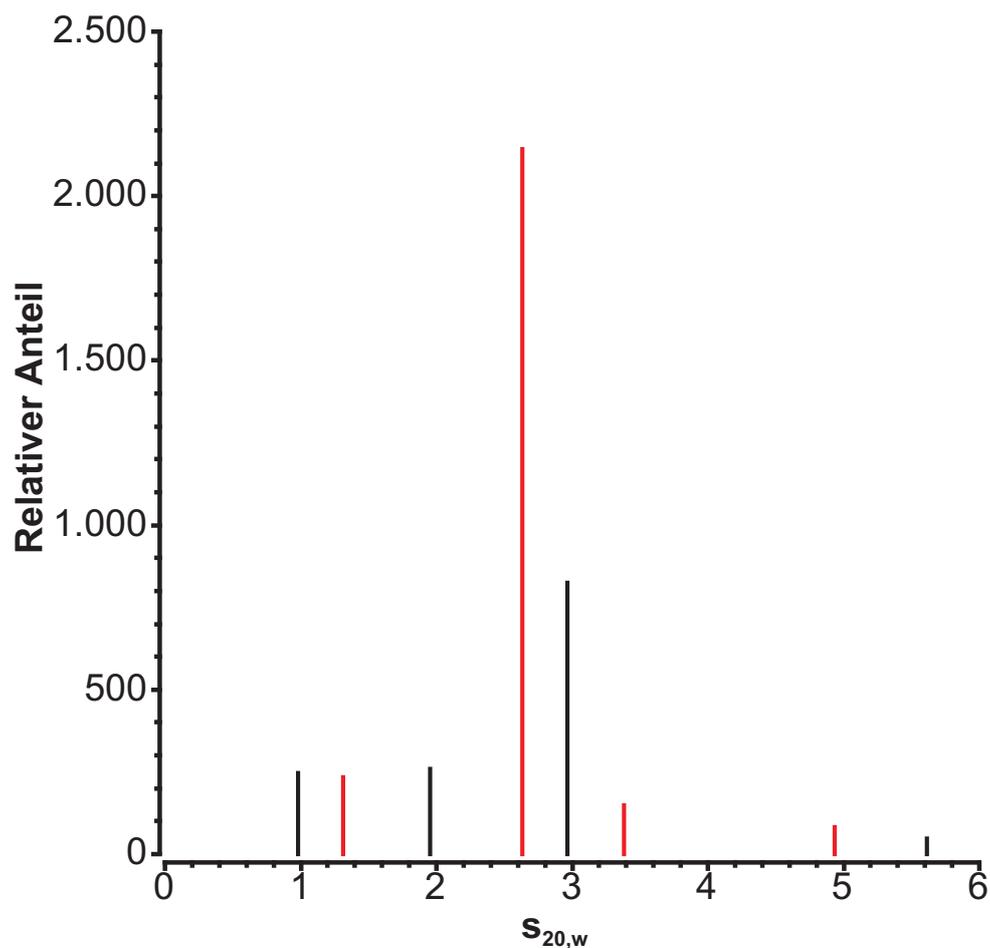


Abbildung 7.2.2: $s_{20,w}$ -Verteilung von GFP in PBS und CSF. Es wurden SV-Läufe von GFP in PBS (schwarz) und CSF (rot) bei 45.000 rpm und 20 °C durchgeführt. Die Detektion erfolgte mittels FDS. GFP wurde in einer Konzentration von 500 nM verwendet. Die Auswertung erfolgte mittels GA-Analyse unter der Annahme der Dichte und Viskosität von PBS.

weist das GFP eine andere Faltung im CSF auf als im PBS. Die gemessene s -Wertänderung von 0,3 S kann für das monomere GFP mit einer Masse von 28 kDa (basierend auf PBS-Messung) auf einer Änderung von f/f_0 um 0,2 beruhen. GFP ist nicht geeignet, um in diesem Versuchsaufbau die Viskosität oder Dichte des CSF zu bestimmen. Daher kann auch nicht geprüft werden, ob der Einfluss des HSA auf die Sedimentation großer und kleiner Partikel in gleichem Maße erfolgt.

In diesem Abschnitt konnte gezeigt werden, dass CSF eine höhere Viskosität und Dichte als PBS aufweist. Dies kann auf die Anwesenheit des vorhandenen HSA zurückgeführt werden [58]. Der Einfluss großer Mengen an gelöstem Protein kann daher nicht vernachlässigt werden, wenn Korrekturen apparent gemessener s -Werte auf $s_{20,w}$ -Werte erfolgen sollen. Über die SV-Analysen konnten zwar die Dichte und Viskosität nicht exakt bestimmt werden, aber in CSF gemessene apparente s -Werte können näherungsweise auf $s_{20,w}$ -Werte korrigiert werden. Um eine höhere Präzision in den AUZ-Messungen zu erreichen, ist die Verwendung anderer Testmoleküle sinnvoll. Es bieten sich z. B. synthetische Nanopartikeln an, die eine definierte Größe und Form aufweisen. Im Gegensatz zu Proteinen besteht bei diesen nicht die Gefahr einer lösungsmittelbedingten Umfaltung. Für eine exakte Bestimmung von Dichte und Viskosität ist allerdings die Verwendung eines Densitometers bzw. Viskosimeters zu bevorzugen.

7.3 A β 42 in CSF

Die physiologische Umgebung von A β 42 ist CSF. Es soll untersucht werden, ob zum CSF hinzugefügtes A β 42 die gleiche Oligomergrößenverteilung wie in NaP $_i$ aufweist. Außerdem soll überprüft werden, ob Komplexbildungen zwischen A β 42 und Bestandteilen des CSF (z. B. HSA, ApoE) stattfinden. Zu diesem Zweck wurde 0,5 μ M bzw. 1 μ M FITC-A β 42 in CSF gelöst. Anschließend wurden mit diesen Proben SV-Läufe unter Verwendung des FDS durchgeführt. Als Kontrolle wurde CSF ohne Zusätze mitgeführt. Außerdem wurde CSF mit einem Zusatz von 20 μ M DCVJ mitgeführt, um auf bereits vorhandene amyloide Strukturen zu testen. Die SV-Läufe wurden bei 50.000 rpm durchgeführt. Die $c(s)$ -Verteilung des im CSF gelösten FITC-A β 42 (1 μ M) ergab einen $s_{20,w}$ -Wert für das Monomer von 0,77 S mit einem Anteil von 94 %. Zwei weitere Spezies konnten mit einem Anteil von < 2 % bei 2 S und 4 S detektiert werden (siehe Abbildung 7.3.1). Aufgrund der geringen Anteile ist keine verlässliche $s_{20,w}$ -Wertbestimmung möglich. Es könnte sich bei der 2-S-Spezies um das bekannte Oligomer des FITC-A β 42 und bei der 4-S-Spezies um das HSA handeln. Die s -Werte wurden unter Annahme der zuvor berechneten Dichte und Viskosität des CSF korrigiert. Bezüglich der $s_{20,w}$ -Werte konnten keine Unterschiede zwischen den zwei getesteten Konzentrationen festgestellt werden. Die Messungen zeigten keine Komplexe des FITC-A β 42 mit CSF-Bestandteilen oder die Anwesenheit höherer Oligomere. Die Messungen im CSF zeigten keine Unterschiede zu den Messungen in NaP $_i$. Aus Zeitgründen wurden keine weiteren Messungen durchgeführt.

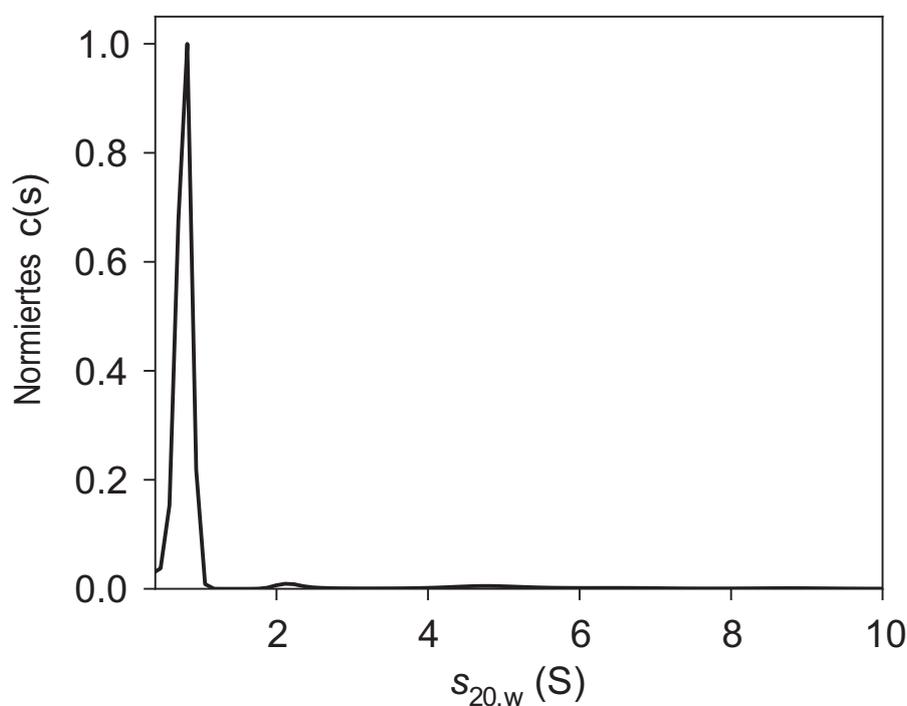


Abbildung 7.3.1: $c(s)$ -Verteilung von 1 μ M FITC-A β 42 in CSF. Der SV-Lauf wurde bei 50.000 rpm und 20 °C durchgeführt. Die s -Werte wurden unter Annahme der zuvor berechneten Dichte und Viskosität des CSF auf $s_{20,w}$ -Werte korrigiert. Die Verteilung ist auf das maximale $c(s)$ normiert.

8 Diskussion

Amyloid β ($A\beta$) spielt eine zentrale Rolle in der Progression der Alzheimerschen Demenz. Es ist Bestandteil der amyloiden Plaques, die sich im menschlichen Gehirn ablagern. Die löslichen Aggregate des $A\beta$ werden als Agens mit der toxischen Wirkung auf die Neuronen angesehen [59, 60]. Die Mechanismen der Oligomerisierung und Fibrillenbildung sind äußerst komplex und noch nicht vollständig aufgeklärt. In dieser Arbeit wurde die Aggregation des $A\beta_{42}$, dem proteolytischen Fragment des humanen APP mit der stärksten Aggregationsneigung, untersucht. Für die Untersuchung der Oligomergrößenverteilung von aggregierenden Proteinen ist die AUZ optimal geeignet. Es handelt sich um eine Absolutmethode, in der eine Fraktionierung der Probenlösung während der Messung erfolgt. Sie kann über einen weiten Konzentrationsbereich des zu untersuchenden Proteins eingesetzt werden (nanomolar bis millimolar). Weiterhin kann ein großer Bereich an Molekulargewichten von wenigen Kilodalton bis mehreren Megadalton erfasst werden.

8.1 Charakterisierung des monomeren $A\beta_{42}$ -Peptids

Durch Vorbehandlung des synthetischen $A\beta_{42}$ mit HFIP wurde sichergestellt, dass vorgeformte Aggregate in Monomere zerfallen. Die Behandlung mit organischen Lösungsmitteln ist eine verbreitete Methode, um aggregatfreies Ausgangsmaterial herzustellen [61, 62]. Da $A\beta_{42}$ in wässrigen Lösungen im physiologischen pH-Bereich aggregiert, ist eine Untersuchung des Monomers schwierig. Um die Aggregation im wässrigen System zu unterbinden, ist das Arbeiten im basischen pH-Bereich möglich [63]. Durchgeführte CD-Messungen zeigten ein stabiles Random-Coil-Spektrum über einen Zeitraum von 24 h. Da die Faltung von Proteinen durch pH-Änderungen beeinflusst wird, muss die Faltung des $A\beta_{42}$ unter physiologischen Bedingungen nicht mit der bei basischen pH-Werten vergleichbar sein. Zur Bestimmung der hydrodynamischen Parameter des monomeren $A\beta_{42}$ bei pH 7,4 wurden SV-Läufe durchgeführt. Um die Aggregation des $A\beta_{42}$ während der Messungen weitgehend zu unterdrücken, wurden die Messungen bei Temperaturen unter 20 °C durchgeführt. Die Methode erlaubte die Untersuchung von $A\beta_{42}$ -Mengen zwischen 5 und 280 μM . Für das Monomer konnten ein $s_{20,w}$ von 0,62 S und ein f/f_0 von 1,5 bestimmt werden. Daraus ließ sich ein hydrodynamischer Radius für das monomere $A\beta_{42}$ von 11 Å berechnen. Dies ist in guter Übereinstimmung mit Berechnungen aus Messungen mittels Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (9 Å [31]), AFM-Messungen (13 Å, abgebildet an Luft [64]) oder kapillarelektrophoretischen Messungen (18 Å [65]). Der Vorteil, der in der Bestimmung mittels AUZ liegt, beruht auf der direkten Messung der hydrodynamischen Parameter des Proteins in Lösung. Es werden keine Vergleichsmessungen oder Kalibrationsschritte benötigt. Aufgrund der Separation der Moleküle in der UZ ist eine Vorbehandlung der $A\beta_{42}$ -Probenlösung, z. B. Filtration durch einen Cut-off-Filter oder Größenausschlusschromatographie, nicht nötig. Dies ist z. B. für Streumethoden (dynamische Lichtstreuung) nötig, da polydisperse Lösungen zu breiten Verteilungen bei der Bestimmung hydrodynamischer Radien führen. Eine Fluoreszenzmarkierung, die Einfluss auf die Moleküleigenschaften des $A\beta_{42}$ nehmen könnte, wie bei der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie, ist ebenfalls nicht erforderlich.

8.2 Die Oligomerisierung

Da die Oligomere des A β 42 als das zytotoxische Agens im Verlauf der Alzheimerschen Demenz angesehen werden, sind sie für therapeutische Ansätze relevant [66]. Dem Begriff Oligomer wird in der Literatur kein definierter Größenbereich an A β 42-Aggregaten zugeordnet. Je nach Versuchsbedingungen sind in der Literatur verschiedene Oligomere beschrieben, die aus synthetischem Material hergestellt wurden, aus humanem Gewebe isoliert wurden oder in CSF oder Blut von Mensch oder Maus nachweisbar waren [67]. Die Frage, ob diese verschiedenen Oligomere auf dem Weg vom monomeren A β 42 zur Fibrille liegen („on pathway“), es sich um eine Art Speicherform handelt oder sie zu einem alternativen Aggregationsweg gehören („off pathway“), ist schwer zu beantworten. Zuweilen werden auch Oligomere detektiert, deren Bildung auf die Probenbehandlung zurückgeführt werden kann, wie Trimer und Tetramerbanden in der SDS-Page [68, 69]. In dieser Arbeit wurde sich auf die Identifizierung von Oligomeren konzentriert, die sich ausgehend von synthetischem monomeren A β 42 im Niedrigsalzpuffer (NaP_i) bilden. Die Untersuchung der Probenlösung mittels AUZ war dafür insofern geeignet, dass eine Vorbehandlung der Probenlösung nicht notwendig war. Des Weiteren handelt es sich bei diesem Trennsystem um ein Ein-Phasen-System. Wechselwirkungen des A β 42 mit Oberflächen und Grenzflächen sind dadurch auf ein Minimum reduziert. Eine Veränderung der Oligomerzusammensetzung der Probe durch die Messmethode kann weitgehend ausgeschlossen werden.

Die Frage nach dem Ablauf der Oligomerisierung des A β 42 beginnt mit der Suche nach dem kleinsten möglichen Oligomer. Das theoretisch kleinste Aggregat ist eine Zusammenlagerung von zwei Molekülen. Dimere des A β 42 sind in der Literatur beschrieben und werden als erster Schritt der Zusammenlagerung von A β 42-Molekülen auf dem Weg zu präfibrillären Strukturen diskutiert [70, 71]. Der Nachweis der Dimere in *ex-vivo*-Material bedarf zumeist der Behandlung des Ausgangsmaterials im Zuge der Analyse mit Tensiden. Eine Stabilisierung der Aggregate aufgrund des Tensids (vorrangig SDS) ist wahrscheinlich [60, 72]. Der Nachweis von Dimeren frei in Lösung ist schwierig und bisher nicht gezeigt. In *In-vitro*-Studien wird das Crosslinken von A β als Hilfsmittel eingesetzt, um Analysen des Dimers zu ermöglichen [73, 74]. In dieser Arbeit wurden SV-Läufe von A β 42 über einen Konzentrationsbereich von 100 nM bis 200 μ M durchgeführt. Es konnte in keiner Probe A β 42 in dimerer Form nachgewiesen werden. Der durchgeführte Molekulargewichtslauf mit OG488-A β 42 ließ sich mit einem Ein-Komponenten-Modell auswerten und lieferte ebenfalls keine Hinweise bezüglich einer zweiten Komponente. Der Molekulargewichtslauf wurde allerdings im basischen pH-Bereich durchgeführt, in dem A β 42 ohnehin ausschließlich als Monomer vorliegen sollte. Für A β 40 sind Molekulargewichtsläufe beschrieben, die Hinweise auf Dimere und Tetramere in Lösung bei pH 7 geben [75]. Die Simulationen von SV-Läufen mit 1:1-Monomer-Dimer-Mischungen zeigten, dass die Detektion eines Dimers theoretisch möglich ist. Versuche mit einem dimeren Cys-A β 40-Konstrukt belegten, dass das Dimer mit der Methode sich eindeutig vom Monomer unterscheiden lässt. Dies lässt den Schluss zu, dass unter den untersuchten Bedingungen kein dimeres A β 42 in detektierbarer Menge vorlag. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Konzentration eines Dimers zu gering ist, um in SV-Läufen neben dem Monomer detektiert zu werden. Die Analyse der simulierten Daten zeigte, dass ausgehend von 50 % Dimer in der *c(s)*-Verteilung nur 40 % ermittelt werden konnten. Daher ist anzunehmen, dass kleine Anteile an Dimer schwer bestimmbar sind.

Das kleinste detektierte Oligomer in dieser Arbeit konnte mit 2,56 S unter Verwendung der Absorptionsoptik bestimmte werden. In den SV-Läufen von fluoreszenzmarkiertem A β 42 konnte abhängig von der Art der Markierung ebenfalls ein Partikel in dieser Größenordnung (~ 2 S) detektiert werden. Es ist anzunehmen, dass es sich hierbei um das gleiche Oligomer handelt. Die Unterschiede im *s*-Wert beruhen vermutlich auf der fluorophorbedingten Änderung des partiell spezifischen Volumens und des Reibungskoeffizienten. Eine höhere Reibung bedingt einen kleineren *s*-Wert. Für das 2,56-S-Oligomer konnte unter Annahme einer globuläreren Form als der des Monomers eine Größe des Oligomers von fünf bis sieben A β 42-Einheiten angenommen werden.

Aufgrund des geringen Anteils von maximal 10 % in der Probe ist die Bestimmung der Form nicht exakt möglich. Unter der Annahme, dass sich die A β 42-Moleküle in möglichst dichter Packung anordnen, minimiert sich die Reibung des resultierenden Aggregates gegenüber der relativ gestreckten Form des Monomers (f/f_0 1,5). Unterstützt wird diese Vermutung durch die Beobachtung, dass mit zunehmender Oligomergröße (bis ca. 15 S) die Form kugelförmiger wird. In der Literatur beschriebene Oligomere, deren Größe häufig Vielfache von sechs darstellen, lassen den Schluss zu, dass ein hexamerer Baustein in der Aggregation des A β 42 eine Rolle spielt. Zu diesen gehören Dodekamere, wie das A β 56* [76], und „A β -derived diffusible ligands“ [59] sowie Aggregate von 90 kDa, bei denen es sich um Oktadekamere [77] handeln könnte. Bei dem in dieser Arbeit detektierten Oligomer könnte es sich um solch ein Hexamer handeln. In den SV-Läufen von A β 42 konnten neben dem Hexamer weitere distinkte Oligomere nachgewiesen werden, die aus einer Anzahl von 12 und 18 A β 42-Molekülen gebildet sein könnten. Größere Oligomere konnten nicht mit ausreichender Genauigkeit bestimmt werden, um Rückschlüsse auf eine genaue Stöchiometrie zu ziehen. Außerdem ist es bei zunehmender Molekülgröße nicht mehr mit ausreichender Präzision möglich, die Masse auf ein A β 42-Peptid genau zu bestimmen. Die detektierten Oligomere wiesen eine Zahl von etwa 22 bzw. 27 und 32 A β 42-Molekülen auf. Es könnte sich im Rahmen der Fehlergrenzen durchaus um Oligomere bestehend aus 24 und 30 Peptiden handeln. Für die Aggregation des A β 42 kann auf Basis dieser Daten angenommen werden, dass sie auf hexameren Bausteinen basiert. Sowohl Bitan et al. [78], durch Cross-linking-Versuche, als auch Bernstein et al. [79], durch massenspektrometrische Messungen, konnten Hexamere nachweisen. MD-Simulationen von Yun et al. [80] zeigen, dass Hexamere ein besonders stabiles Aggregat bestehend aus β -Barrelstrukturen bilden. Über die Konformation der A β 42-Moleküle innerhalb der Oligomere können aufgrund der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente nur wenige Aussagen getroffen werden. Die aufgenommenen CD-Spektren sind Ensemblemessungen. Informationen über die 10 % an Hexameren in der Lösung sind aus dem CD-Signal nicht zu erhalten. Es ist allerdings unwahrscheinlich, dass sich die Moleküle ohne Ausprägung einer definierteren Sekundärstruktur zu größeren Aggregaten zusammenlagern können. In SV-Läufen von unmarkiertem A β 42 konnten nach Zusatz von DCVJ nur Oligomere über 5 S (> 12 mer) detektiert werden. Im Gegensatz zum Hexamer scheinen diese Oligomere eine Sekundärstruktur vergleichbar mit amyloiden Proteinen aufzuweisen. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass die Hexamere möglicherweise keinen Bindeplatz mit ausreichender Größe für das DCVJ aufweisen. Um Aussagen über die Sekundärstruktur zu treffen, ist es notwendig, das Hexamer anzureichern.

Der relative Anteil des Hexamers in der Lösung blieb unabhängig von der Gesamtkonzentration an A β 42 nahezu konstant. Auch im nanomolaren Konzentrationsbereich konnte immer das Hexamer neben dem Monomer detektiert werden. Dies traf nicht auf größere Oligomere zu. Dies deutet auf ein mögliches schnelles Monomer-Hexamer-Gleichgewicht hin. Eine Isolation würde daher zum Zerfall des Hexamers führen. Untersuchungen können daher nur in Anwesenheit von einem hohen Anteil an Monomer durchgeführt werden, sofern keine chemischen Modifikationen (z. B. Crosslinking) durchgeführt werden. Dies führt die meisten Methoden an ihre Grenzen. Informationen über das Monomer-Hexamer-Gleichgewicht könnten auch durch eine Verringerung der Hexameremenge in Lösung gewonnen werden. Um das Gleichgewicht zugunsten des Monomers zu verschieben, muss die Konzentration vermutlich bis in den pikomolaren Konzentrationsbereich abgesenkt werden. Es konnte gezeigt werden, dass eine Absenkung der A β 42-Konzentration unter 3 μ M, wie von Nag et al. beschrieben [31], nicht ausreichend ist, sondern um wenigstens eine Größenordnung weiter gesenkt werden muss. Auf der anderen Seite zeigten die Experimente, dass eine Anreicherung des Hexamers praktisch nicht möglich ist. Ist eine bestimmte Menge erreicht, aggregiert dieses zu größeren Oligomeren. Dies spricht für das Hexamer als sogenannter Paranucleus, ein A β 42-Oligomer, das in einem frühen Stadium der Aggregation gebildet wird und ab einer bestimmten Konzentration in Lösung die Bildung von höheren Aggregaten fördert. Es handelt sich nicht um den Nucleus, der, wenn er gebildet wird, die Aggregation rasant vorantreibt. Denn die Messungen in dieser Arbeit wurden alle, betrachtet man die ThT-Kinetik, zu Beginn

der Lag-Phase durchgeführt. Eine Verschiebung des Gleichgewichtes konnte allerdings durch Änderungen der Messtemperatur beobachtet werden. Bei 30 °C war der Anteil gegenüber 10 °C deutlich erniedrigt. Dies unterstützt die Vermutung, dass ein Monomer-Hexamer-Gleichgewicht vorliegt.

Um weitere Informationen über den Verlauf der Oligomerisierung zu erhalten sollten, die AUZ-Messungen um SV-Läufe von Mischungen aus fluoreszenzmarkiertem und nicht markiertem A β 42 im nanomolaren Konzentrationsbereich ergänzt werden. Hier ist die Aggregation möglicherweise ausreichend verlangsamt, um auch über Oligomere oberhalb des 18mers statistisch gesicherte Größeninformationen zu erhalten. Die Verwendung der Mischungen stellt sicher, dass kein Selbstquenchen des Fluoreszenzfarbstoffes auftritt. Die Verwendung von DCVJ zur selektiven Markierung von Oligomeren wäre auch eine Möglichkeit. Wird dieses im deutlichen Unterschuss eingesetzt, kann die Massenzunahme durch die Anlagerung des Farbstoffmoleküls an das Oligomer vernachlässigt werden und eine Bestimmung des Molekulargewichtes erfolgen. Die mittels AUZ bestimmten hydrodynamischen Parameter sollten mit einer Vergleichsmethode verifiziert werden. Hier bieten sich Messungen mittels Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie an. A β 42 kann wie in der AUZ frei in Lösung untersucht werden und es kann im nanomolaren Konzentrationsbereich oder niedriger gearbeitet werden. Da es sich allerdings nicht um eine Fraktionierungsmethode handelt, können die Oligomere nur in Gegenwart der Monomere charakterisiert werden.

8.3 A β 42 und CSF

Um die physiologische Relevanz der unter den Pufferbedingungen gebildeten Oligomere des A β 42 zu untersuchen, wurden SV-Läufe von frisch gelöstem FITC-A β 42 in CSF durchgeführt. Die genaue Zusammensetzung des CSF war nicht bekannt. Es handelte sich um gepooltes CSF von Patienten ohne Demenzerkrankung. Durch Vorexperimente konnte gezeigt werden, dass die Dichte und Viskosität des CSF durch das enthaltene HSA beeinflusst wird. Eine genaue Bestimmung mittels AUZ war allerdings nicht möglich, da eine Bestimmung von Diffusionskoeffizienten der verwendeten Vergleichsproteine nicht hinreichend genau möglich war. Eine Korrektur der gemessenen s -Werte in CSF auf $s_{20,w}$ -Werte in den A β 42-Messungen konnte daher nur näherungsweise erfolgen. Dies ist problematisch, da eine fehlende Korrektur keine Angaben über die Masse eventuell bestimmter Oligomere ermöglicht. Eine Messung der Dichte und Viskosität sollte daher mittels Densitometer/Viskosimeter erfolgen, die eine ausreichende Präzision aufweisen. In den SV-Läufen des FITC-A β 42 wurden drei Spezies detektiert. Neben dem Monomer konnte in geringer Menge ($\sim 2\%$) ein 2-S-Partikel und ein 4-S-Partikel nachgewiesen werden. Der erstere könnte dem Hexamer aus den Messungen im NaP $_i$ entsprechen. Dies zeigt, dass das Monomer-Hexamer-Gleichgewicht auch im CSF vorliegt. Die zweite Spezies kann auf das HSA, die Hauptprotein-komponente im CSF, zurückgeführt werden, da dieses aufgrund der Eigenfluoreszenz mittels FDS detektierbar ist. Größere Spezies konnten nicht nachgewiesen werden. *In-vitro*-Studien von Milojevic et al. [81] zeigten, dass Komplexe bevorzugt zwischen HSA und A β 42-Oligomeren gebildet werden. Die Bindung des monomeren A β 42 weist dagegen eine deutlich höhere Dissoziationskonstante (K_D) auf ($K_D > 1\ \mu\text{M}$ für Monomerbindung, $K_D \sim 100\ \text{nM}$ für Oligomerbindung). Auf Basis der K_D liegt die zu erwartende Konzentration an A β 42-HSA-Komplexen unterhalb der Nachweisgrenze. Des Weiteren bedingt die Anlagerung von einem oder zwei Molekülen A β 42 pro Molekül HSA nur eine geringe Änderung im s -Wert. Der detektierte 4-S-Partikel könnte also sowohl dem freien als auch gebundenen HSA entsprechen. Dies kann unter den Messbedingungen nicht unterschieden werden. Die Detektion von A β 42-Oligomer-HSA-Komplexen setzt eine Aggregation des zum CSF gegebenen FITC-A β 42 voraus. In ThT-Messungen konnte gezeigt werden, dass die Aggregation des A β 42 durch verschiedene Salze und Proteine im CSF beeinflusst wird. Eine Vorhersage der Aggregation im CSF im Gegensatz zum Puffersystem ist aufgrund der Komplexität des CSF nicht möglich. ThT-Kinetiken in aCSF deuten auf eine verlangsamte Aggregation des A β 42 in CSF hin. Für eine Oligomerbildung bedarf es möglicherweise eines län-

geren Beobachtungszeitraumes. Hier sind weitere Messungen nötig. Eine weitere Problematik bei der Untersuchung von Oligomeren unter Verwendung von fluoreszenzmarkiertem A β 42 ist der zu beobachtende Effekt des Selbstquenchens. Der Anteil von markiertem A β 42 zu unmarkiertem A β 42 beeinflusst, welche Größe an Oligomeren mit ausreichendem Signal-/Rausch-Verhältnis noch detektiert werden können. Daher kann in den Versuchen mit 100 % markiertem Material nicht ausgeschlossen werden, dass die fehlende Detektion größerer Oligomere auf Quenchen zurückzuführen ist.

Pitschke et al. [82] zeigten, dass A β 42-Aggregate in CSF von Patienten mit Alzheimer-Erkrankung nach Zugabe von fluoreszenzmarkiertem A β 42 mittels Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie nachgewiesen werden können. Da sich Erkrankungen auf die Zusammensetzung des CSF auswirken, wäre es theoretisch denkbar, bereits bestehende A β 42-Aggregate im CSF von Patienten mit Alzheimerscher Demenz nachträglich zu markieren und zu analysieren. Ob diese Aggregate aus Monomeren entstanden sind oder durch den Zerfall von größeren Strukturen, müsste in diesem Fall zusätzlich untersucht werden. Um die Frage der physiologischen Relevanz der im Puffer detektierten A β 42-Oligomere zu klären, müssen noch weitere Messungen in verschiedenen CSF-Proben und über längere Inkubationszeiträume durchgeführt werden.

8.4 Der mögliche Mechanismus der Oligomerbildung des A β 42

Eine der Hauptfragestellungen, die in dieser Arbeit angegangen werden sollte, war die nach der Bildung der frühen A β 42-Aggregate. Es konnte gezeigt werden, dass es ausgehend von monomerer A β 42-Lösung zur Bildung von Hexameren kommt. Wie bereits diskutiert wurde, stehen diese im Gleichgewicht mit den Monomeren. Wird eine bestimmte Konzentration an Hexameren überschritten, bilden sich Oligomere, die auf einem Vielfachen von sechs aufbauen könnten. Experimente in CSF zeigten, dass auch hier zumindest Monomer und Hexamer nachweisbar sind. Bei A β 42 handelt es sich um ein Protein mit starker Aggregationsneigung. Eine Vielzahl von unterschiedlichen Oligomeren werden vermutlich *in vivo* gebildet. Die Oligomerbildung ist nicht nur abhängig von der Zusammensetzung des CSF, sondern z. B. auch von der Interaktion mit den Oberflächen der Nervenzellen. In Zellen resorbiertes A β 42 kann aufgrund der dort vorherrschenden Bedingungen (Crowdingeffekt, pH-Änderungen) möglicherweise andere Oligomergrößen bilden [83]. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente lassen sich am besten mit der extrazellulären Situation im menschlichen Gehirn vergleichen. Abbildung 8.4.1 zeigt zusammengefasst den Bildungsweg der frühen Oligomere, der auf Basis der Experimente in dieser Arbeit diskutiert wurde. Bis zur Bildung des 18mers konnte die Oligomerisierung untersucht werden. Über größere Oligomere konnten keine statistisch gesicherten Aussagen getroffen werden. Die Ergebnisse deuten aber auf weitere Oligomere hin, die aus hexameren Einheiten aufgebaut sein könnten. Ob die nachgewiesenen Oligomere zu Fibrillen („on pathway“) oder amorphen Aggregaten („off pathway“) weiter aggregieren, kann auf Basis der Untersuchungen nicht geklärt werden. Durchgeführte ThT-Assays und AFM-Messungen zeigten jedoch, dass das verwendete synthetische Material auch fluoreszenzmarkiert in der Lage ist, fibrilläre Strukturen zu bilden. Die hier gewonnenen Erkenntnisse über die Aggregation des A β 42 können zum Verständnis der Alzheimerschen Demenz beitragen und ermöglichen vielleicht weitere Ideen für therapeutische Ansätze. Die Gewinnung weiterer Daten über die gebildeten Oligomere könnte für das Fitten von mathematischen Modellen zum Ablauf der Aggregation verwendet werden. Dadurch könnten Informationen über Gleichgewichts- und Geschwindigkeitskonstanten in der Aggregation des A β 42 gewonnen werden [84]. Sinnvoll ist eine Ausweitung der Untersuchungen auf andere proteolytische Fragmente des APP, z. B. A β 40. Es könnten nicht nur die Mechanismen der Aggregation der verschiedenen APP-Fragmente näher untersucht werden, sondern auch deren mögliche gegenseitige Beeinflussung, denn physiologisch sind z. B. A β 40 und A β 42 nebeneinander im CSF nachweisbar.

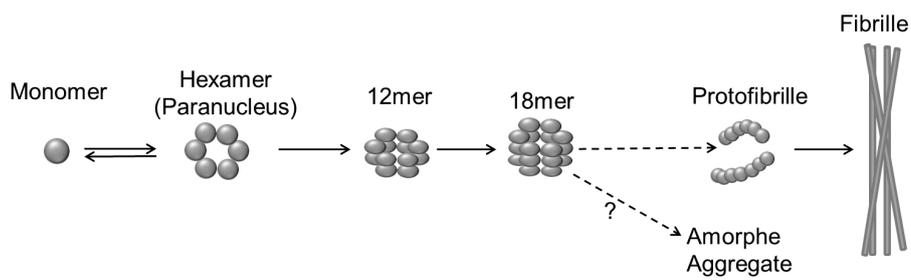


Abbildung 8.4.1: Schematische Darstellung der Oligomerisierung des A β 42. Auf Basis der Ergebnisse dieser Arbeit ist der Bildungsweg der frühen A β 42-Oligomere dargestellt. Die Oligomerisierung erfolgt auf Basis hexamerer Bausteine. Die weitere Oligomerisierung könnte sowohl zur Bildung von Fibrillen als auch amorphen Aggregaten führen.

9 Zusammenfassung

Die Alzheimersche Demenz spielt in einer Gesellschaft mit immer älter werdender Bevölkerung eine immer größere Rolle. Um die Entstehung dieser Krankheit besser zu verstehen, unterstehen die mit dieser Krankheit assoziierten Proteine einer genauen Untersuchung. Die A β -Peptide werden in der Literatur als die Peptide diskutiert, die für die toxische Wirkung auf die Neuronen verantwortlich sind. Um das grundlegende Verständnis über diese Peptide zu vertiefen, wurde die Oligomerisierung des 42 Aminosäuren langen A β -Peptids (A β 42), das stark zur Selbstaggregation neigt, untersucht. Als Untersuchungsmethode wurde die Analytische Ultrazentrifugation (AUZ) verwendet. Diese bietet als Absolutmethode für aggregierende Systeme mit einer breiten Verteilung an Oligomeren die beste Möglichkeit, um sowohl Monomere als auch distinkte Oligomere in Gegenwart größerer Aggregate in Lösung zu identifizieren und charakterisieren. Es wurde die Aggregatgrößenverteilung des A β 42-Peptids in wässriger Lösung über einen mehr als vier Größenordnungen umfassenden Konzentrationsbereich analysiert. Die erhaltenen *s*-Wertverteilungen waren bimodal mit einem Monomeranteil bei 0,62 S, der mit steigender Ausgangskonzentration abnahm, und einem Oligomeranteil, der von 4 bis 20 S reichte. Innerhalb der Oligomerfraktion ließen sich zwei distinkte Spezies mit 4,7 S und 6,4 S identifizieren, die einem 10 bis 12mer und 16 bis 18mer entsprechen. Als weitere Oligomerspezies konnte ein Penta- bis Heptamer bei 2,5 S identifiziert werden. Dieses steht bei submikromolarer Ausgangskonzentration im Gleichgewicht mit dem Monomer. Die AUZ-Messungen lassen vermuten, dass die Oligomerisierung des A β 42 auf einem hexameren Grundbaustein beruht, da Hexamere, Dodekamere und Oktadekamere in Lösung nachgewiesen werden konnten. Weiterhin konnte erfolgreich das Fluoreszenzdetektionssystem für AUZ-Messungen etabliert werden, um Messungen von nanomolaren Konzentrationen an A β 42 zu ermöglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die Methode der AUZ für eine Charakterisierung der Oligomergrößenverteilung nicht nur in einfachem Puffer geeignet ist. Die Verwendung des Fluoreszenzdetektionssystems ermöglicht das Messen direkt in humanen Körperflüssigkeiten wie Cerebrospinalflüssigkeit (CSF). Es konnte gezeigt werden, dass in CSF nach Zusatz von fluoreszenzmarkiertem A β 42 dieses nachweisbar ist. Dies ermöglicht in Zukunft die Untersuchung der Oligomerisierung des A β 42 in seiner natürlichen Umgebung und ermöglicht Rückschlüsse auf Wechselwirkungen des A β 42 mit CSF-Bestandteilen.

10 Summary

In a population with an increasing number of elderly people, Alzheimer's Disease plays an important role. Related proteins are investigated to gain a better understanding of the development of this disease. In the literature $A\beta$ peptides are discussed to be the neurotoxic agent. The 42 amino acid long $A\beta$ peptide ($A\beta_{42}$), which is strongly prone to aggregation, was investigated to deepen the understanding of the effect of these peptides. As analysing method Analytical Ultracentrifugation (AUC) has been chosen. AUC is a first principle method. It is perfectly suited to analyse monomers and distinct oligomers beside larger aggregates in an aggregating system with a broad distribution of oligomers. Oligomer size distributions of solutions of $A\beta_{42}$ in aqueous buffers with a concentration range of four orders of magnitude were analysed. The resulting s -value distributions were bimodal and showed a monomeric fraction at 0.62 S, decreasing with increasing concentration, and an oligomeric fraction ranging from 4 S to 10 S. In the oligomeric fraction, two distinct species could be identified with 4.7 S and 6.4 S corresponding to a 10 to 12mer and a 16 to 18mer. Furthermore an oligomeric species with 2.5 S corresponding to a pentamer to heptamer could be identified. This oligomer was found to exist in equilibrium with the monomeric $A\beta$ in submicromolar concentrations. From AUC measurements the conclusion can be drawn that $A\beta_{42}$ aggregation bases on a hexameric building block because hexamers, dodecamers and octadecamers could be identified in solution. Furthermore the fluorescence detection system for AUC measurements could be established for measurements in the nanomolar concentration range of $A\beta_{42}$. The fluorescence detection system provides the ability to measure directly in human body fluids like cerebrospinal fluid (CSF). It was shown that it is possible to identify fluorescently labelled $A\beta_{42}$ after spiking the CSF. With this technique it will be possible to analyse $A\beta_{42}$ oligomerisation in its natural environment and draw conclusions regarding the interactions between $A\beta_{42}$ and CSF components.

11 Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

12 Danksagung

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Willbold für die Möglichkeit der Promotion in seiner Abteilung. Bei Frau Dr. Nagel-Steger möchte ich mich für die Betreuung und die vielen Diskussionen bedanken, die mich während der Arbeit vorangebracht haben. Ich möchte mich bei Christina Decker und Stephanie Schiefer für die Unterstützung im Labor und der ganzen Arbeitsgruppe Nagel-Steger für die schöne Zeit bedanken.

Mein Dank gilt weiterhin meiner besseren Hälfte Astrid Gerling, die mich in der Zeit der Promotion und vor allem beim Schreiben immer wieder motiviert hat.

Literaturverzeichnis

- [1] PRINCE, M. ; ALBANESE, E. ; GUERCHET, M. ; PRINA, M.: World Alzheimer Report 2014. Alzheimer's Disease International (ADI), London, 2014
- [2] FINDER, V. H. ; GLOCKSHUBER, R.: Amyloid-beta; Aggregation. In: *Neurodegenerative Diseases* 4 (2007), Nr. 1, S. 13–27
- [3] HARDY, JA ; HIGGINS, GA: Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. In: *Science* 256 (1992), Nr. 5054, S. 184–185
- [4] PEDERSEN, J. T. ; TEILUM, K. ; HEEGAARD, N. H. H. ; ØSTERGAARD, J. ; ADOLPH, H.-W. ; HEMMINGSEN, L.: Rapid Formation of a Preoligomeric Peptide-Metal-Peptide Complex Following Copper(II) Binding to Amyloid β Peptides. In: *Angewandte Chemie International Edition* 50 (2011), Nr. 11, S. 2532–2535
- [5] MARKESBERY, W. R.: Oxidative Stress Hypothesis in Alzheimer's Disease. In: *Free Radical Biology and Medicine* 23 (1997), Nr. 1, S. 134–147
- [6] HAMLEY, I. W.: The amyloid beta peptide: a chemist's perspective. Role in Alzheimer's and fibrillization. In: *Chemical reviews* 112 (2012), Nr. 10, S. 5147–92
- [7] SAVELIEFF, M. G. ; DETOMA, A. S. ; DERRICK, J. S. ; LIM, M. H.: The Ongoing Search for Small Molecules to Study Metal-Associated Amyloid- β Species in Alzheimer's Disease. In: *Accounts of Chemical Research* 47 (2014), Nr. 8, S. 2475–2482
- [8] STANYON, H. F. ; VILES, J. H.: Human serum albumin can regulate Amyloid-beta peptide fiber growth in the brain interstitium. Implications for Alzheimer's Disease. In: *The Journal of biological chemistry* (2012)
- [9] TAKAMURA, A. ; KAWARABAYASHI, T. ; YOKOSEKI, T. ; SHIBATA, M. ; MORISHIMA-KAWASHIMA, M. ; SAITO, Y. ; MURAYAMA, S. ; IHARA, Y. ; ABE, K. ; SHOJI, M. ; MICHIKAWA, M. ; MATSUBARA, E.: Dissociation of beta-amyloid from lipoprotein in cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease accelerates beta-amyloid-42 assembly. In: *J Neurosci Res* 89 (2011), Nr. 6, S. 815–21
- [10] PHILO, J. S.: Is any measurement method optimal for all aggregate sizes and types? In: *The AAPS Journal* 8 (2006), Nr. 3, S. E564–E571
- [11] MAHLER, H.-C. ; FRIESS, W. ; GRAUSCHOPF, U. ; KIESE, S.: Protein aggregation: Pathways, induction factors and analysis. In: *Journal of Pharmaceutical Sciences* 98 (2009), Nr. 9, S. 2909–2934
- [12] MAECHTLE, W. ; BOERGER, L.: In: BARTH, G. (Hrsg.): *Analytical Ultracentrifugation of Polymers and Nanoparticles*. Springer-Verlag, 2006
- [13] SVEDBERG, T. ; PEDERSEN, K. O.: "The Ultracentrifuge". In: *Oxford University Press, London* (1940)
- [14] LAMM, O.: *Die Differentialgleichung der Ultrazentrifugierung*. Almqvist & Wiksell, 1929 (Arkiv för Matematik, Astronomi och Fysik)
- [15] BECKMANCOULTER: TM ProteomeLab TM XL-A/XL-I, Protein Characterization System. Instruction Manual. Centrifuge Instrument Systems Development Center of Beckman Coulter Inc., Palo Alto, California, 2003
- [16] KINGSBURY, J. S. ; LAUE, T. M.: Chapter ten - Fluorescence-Detected Sedimentation in Dilute and Highly Concentrated Solutions. In: M. L. JOHNSON, J. M. H. (Hrsg.) ; ACKERS, G. K. (Hrsg.): *Biothermodynamics, Part D* Bd. 492. Academic Press, 2011, S. 283 – 304

- [17] LAUE, T.M. ; SHAH, B.D. ; RIDGEWAY, T.M. ; PELLETIER, S.L.: In: HARDING, S. (Hrsg.) ; ROWE, A. (Hrsg.): *Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science*. Royal Society of Chemistry, 1992, S. 90–125
- [18] COHN, E. J. ; EDSALL, J. T. ; KIRKWOOD, J. G. ; MUELLER, H. ; ONCLEY, J. L. ; SCATCHARD, G.: Proteins, amino acids and peptides as Ions and Dipolar Ions. In: *The American Journal of the Medical Sciences* 205 (1943), Nr. 6, S. 884
- [19] DURCHSCHLAG, H.: Specific Volumes of Biological Macromolecules and Some Other Molecules of Biological Interest. In: HINZ, H.-J. (Hrsg.): *Thermodynamic Data for Biochemistry and Biotechnology*. Springer Berlin Heidelberg, 1986. – ISBN 978-3-642-71116-9, S. 45–128
- [20] SCHUCK, P.: Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. In: *Biophys J* 78 (2000), Nr. 3, S. 1606–19
- [21] DEMELER, B. ; BROOKES, E. ; NAGEL-STEGER, L.: Chapter 4 Analysis of Heterogeneity in Molecular Weight and Shape by Analytical Ultracentrifugation Using Parallel Distributed Computing. 454 (2009), S. 87–113
- [22] DEMELER, B.: Methods for the design and analysis of sedimentation velocity and sedimentation equilibrium experiments with proteins. In: *Curr Protoc Protein Sci* Chapter 7 (2010), S. Unit 7 13
- [23] GREENFIELD, N. ; FASMAN, G. D.: Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. In: *Biochemistry* 8 (1969), Nr. 10, S. 4108–16
- [24] BIANCALANA, M. ; KOIDE, S.: Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1804 (2010), Nr. 7, S. 1405 – 1412
- [25] SEREM, W. K. ; BETT, C. K. ; NGUNJIRI, J. N. ; GARNO, J. C.: Studies of the growth, evolution, and self-aggregation of beta-amyloid fibrils using tapping-mode atomic force microscopy. In: *Microsc Res Tech* 74 (2011), Nr. 7, S. 699–708
- [26] HARDER, A.: Kraftmikroskopische und kraftspektroskopische Untersuchungen an Proteoglykanen. In: *Diplomarbeit, Universitaet Bielefeld* (2009)
- [27] GILL, S. C. ; HIPPEL, P. H.: Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. In: *Anal Biochem* 182 (1989), Nr. 2, S. 319–26
- [28] CRESCENZI, O. ; TOMASELLI, S. ; GUERRINI, R. ; SALVADORI, S. ; D'URSI, A. M. ; TEMUSSI, P. A. ; PICONE, D.: Solution structure of the Alzheimer amyloid β -peptide (1-42) in an apolar microenvironment. In: *European Journal of Biochemistry* 269 (2002), Nr. 22, S. 5642–5648
- [29] YOSHIDA, K. ; YAMAGUCHI, T. ; ADACHI, T. ; OTOMO, T. ; MATSUO, D. ; TAKAMUKU, T. ; NISHI, N.: Structure and dynamics of hexafluoroisopropanol-water mixtures by x-ray diffraction, small-angle neutron scattering, NMR spectroscopy, and mass spectrometry. In: *The Journal of Chemical Physics* 119 (2003), Nr. 12, S. 6132–6142
- [30] SRINIVASAN, R. ; JONES, E. M. ; LIU, K. ; GHISO, J. ; MARCHANT, R. E. ; ZAGORSKI, M. G.: pH-Dependent Amyloid and Protofibril Formation by the ABri Peptide of Familial British Dementia. In: *Journal of Molecular Biology* 333 (2003), Nr. 5, S. 1003 – 1023
- [31] NAG, S. ; SARKAR, B. ; BANDYOPADHYAY, A. ; SAHOO, B. ; SREENIVASAN, V. K. ; KOMBRABAIL, M. ; MURALIDHARAN, C. ; MAITI, S.: Nature of the amyloid-beta monomer and the monomer-oligomer equilibrium. In: *J Biol Chem* 286 (2011), Nr. 16, S. 13827–33
- [32] ARIMON, M. ; DÍEZ-PÉREZ, I. ; KOGAN, M. J. ; DURANY, N. ; GIRALT, E. ; SANZ, F. ; FERNÁNDEZ-BUSQUETS, X.: Fine structure study of A β 1-42 fibrillogenesis with atomic force microscopy. In: *The FASEB Journal* (2005)
- [33] O'NUALLAIN, B. ; FREIR, D. B. ; NICOLL, A. J. ; RISSE, E. ; FERGUSON, N. ; HERRON, C. E. ; COLLINGE, J. ; WALSH, D. M.: Amyloid beta-protein dimers rapidly form stable synaptotoxic protofibrils. In: *J Neurosci* 30 (2010), Nr. 43, S. 14411–9

- [34] GARZON-RODRIGUEZ, W. ; SEPULVEDA-BECERRA, M. ; MILTON, S. ; GLABE, C. G.: Soluble Amyloid A β -(1-40) Exists as a Stable Dimer at Low Concentrations. In: *Journal of Biological Chemistry* 272 (1997), Nr. 34, S. 21037–21044
- [35] ERICKSON, H. P.: Size and Shape of Protein Molecules at the Nanometer Level Determined by Sedimentation, Gel Filtration, and Electron Microscopy. In: *Biological Procedures Online* 11 (2009), S. 32–51
- [36] EILERS, P. H. ; GOEMAN, J. J.: Enhancing scatterplots with smoothed densities. In: *Bioinformatics* 20 (2004), Nr. 5, S. 623–8
- [37] FALLER, P. ; HUREAU, C. ; BERTHOUMIEU, O.: Role of Metal Ions in the Self-assembly of the Alzheimer's Amyloid-beta Peptide. In: *Inorganic chemistry* (2013)
- [38] MANDAL, R. ; GUO, A. C. ; CHAUDHARY, K. K. ; LIU, P. ; YALLOU, F. S. ; DONG, E. ; AZIAT, F. ; WISHART, D. S.: Multi-platform characterization of the human cerebrospinal fluid metabolome: a comprehensive and quantitative update. In: *Genome medicine* 4 (2012), Nr. 4, S. 38
- [39] KLEMENT, K. ; WIELIGMANN, K. ; MEINHARDT, J. ; HORTSCHANSKY, P. ; RICHTER, W. ; FANDRICH, M.: Effect of different salt ions on the propensity of aggregation and on the structure of Alzheimer's abeta(1-40) amyloid fibrils. In: *Journal of Molecular Biology* 373 (2007), Nr. 5, S. 1321–33
- [40] BRANNSTROM, K. ; OHMAN, A. ; LINDHAGEN-PERSSON, M. ; OLOFSSON, A.: Ca²⁺ enhances Abeta polymerization rate and fibrillar stability in a dynamic manner. In: *The Biochemical journal* (2012)
- [41] LUO, J. ; MARÉCHAL, J. ; WAERMLAENDER, S. ; GRAESLUND, A. ; PERÁLVAREZ-MARÍN, A.: In Silico Analysis of the Apolipoprotein E and the Amyloid β Peptide Interaction: Misfolding Induced by Frustration of the Salt Bridge Network. In: *PLoS Computational Biology* 6 (2010), Nr. 2, S. e1000663
- [42] JONES, P. B. ; ADAMS, K. W. ; ROZKALNE, A. ; SPIRES-JONES, T. L. ; HSHIEH, T. T. ; HASHIMOTO, T. ; ARMIN, C. A. F. ; MIELKE, M. ; BACSKAI, B. J. ; HYMAN, B. T.: Apolipoprotein E: Isoform Specific Differences in Tertiary Structure and Interaction with Amyloid- β in Human Alzheimer Brain. In: *PloS one* 6 (2011), Nr. 1, S. e14586
- [43] SCHMIDT, C. ; BECKER, H. ; ZERR, I.: Cerebrospinal Fluid Apolipoprotein E Concentration and Severity of Cognitive Impairment in Patients With Newly Diagnosed Alzheimer's Disease. In: *American journal of Alzheimer's disease and other dementias* (2013)
- [44] MOK, Y. F. ; RYAN, T. M. ; YANG, S. ; HATTERS, D. M. ; HOWLETT, G. J. ; GRIFFIN, M. D.: Sedimentation velocity analysis of amyloid oligomers and fibrils using fluorescence detection. In: *Methods* 54 (2011), Nr. 1, S. 67–75
- [45] ZHAO, H. ; MAYER, M. L. ; SCHUCK, P.: Analysis of protein interactions with picomolar binding affinity by fluorescence-detected sedimentation velocity. In: *Analytical chemistry* 86 (2014), Nr. 6, S. 3181–7
- [46] ZHAO, H. ; CASILLAS, JR. E. ; SHROFF, H. ; PATTERSON, G. H. ; SCHUCK, P.: Tools for the quantitative analysis of sedimentation boundaries detected by fluorescence optical analytical ultracentrifugation. In: *PloS one* 8 (2013), Nr. 10, S. e77245
- [47] LINDGREN, M. ; SORGJERD, K. ; HAMMARSTROM, P.: Detection and characterization of aggregates, prefibrillar amyloidogenic oligomers, and protofibrils using fluorescence spectroscopy. In: *Biophysical journal* 88 (2005), Nr. 6, S. 4200–12
- [48] RUSINOVA, E. ; TRETYACHENKO-LADOKHINA, V. ; VELE, O. E. ; SENEAR, D. F. ; ROSS, A. J. B.: Alexa and Oregon Green dyes as fluorescence anisotropy probes for measuring protein-protein and protein-nucleic acid interactions. In: *Analytical Biochemistry* 308 (2002), Nr. 1, S. 18–25

- [49] TSIEN, R. Y. ; ERNST, L. ; WAGGONER, A.: Fluorophores for Confocal Microscopy: Photophysics and Photochemistry. In: PAWLEY, J. B. (Hrsg.): *Handbook fo Biological Confocal Microscopy*. Springer SpringerScience+Business Media, New York, 2006, S. 338–351
- [50] JANG, S. ; SHIN, S.: Computational study on the structural diversity of amyloid Beta Peptide (abeta(10-35)) oligomers. In: *The journal of physical chemistry. B* 112 (2008), Nr. 11, S. 3479–84
- [51] NAGEL-STEGER, L. ; DEMELER, B. ; MEYER-ZAIKA, W. ; HOCHDORFFER, K. ; SCHRADER, T. ; WILLBOLD, D.: Modulation of aggregate size- and shape-distributions of the amyloid-beta peptide by a designed beta-sheet breaker. In: *European biophysics journal : EBJ* 39 (2010), Nr. 3, S. 415–22
- [52] QUINN, S. D. ; DALGARNO, P. A. ; CAMERON, R. T. ; HEDLEY, G. J. ; HACKER, C. ; LUCOCQ, J. M. ; BAILLIE, G. S. ; SAMUEL, I. D. ; PENEDO, J. C.: Real-time probing of beta-amyloid self-assembly and inhibition using fluorescence self-quenching between neighbouring dyes. In: *Molecular bioSystems* 10 (2014), Nr. 1, S. 34–44
- [53] MEHTA, P. D. ; PIRTTILA, T. ; PATRICK, B. A. ; BARSHATZKY, M. ; MEHTA, S. P.: Amyloid β protein 1-40 and 1-42 levels in matched cerebrospinal fluid and plasma from patients with Alzheimer disease. In: *Neuroscience Letters* 304 (2001), Nr. 1-2, S. 102–106
- [54] JOHNSTON, J. P. ; OGSTON, A. G.: A boundary anomaly found in the ultracentrifugal sedimentation of mixtures. In: *Trans. Faraday Soc.* 42 (1946), S. 789–799
- [55] DEMEULE, B. ; SHIRE, S. J. ; LIU, J.: A therapeutic antibody and its antigen form different complexes in serum than in phosphate-buffered saline: a study by analytical ultracentrifugation. In: *Analytical Biochemistry* 388 (2009), Nr. 2, S. 279–87
- [56] TSIEN, R. Y.: The green fluorescent protein. In: *Annual review of biochemistry* 67 (1998), S. 509–44
- [57] LEBOWITZ, J. ; LEWIS, M. S. ; SCHUCK, P.: Modern analytical ultracentrifugation in protein science: A tutorial review. In: *Protein Science* 11, Nr. 9, S. 2067–2079
- [58] BRYDON, H. L. ; HAYWARD, R. ; HARKNESS, W. ; BAYSTON, R.: Physical properties of cerebrospinal fluid of relevance to shunt function. 1: The effect of protein upon CSF viscosity. In: *British journal of neurosurgery* 9 (1995), Nr. 5, S. 639–44
- [59] LAMBERT, M. P. ; BARLOW, A. K. ; CHROMY, B. A. ; EDWARDS, C. ; FREED, R. ; LIOSATOS, M. ; MORGAN, T. E. ; ROZOVSKY, I. ; TROMMER, B. ; VIOLA, K. L. ; WALS, P. ; ZHANG, C. ; FINCH, C. E. ; KRAFFT, G. A. ; KLEIN, W. L.: Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β (1-42) are potent central nervous system neurotoxins. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (1998), Nr. 11, S. 6448–6453
- [60] WALSH, D. M. ; KLYUBIN, I. ; FADEEVA, J. V. ; CULLEN, W. K. ; ANWYL, R. ; WOLFE, M. S. ; ROWAN, M. J. ; SELKOE, D. J.: Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation *in-vivo*. In: *Nature* 416 (2002), Nr. 6880, S. 535–539
- [61] STINE, W. B. ; DAHLGREN, K. N. ; KRAFFT, G. A. ; LADU, M. J.: In Vitro Characterization of Conditions for Amyloid- β Peptide Oligomerization and Fibrillogenesis. In: *Journal of Biological Chemistry* 278 (2003), Nr. 13, S. 11612–11622
- [62] BROERSEN, K. ; JONCKHEERE, W. ; ROZENSKI, J. ; VANDERSTEEN, A. ; PAUWELS, K. ; PASTORE, A. ; ROUSSEAU, F. ; SCHYMKOWITZ, J.: A standardized and biocompatible preparation of aggregate-free amyloid beta peptide for biophysical and biological studies of Alzheimer’s disease. In: *Protein Engineering Design and Selection* 24 (2011), Nr. 9, S. 743–750
- [63] FEZOU, Y. ; HARTLEY, D. M. ; HARPER, J. D. ; KHURANA, R. ; WALSH, D. M. ; CONDRON, M. M. ; SELKOE, D. J. ; LANSBURY, P. T. ; FINK, A. L. ; TELOW, D. B.: An improved

- method of preparing the amyloid β -protein for fibrillogenesis and neurotoxicity experiments. In: *Amyloid* 7 (2000), Nr. 3, S. 166–178
- [64] GIUFFRIDA, M. L. ; CARACI, F. ; PIGNATARO, B. ; CATALDO, S. ; DE BONA, P. ; BRUNO, V. ; MOLINARO, G. ; PAPPALARDO, G. ; MESSINA, A. ; PALMIGIANO, A. ; GAROZZO, D. ; NICOLETTI, F. ; RIZZARELLI, E. ; COPANI, A.: β -Amyloid Monomers Are Neuroprotective. In: *The Journal of Neuroscience* 29 (2009), Nr. 34, S. 10582–10587
- [65] BRINET, Dimitri ; KAFFY, Julia ; OUKACINE, Farid ; GLUMM, Sarah ; ONGERI, Sandrine ; TAVERNA, Myriam: An improved capillary electrophoresis method for in vitro monitoring of the challenging early steps of A β 1-42 peptide oligomerization: Application to anti-Alzheimer's drug discovery. In: *ELECTROPHORESIS* (2014), S. n/a–n/a
- [66] LUBLIN, A. L. ; GANDY, S.: Amyloid- β Oligomers: Possible Roles as Key Neurotoxins in Alzheimer's Disease. In: *The Mount Sinai Journal of Medicine, New York* 77 (2010), Nr. 1, S. 43–49
- [67] ZAHS, K. R. ; ASHE, K. H.: β -amyloid oligomers in aging and Alzheimer's disease. In: *Frontiers in Aging Neuroscience* 5 (2013), Nr. 28
- [68] BITAN, G. ; FRADINGER, E. A. ; SPRING, S. M. ; TEPLow, D. B.: Neurotoxic protein oligomers-what you see is not always what you get. In: *Amyloid* 12 (2005), Nr. 2, S. 88–95
- [69] HEPLER, R. W. ; GRIMM, K. M. ; NAHAS, D. D. ; BREESE, R. ; DODSON, E. C. ; ACTON, P. ; KELLER, P. M. ; YEAGER, M. ; WANG, H. ; SHUGHRUE, P. ; KINNEY, G. ; JOYCE, J. G.: Solution State Characterization of Amyloid β -Derived Diffusible Ligands. In: *Biochemistry* 45 (2006), Nr. 51, S. 15157–15167
- [70] HAASS, C. ; SELKOE, D. J.: Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (2007), Nr. 2, S. 101–112
- [71] SHANKAR, G. M. ; LI, S. ; MEHTA, T. H. ; GARCIA-MUNOZ, A. ; SHEPARDSON, N. E. ; SMITH, I. ; BRETT, F. M. ; FARRELL, M. A. ; ROWAN, M. J. ; LEMERE, C. A. ; REGAN, C. M. ; WALSH, D. M. ; SABATINI, B. L. ; SELKOE, D. J.: Amyloid β -Protein Dimers Isolated Directly from Alzheimer Brains Impair Synaptic Plasticity and Memory. In: *Nature medicine* 14 (2008), Nr. 8, S. 837–842
- [72] MC DONALD, J. M. ; SAVVA, G. M. ; BRAYNE, C. ; WELZEL, A. T. ; FORSTER, G. ; SHANKAR, G. M. ; SELKOE, D. J. ; INCE, P. G. ; WALSH, D. M. ; MEDICAL RESEARCH COUNCIL COGNITIVE, Function on behalf of t. ; AGEING, Study: The presence of sodium dodecyl sulphate-stable A β dimers is strongly associated with Alzheimer-type dementia. In: *Brain* 133 (2010), Nr. 5, S. 1328–1341
- [73] BITAN, G. ; LOMAKIN, A. ; TEPLow, D. B.: Amyloid β -Protein Oligomerization: Pre-nucleation Interactions Revealed by Photo-induced Cross-Linking of Unmodified Proteins. In: *Journal of Biological Chemistry* 276 (2001), Nr. 37, S. 35176–35184
- [74] O'MALLEY, T. T. ; OKTAVIANI, N. A. ; ZHANG, D. ; LOMAKIN, A. ; O'NUALLAIN, B. ; LINSE, S. ; BENEDEK, G. B. ; ROWAN, M. J. ; MULDER, F. A. ; WALSH, D. M.: Abeta dimers differ from monomers in structural propensity, aggregation paths and population of synaptotoxic assemblies. In: *Biochem J* 461 (2014), Nr. 3, S. 413–26
- [75] HUANG, T. H. J. ; YANG, D.-S. ; PLASKOS, N. P. ; GO, S. ; YIP, C. M. ; FRASER, P. E. ; CHAKRABARTTY, A.: Structural studies of soluble oligomers of the alzheimer β -amyloid peptide. In: *Journal of Molecular Biology* 297 (2000), Nr. 1, S. 73 – 87
- [76] LESNÉ, S. ; KOH, M. T. ; KOTILINEK, L. ; KAYED, R. ; GLABE, C. G. ; YANG, A. ; GALLAGHER, M. ; ASHE, K. H.: A specific amyloid- β protein assembly in the brain impairs memory. In: *Nature* 440 (2006), Nr. 7082, S. 352–357
- [77] DESHPANDE, A. ; MINA, E. ; GLABE, C. ; BUSCIGLIO, J.: Different Conformations of Amyloid β Induce Neurotoxicity by Distinct Mechanisms in Human Cortical Neurons. In: *The Journal of Neuroscience* 26 (2006), Nr. 22, S. 6011–6018

- [78] BITAN, G. ; KIRKITADZE, M. D. ; LOMAKIN, A. ; VOLLERS, S. S. ; BENEDEK, G. B. ; TEPLow, D. B.: Amyloid β -protein ($A\beta$) assembly: $A\beta_{40}$ and $A\beta_{42}$ oligomerize through distinct pathways. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (2003), Nr. 1, S. 330–335
- [79] BERNSTEIN, S. L. ; DUPUIS, N. F. ; LAZO, N. D. ; WYTTENBACH, T. ; CONDRON, M. M. ; BITAN, G. ; TEPLow, D. B. ; SHEA, J.-E. ; RUOTOLO, B. T. ; ROBINSON, C. V. ; BOWERS, M. T.: Amyloid- β protein oligomerization and the importance of tetramers and dodecamers in the aetiology of Alzheimer's disease. In: *Nature chemistry* 1 (2009), Nr. 4, S. 326–331
- [80] YUN, S. ; YUN, S. ; GUY, H. R.: Analysis of the stabilities of hexameric amyloid- β (1-42) models using discrete molecular dynamics simulations. In: *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 29 (2011), Nr. 5, S. 657 – 662
- [81] MILOJEVIC, J. ; MELACINI, G.: Stoichiometry and Affinity of the Human Serum Albumin-Alzheimer's $A\beta$ Peptide Interactions. In: *Biophysical Journal* 100 (2011), Nr. 1, S. 183–192
- [82] PITSCHKE, M. ; PRIOR, R. ; HAUPT, M. ; RIESNER, D.: Detection of single amyloid β -protein aggregates in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's patients by fluorescence correlation spectroscopy. In: *Nat Med* 4 (1998), Nr. 7, S. 832–834
- [83] WALSH, D. M. ; TSENG, B. P. ; RYDEL, R. E. ; PODLISNY, M. B. ; SELKOE, D. J.: The Oligomerization of Amyloid β -Protein Begins Intracellularly in Cells Derived from Human Brain. In: *Biochemistry* 39 (2000), Nr. 35, S. 10831–10839
- [84] SCHMIT, J. D. ; GHOSH, K. ; DILL, K.: What Drives Amyloid Molecules To Assemble into Oligomers and Fibrils? In: *Biophysical Journal* 100 (2011), Nr. 2, S. 450–458