

Weiterentwicklung und Anwendung des sFIDA-Assays
zur Frühdiagnose der Alzheimerschen Demenz mittels
A β -Oligomeren als möglicher Biomarker

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Katja Kühbach
aus Hannover

Jülich, Oktober 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
Korreferentin: Prof. Dr. Christine R. Rose

Tag der mündlichen Prüfung: 25.11.2014

Danksagungen

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Dieter Willbold für die Möglichkeit, dieses spannende Thema mit ausgezeichneter Laborausrüstung und in angenehmer Arbeitsatmosphäre behandeln zu dürfen, sowie für interessante Diskussionen und Denkanstöße.

Für die Übernahme des Korreferats danke ich Frau Prof. Dr. Christine Rose.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Betreuer Dr. Oliver Bannach für seine optimistische Art, gute Ratschläge, permanente Unterstützung bei großen und kleinen Laborproblemen und das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken!

Vielen Dank an Maren Hülsemann für all die gemeinsamen Versuche, die permanente gegenseitig Hilfe, die TEM-Aufnahmen, die Diskussionen, ... für alles! :-)

Antonia Klein danke ich für ihre Hilfe am TEM und die gemeinsamen Nacht- und Wochenendschichten.

Bei Christina Linnartz und Luriano Peters bedanke ich mich für das Konjugieren der Antikörper an Fluorochrome, BCA-Assays und die sonstige Unterstützung im Labor!

Meinem ganzen Büro danke ich für Aufmunterung und Unterstützung und den vielen Spaß, den wir neben der Arbeit hatten.

Ich danke Daniel Frenzel für die Einweisung in die Dichtegradientenzentrifugation.

Kun Wang danke ich für seine Hilfe insbesondere in der Anfangszeit meiner Doktorarbeit.

Mein Dank gilt ebenfalls allen anderen Mitgliedern der sFIDA-Arbeitsgruppe, Dr. Andreas Kulawik, Dr. Tuyen Bujnicki, Dr. Christian Zafiu und Kateryna Kravchenko.

Des Weiteren danke ich den Kooperationspartnern Crossbeta Biosciences und Prof. Dr. Lewczuk.

Ganz besonders möchte ich mich bei Victor für seine liebevolle Hilfe und Unterstützung, gutes Essen und viel Verständnis bedanken.

Zu guter Letzt möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern bedanken, die mich während meines gesamten Lebensweges in jeder Hinsicht und immer mit vollem Einsatz unterstützt haben.

Abstract

Worldwide 5-7 % of people older than 60 years suffer from dementia, Alzheimer's disease (AD) being the most frequent cause of dementia. Until now, a reliable diagnosis of AD can only be made after the patient's death. The development of an unambiguous *ante mortem* assay for an early diagnosis of AD is of great importance for the development of therapeutics and to start treatment of patients with those therapeutics in an early stage of the disease, where treatment is believed to be most effective.

Oligomers from amyloid- β ($A\beta$) are neurotoxic and probably culprits in the pathogenesis of AD. Therefore, they are promising biomarkers for AD and the sensitive and specific detection of $A\beta$ -oligomers in body fluids might help diagnosing AD in an early stage of the disease.

In this work, the sFIDA (surface-based fluorescence intensity distribution analysis) assay was optimized regarding the sensitivity for detecting $A\beta$ oligomers. Using optimal conditions, the sFIDA readout correlated with the concentration of synthetic stabilized oligomers over a wide range of four to five orders of magnitude, with a lower detection limit of 18.8 fM oligomers.

sFIDA experiments with two sets of samples of human cerebrospinal fluid (CSF) – each set from a different source – showed contradictory results regarding the detected oligomer concentrations in CSF from patients with AD as compared to control donors. In CSF samples from one of the sources, a higher oligomer concentration was detected in CSF from patients with AD than from control donors, whereas the samples from the other source showed opposite results. Thus, no systematic differences between detected oligomer concentrations in CSF from patients with AD as compared to control donors were found. However, both sets of samples contained only four to five samples from each group and such a small sample size does not allow to generalize those findings.

Furthermore, a method for the production of stabilized $A\beta$ -oligomers of defined sizes was developed. By density gradient centrifugation, approximately globular, crosslinked oligomers were prepared, with 9.6 ± 1.1 nm in diameter, and which were detectable in sFIDA. Those stabilized oligomers can be applied as standard molecules and for further optimization and characterization of the sFIDA assay in future.

Zusammenfassung

Weltweit sind etwa 5-7 % aller über 60-Jährigen von einer Demenz betroffen, deren häufigste Ursache die Alzheimersche Demenz (AD) ist. Eine genaue Diagnose der AD kann bisher erst nach dem Tod der Patienten erfolgen. Die Entwicklung eines verlässlichen Tests zur Frühdiagnose der AD ist daher von entscheidender Bedeutung zur Entwicklung von Medikamenten und um die Therapie der AD mit diesen Medikamenten in einem frühen Krankheitsstadium einzuleiten, da die Therapie der AD dann als besonders erfolgsversprechend gilt.

Oligomere aus Amyloid-beta ($A\beta$) gelten als neurotoxisch und spielen vermutlich eine entscheidende Rolle in der Krankheitsentstehung, weshalb $A\beta$ -Oligomere als vielversprechende Biomarker für die AD gelten. Der sensitive und spezifische Nachweis von $A\beta$ -Oligomeren in Körperflüssigkeiten kann also möglicherweise der Diagnose in einem frühen Krankheitsstadium dienen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der sFIDA (surface-based fluorescence intensity distribution analysis) zur Detektion von $A\beta$ -Oligomeren zunächst in Bezug auf eine erhöhte Sensitivität des Assays optimiert. Bei einem sFIDA-Experiment unter optimierten Protokollbedingungen zeigte sich, dass der sFIDA readout über vier bis fünf Größenordnungen mit der eingesetzten Konzentration synthetischer Oligomere korreliert. Die Nachweisgrenze der synthetischen Oligomere lag bei 18,8 fM.

Bei sFIDA-Experimenten mit humanen Liquor-Proben zeigten sich in zwei verschiedenen Probensätzen aus unterschiedlichen Quellen deutliche Unterschiede der relativen Oligomer-Konzentrationen im Liquor von AD-Patienten und Kontrollspendern. In einem Probensatz wurde im Liquor von AD-Patienten eine höhere Oligomer-Konzentration gegenüber Kontrollspendern nachgewiesen, der zweite Probensatz zeigte gegenteilige Ergebnisse. Anhand dieser Ergebnisse kann also kein systematischer Unterschied zwischen den Oligomer-Konzentrationen im Liquor von AD- und Kontrollspendern festgestellt werden. Die beiden Probensätze enthielten jedoch nur vier bis fünf Proben je Gruppe und eignen sich deshalb nicht für verallgemeinernde Aussagen.

Des Weiteren wurde in einem Teilprojekt ein Verfahren zur Herstellung stabilerer $A\beta$ -Oligomere definierter Größe entwickelt. Mittels Dichtegradientenzentrifugation wurden kugelförmige, quervernetzte Oligomere präpariert, die eine Größe von etwa $9,6 \pm 1,1$ nm aufweisen und im sFIDA detektiert werden können. Diese stabilisierten Oligomere können in Zukunft als Standardmoleküle und zur weiteren Optimierung und Charakterisierung des sFIDA eingesetzt werden.

Inhaltsverzeichnis

1	Theoretische Grundlagen	1
1.1	Alzheimersche Demenz	1
1.1.1	Allgemeines.....	1
1.1.2	Neuropathologie	2
1.1.3	Amyloid- β	4
1.1.3.1	Synthese von A β	4
1.1.3.2	Aggregation und neurotoxische Eigenschaften von A β	4
1.1.3.3	Amyloid-Kaskaden-Hypothese.....	8
1.1.4	Diagnose	10
1.1.4.1	Klinische Diagnose	10
1.1.4.2	Brain Imaging.....	11
1.1.4.3	Molekulare Biomarker.....	12
1.1.4.4	Detektion von A β -Oligomeren als Biomarker.....	14
1.2	sFIDA	14
2	Zielsetzung	19
3	Material und Methoden.....	21
3.1	Material	21
3.1.1	Verbrauchsmaterialien.....	21
3.1.2	Chemikalien.....	22
3.1.3	Puffer und Lösungen.....	22
3.1.4	Kits und Antikörper.....	23
3.1.5	Geräte.....	24
3.1.6	Software.....	25
3.1.7	Multiwellplatten aus Glas	25
3.2	Methoden.....	27
3.2.1	Vorbereitung des A β	27

3.2.2	Präparation von A β -Aggregaten	27
3.2.3	Präparation von „SEC-Oligomeren“.....	27
3.2.4	Reinigung der Mikroglas-Platten mit Piranha-Lösung	27
3.2.5	Fluorochrom-Markierung von Antikörpern.....	28
3.2.6	Produktion und Charakterisierung stabilisierter A β -Oligomere („KK-Oligomere“).....	29
3.2.6.1	Herstellung von KK-Oligomeren aus A β ₁₋₄₂	29
3.2.6.2	Reinigung der KK-Oligomere	30
3.2.6.3	Lagerung der KK-Oligomere	30
3.2.6.4	SDS-PAGE und Silberfärbung.....	30
3.2.6.5	BCA-Assay zur Bestimmung der Protein-Konzentration ...	31
3.2.6.6	Transmissions-Elektronenmikroskopie	31
3.2.7	Vorbereitung der Oberfläche nach dem sFIDA-Protokoll.....	32
3.2.7.1	Allgemeine Übersicht.....	32
3.2.7.2	Reinigung der Glasplatten und Aktivierung der Glasoberfläche	33
3.2.7.3	Immobilisierung des CM-Dextran und der Immobilisierungsantikörper	34
3.2.7.4	Auftragung von Proben und Detektionsantikörpern	35
3.2.8	Datenerfassung und -auswertung.....	37
3.2.8.1	TIRF-Mikroskopie	37
3.2.8.2	Datenerfassung.....	38
3.2.8.3	Datenauswertung	39
3.2.8.4	Statistische Analysen	41
4	Experimenteller Teil	43
4.1	Detektion von A β -Oligomeren mittels Analyse des FRET-Signals im sFIDA	43
4.1.1	Hintergrund	43
4.1.2	Vergleich von sFIDA-Ergebnissen: Analyse mittels Kollokalisation gegenüber dem FRET-Signal	44
4.1.3	Zusammenfassung der Ergebnisse	46
4.2	Optimierung des sFIDA-Protokolls	47
4.2.1	Zielsetzung	47
4.2.2	Inkubationszeit von Natriumhydroxid	48
4.2.3	Untersuchung verschiedener Blocking-Reagenzien	49
4.2.4	Optimierung der Anzahl der Waschschritte nach Inkubation von Proben und Detektionsantikörpern	61
4.2.5	Zusammenfassung der Protokolloptimierung	64

4.3	Herstellung und Charakterisierung stabilisierter „KK“-Oligomere aus A β _{1–42}	66
4.3.1	Hintergrund	66
4.3.2	Produktion quervernetzter A β -Oligomere	66
4.3.2.1	Theoretische Vorüberlegungen	66
4.3.2.2	Kovalente Quervernetzung von A β _{1–42}	69
4.3.2.3	Vergleich der Quervernetzung vor und während der Auftrennung von A β -Oligomeren mittels DGZ.....	70
4.3.2.4	Reinigung der KK-Oligomere	73
4.3.2.5	Lagerungsbeständigkeit der KK-Oligomere.....	75
4.3.3	Charakterisierung der KK-Oligomere.....	76
4.3.3.1	Größe und Morphologie.....	76
4.3.3.2	Sedimentationsexperimente zur Bestimmung des Molekulargewichts	79
4.3.3.3	Analyse mittels sFIDA	84
4.3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	86
4.4	sFIDA mit humanen Liquorproben.....	89
4.4.1	Allgemeines.....	89
4.4.2	Studie 1.....	89
4.4.3	Studie 2.....	90
4.4.4	Studie 3.....	92
4.4.5	Zusammenfassung und Diskussion	95
5	Vergleich der Methoden zur Detektion von Aβ-Oligomeren.....	97
5.1	Vorstellung der Methoden.....	97
5.2	Allgemeines	99
5.3	Minimale Größe detektierbarer Oligomere.....	100
5.4	Nachweisgrenzen.....	101
5.5	Zusammenfassung und Ausblick.....	102
A	Anhang	105
A.0.1	Liquorproben und Patientendaten	105

Abkürzungsverzeichnis

A β	Amyloid- β
A β pE3	A β , das an der 3. Aminosäure mit einem Pyroglutamat startet
AD	Alzheimersche Demenz
AF	Alexa Fluor
APP	<i>amyloid precursor protein</i> (amyloid-Vorläuferprotein)
BCA	<i>bicinchoninic acid</i> (Bicinchoninsäure)
BP	Bandpassfilter
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
CM-Dextran	carboxymethyliertes Dextran
Da	Dalton
DGZ	Dichtegradientenzentrifugation
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ein Enzymimmunoassay)
FBS	fetales bovines Serum
FCS	<i>fluorescence correlation spectroscopy</i> (Fluoreszenzkorrelationspektroskopie)
FDG	¹⁸ F-fluorodeoxyglucose
FIDA	<i>fluorescence intensity distribution analysis</i> (Analyse der Verteilung der Fluoreszenzintensitäten)
fM	Femtomolar
fMRT	funktionelle Magnetresonanztomographie
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
HFIP	Hexafluorisopropanol
LSM	Laser-Scanning-Mikroskopie
MMSE	Mini-Mental-State-Examination

MRT	Magnetresonanztomographie
NaOH	Natriumhydroxid
NHS	N-Hydroxysuccinimid
nm	Nanometer
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PIB	¹¹ C-Pittsburgh compound B
pM	Picomolar
SEC	<i>size exclusion chromatography</i> (Größenausschluss-Chromatographie)
sFIDA	<i>surface-based fluorescence intensity distribution analysis</i> (Oberflächenbasierte FIDA)
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie
UZ	Ultrazentrifugation
VE-Wasser	voll-entsalztes Wasser
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen)
WHO	<i>World Health Organisation</i> (Weltgesundheitsorganisation)

Abbildungsverzeichnis

1.1	Verringertes Hirnvolumen eines Patienten mit AD im Vergleich zum Gehirn eines gesunden Menschen	3
1.2	Die nicht-amyloidogene und amyloidogene Prozessierung von APP	5
1.3	Schematische Darstellung der Aggregation von A β	7
1.4	Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese	9
1.5	Aufbau des sFIDA	17
3.1	In dieser Arbeit verwendete Multiwellplatten aus Glas	26
3.2	Schematische Darstellung der internen Totalreflexion in der TIRF-Mikroskopie	37
3.3	Normale und „integrierte“ Histogramme von sFIDA-Messungen . .	40
4.1	sFIDA readouts durch Kolo­kalisierung und bei Auswertung des FRET-Signals im Vergleich	45
4.2	sFIDA readouts nach Variation der Inkubationszeiten von Natriumhydroxid	49
4.3	sFIDA readouts nach Verdünnung der CB-Oligomere in PBS und Liquor.	50
4.4	Test verschiedener Blocking-Reagenzien im sFIDA	52
4.5	Test verschiedener Konzentrationen von Milchpulver oder FBS als Blocking-Reagenzien	53
4.6	Test verschiedener Inkubationszeiten des Blockings mit 5 % FBS . .	54
4.7	Verschiedene Konzentrationen von CB-Oligomeren mit und ohne Blocking	56
4.8	Liquorproben mit und ohne Blocking	57
4.9	Liquorproben mit und ohne Blocking	58
4.10	Vergleich verschiedener Waschbedingungen im sFIDA	63

4.11 Schematische Darstellung der DGZ	67
4.12 Schematische Darstellung der Verknüpfung zweier Peptide mittels EDC und NHS	68
4.13 Kovalente Quervernetzung von A β durch EDC und NHS nach ver- schiedensten Inkubationszeiten	69
4.14 Vergleich der A β -Quervernetzung vor und während der DGZ	71
4.15 SDS-PAGE mit KK-Oligomeren aus den Fraktionen 5-8 vor und nach der Reinigung	74
4.16 Experiment zur Lagerung von KK-Oligomeren	75
4.17 TEM-Aufnahmen der Fraktionen 5 bis 8 nach Färbung mit Uranyl- acetat	77
4.18 TEM-Aufnahme der Fraktion 6 nach Färbung mit Uranylacetat in 2 verschiedenen Vergrößerungen	78
4.19 SDS-PAGE mit den Fraktionen 1-13 nach der DGZ mit Proteinen bekanntester Molekulargewichte	81
4.20 Vergleich der sFIDA readouts von CB- und KK-Oligomeren	85
4.21 Studie 1: sFIDA Analyse von Liquorproben von je fünf AD- und Kontroll-Spendern	90
4.22 Studie 2: sFIDA-Analyse von Liquorproben von 5 Kontrollspen- dern und 4 Spendern mit wahrscheinlicher AD	91
4.23 Studie 3: sFIDA Analyse von Liquorproben von 20 Kontrollspen- dern und je 20 Spendern mit milder und moderater AD	93
4.24 Korrelation von sFIDA readouts und den MMSE-Punktzahlen der Liquor-Spender	94

Tabellenverzeichnis

3.1	In dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien	21
3.2	In dieser Arbeit verwendete Chemikalien	22
3.3	In dieser Arbeit verwendete Puffer und Lösungen	23
3.4	In dieser Arbeit verwendete Kits	23
3.5	In dieser Arbeit verwendete Antikörper	24
3.6	In dieser Arbeit verwendete Geräte	24
3.7	In dieser Arbeit verwendete Software.	25
3.8	Saccharose-Konzentrationen und Volumina der einzelnen Fraktionen in der DGZ zur Produktion von quervernetzten A β -Oligomeren	29
3.9	Übersicht des Protokolls zu Vorbereitung der Oberfläche für das sFIDA-Assay	36
3.10	In dieser Arbeit eingesetzte Fluorochrome und deren Anregungs- und Detektionswellenlängen am verwendeten TIRF-Mikroskop . . .	38
4.1	In der DGZ eingesetzte Proteine und deren Molekulargewicht . . .	80
5.1	Nachweisgrenzen und für deren Bestimmung verwendete A β -Spezies	103
A.1	Probenbezeichnungen, Patientendaten und sFIDA readouts der Liquorproben aus Studie 1	105
A.2	Probenbezeichnungen, Patientendaten und sFIDA readouts der Liquorproben von Kontrollspendern aus Studie 3	106
A.3	Probenbezeichnungen, Patientendaten und sFIDA readouts der Liquorproben von Spendern mit milder AD aus Studie 3	107
A.4	Probenbezeichnungen, Patientendaten und sFIDA readouts der Liquorproben von Spendern mit moderater AD aus Studie 3	108

A.5 Probenbezeichnungen, Patientendaten und sFIDA readouts der Liquor- proben aus Studie 2	109
---	-----

1. Theoretische Grundlagen

1.1 Alzheimersche Demenz

1.1.1 Allgemeines

Die Alzheimersche Demenz (AD), auch als Alzheimer-Krankheit bezeichnet, ist eine neurodegenerative Krankheit, die erstmals 1906 vom deutschen Psychiater Alois Alzheimer beschrieben und daraufhin nach ihm benannt wurde (Alzheimer, 1911). Bereits damals beschrieb Alzheimer das Krankheitsbild mit den typischen Symptomen wie Verwirrung des Patienten, nachlassenden kognitiven Leistungen, charakterliche Veränderungen sowie auffälligen Veränderungen in den Gehirnen der verstorbenen Patienten.

Bis heute, mehr als 100 Jahre nach der ersten Beschreibung der AD und trotz intensiver Forschung in den letzten Jahrzehnten, sind noch immer viele Fakten rund um die AD ungeklärt. So ist zum Beispiel nicht bekannt, wodurch die Krankheit ausgelöst wird, wie sie eindeutig *pre mortem* diagnostiziert werden kann, und auch eine Heilung der AD oder Verlangsamung des Krankheitsverlaufs durch Medikamente ist bisher nicht möglich. Derzeit können nur die Symptome der AD medikamentös gelindert werden (Lansdall, 2014).

Dabei wird das Problem in einer zunehmend älter werdenden Gesellschaft immer gravierender: Neben Risikofaktoren wie einem geringen Bildungslevel und genetischer Prädisposition (Lindsay et al., 2002) sowie hohem systolischem Blutdruck und erhöhtem Cholesterin-Level im mittleren Lebensalter (Kivipelto et al., 2001) gilt ein hohes Lebensalter als größter Risikofaktor. In den meisten Fällen tritt AD erst ab einem Alter von 65 Jahren auf (Alzheimer's Association, 2014).

Weltweit sind etwa 5 - 7 % aller über 60-Jährigen von Demenz betroffen (Prince et al., 2013), AD ist hierbei die häufigste Art der Demenz (Alzheimer's Associati-

on, 2014; Katz et al., 2012). Eine 2005 durchgeführte Studie schätzte die Anzahl der betroffenen Patienten auf 24 Millionen weltweit (Ferri et al., 2005), während Prince et al. (2013) von etwa 35 Millionen Demenzkranken weltweit und einer Verdopplung der Patientenzahl etwa alle 20 Jahre ausgeht. Diese starke Zunahme an demenzkranken Menschen – die je nach Stadium der Krankheit einen hohen Hilfe- und Pflegebedarf aufweisen – hat nicht nur weitreichende Folgen für die Betroffenen und deren Angehörige, sondern stellt auch eine große finanzielle Belastung für das Gesundheitssystem dar (Alzheimer's Association, 2014).

Im Diagnoseschlüssel ICD-10 der World Health Organisation (WHO) werden bei der „Demenz bei Alzheimer-Krankheit“ zwei verschiedene Typen unterschieden (WHO, 2010):

- Typ 1: später Ausbruch der Erkrankung, d.h. nach dem 65. Lebensjahr. Der Verlauf ist langsam, das Hauptmerkmal sind Gedächtnisstörungen.
- Typ 2: früher Ausbruch der Erkrankung, d.h. vor dem 65. Lebensjahr. Der Verlauf ist schneller, „deutliche und vielfältige Störungen der höheren kortikalen Funktionen“ sind die Hauptmerkmale.

Neben der Unterscheidung anhand des Lebensalters bei Beginn der AD wird zwischen der familiären und sporadischen AD unterschieden: Die familiäre Form (5 - 10 %) ist genetisch bedingt und meist durch ein frühes Auftreten der Krankheit charakterisiert. Der größte Anteil der Patienten (90 - 95 %) entwickelt die Krankheit jedoch sporadisch, d.h. nichterblich (Hoyer, 2000).

Der Krankheitsverlauf ist von Patient zu Patient deutlich unterschiedlich. Je nach Studien wird die durchschnittliche Überlebenszeit nach Diagnose bzw. Beginn einer feststellbaren Demenz zwischen 3 und 11 Jahren angegeben (Wolfson et al., 2001; Larson et al., 2004; Helzner et al., 2008; Rountree et al., 2012).

1.1.2 Neuropathologie

Die auffälligsten Merkmale der AD, die schon von Alois Alzheimer beschrieben wurden und anhand derer die Krankheit eindeutig *post mortem* diagnostiziert werden kann, sind die sogenannten amyloiden Plaques und neurofibrillären Bündel im Gehirn der Patienten (Alzheimer, 1911; Terry et al., 1964; Perl, 2010).

Bei den amyloiden Plaques von AD-Patienten, auch als senile Plaques bezeichnet, handelt es sich um unlösliche, extrazelluläre Ablagerungen, die überwiegend aus Amyloid- β ($A\beta$) bestehen (Serrano-Pozo et al., 2011). In der Literatur werden anhand ihrer Morphologie diffuse, fibrilläre und dichte Plaques unterschieden, deren anteiliges Auftreten sich im Krankheitsverlauf verändert. Es wurde beobachtet, dass fibrilläre Plaques im klinischen Stadium der AD einen größeren Anteil als die anderen Plaque-Formen ausmachen, und dass in deren Umgebung neuritische Veränderungen und damit assoziierte, nicht normale neuronale Prozesse stattfinden (Dickson und Vickers, 2001).

Neurofibrilläre Bündel liegen intrazellulär vor und bestehen aus einer hyperphosphorylierten Form des Proteins tau. Tau ist ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein (Weingarten et al., 1975), das in seiner hyperphosphorylierten Form die Vernetzung der Aktin-Filamente verhindert (Selden und Pollard, 1983) und neurofibrilläre Bündel in Gehirnen von Alzheimer-Patienten bildet (Grundke-Iqbal et al., 1986). Diese neurofibrillären Bündel treten auch während des normalen Alterungsprozesses im Gehirn auf, hier jedoch in deutlich geringerer Ausprägung als bei der AD (Price und Morris, 1999). Der Zusammenhang zwischen neurofibrillären Bündeln und amyloiden Plaques ist noch nicht genau geklärt, es gibt jedoch Hinweise, dass die Bildung neurofibrillärer Bündel direkt oder indirekt durch bestimmte $A\beta$ -Spezies induziert wird (King et al., 2006; Nussbaum et al., 2012; Seward et al., 2013).

Des Weiteren kann ein Verlust von Neuronen und Synapsen im Gehirn verbunden mit einer starken Volumenabnahme (Atrophie) der weißen Substanz sowie der Großhirnrinde von Patienten mit AD beobachtet werden (Kril et al., 2004; de la Monte, 1989), wie in Abbildung 1.1 dargestellt.

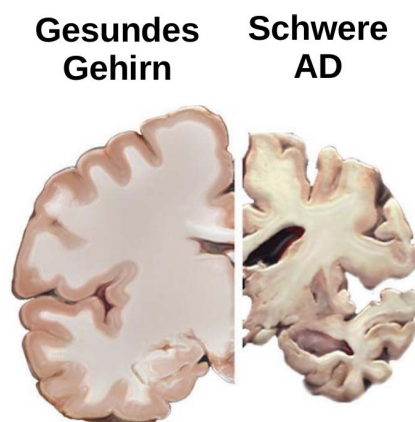


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des verringerten Hirnvolumens eines Patienten mit AD (rechts) im Vergleich zum Gehirn eines gesunden Menschen (links). Mit freundlicher Genehmigung des „National Institute on Aging/National Institutes of Health“.

1.1.3 Amyloid- β

1.1.3.1 Synthese von A β

Amyloid- β (A β) ist ein Peptid, das je nach Isoform aus 36 - 43 Aminosäuren besteht und ein Molekulargewicht von ca. 4,5 kDa aufweist (Glennner und Wong, 1984; Masters et al., 1985). Es entsteht nach proteolytischen Spaltungen des größeren Vorläuferproteins APP („*amyloid precursor protein*“), einem glykolisierten Transmembranprotein (Kang et al., 1987). APP wird ubiquitär exprimiert und kommt in verschiedenen Splice-Varianten und posttranslationalen Prozessierungen vor (Selkoe, 1998).

Es werden zwei verschiedene Arten der APP-Prozessierung unterschieden (vgl. Abbildung 1.2). Im sogenannten nicht-amyloidogenen Stoffwechselweg wird das APP durch α -Sekretase(n) innerhalb der Region des A β geschnitten und es entsteht ein großes, lösliches Fragment (APPs- α) sowie das in der Membran verbleibende C-terminale Fragment (Esch et al., 1990). Dieses kann weiter durch γ -Sekretasen gespalten werden, wodurch p3, ein etwa 3 kDa großes Peptid entsteht.

Im amyloidogenen Stoffwechselweg wird das APP durch β - und γ -Sekretasen gespalten, so dass A β entsteht (Seubert et al., 1993). Die Spaltung durch γ -Sekretasen erfolgt am häufigsten hinter der Aminosäure 40, seltener hinter der Aminosäure 42 des A β . Bei der am häufigsten vorkommenden A β -Spezies, A β_{1-40} , erfolgt die Spaltung durch eine γ -Sekretase im trans-Golgi-Netzwerk, bei der Entstehung von A β_{1-42} hinter der Aminosäure 42 im endoplasmatischen Retikulum (Hartmann et al., 1997).

Neben diesen beiden A β -Spezies können noch weitere Isoformen durch leicht versetzte Schnittstellen der γ -Sekretase entstehen, diese Isoformen haben jedoch einen geringen Anteil an dem gesamten A β (Murphy und LeVine, 2010). Des Weiteren sind einige am Ende des N-Terminus verkürzte Isoformen von A β bekannt, die häufigste davon beginnt mit einem Pyroglutamat an Position 3 (A β pE3-40/42; Saido et al., 1996).

1.1.3.2 Aggregation und neurotoxische Eigenschaften von A β

Bei der Expression des Vorläuferproteins APP und dessen Prozessierung zu A β handelt es sich um einen physiologisch normalen Stoffwechselweg. Dementspre-

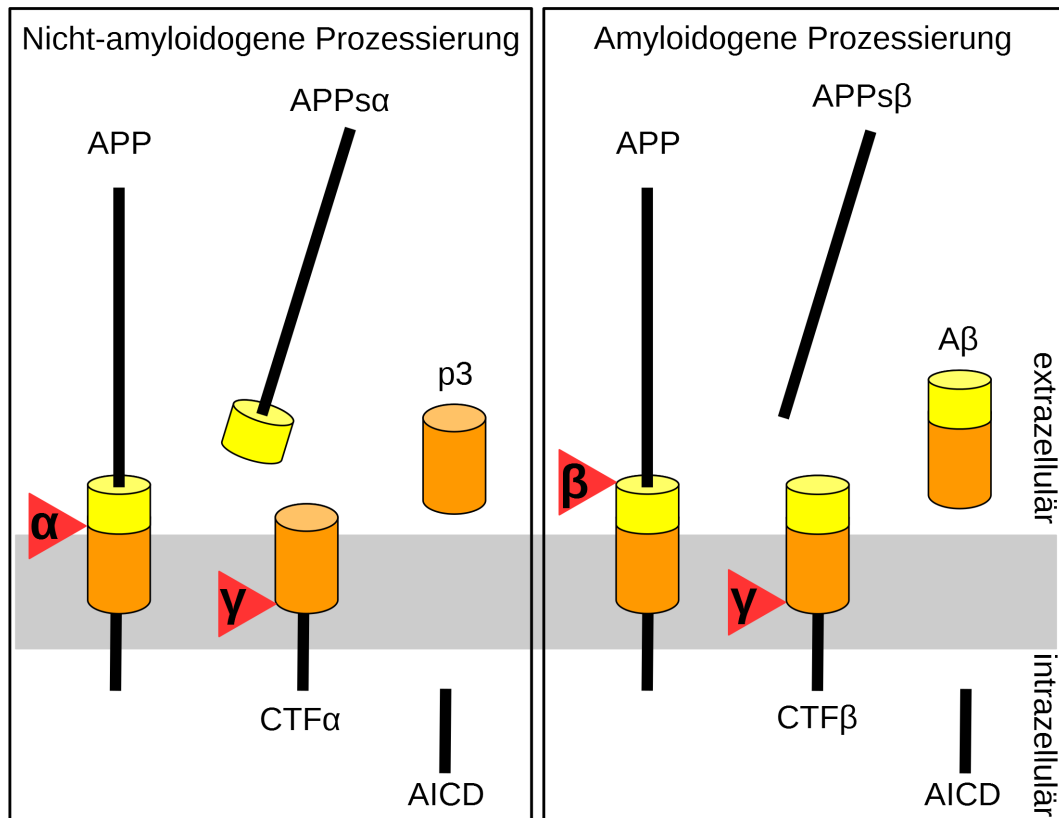


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der nicht-amyloidogenen und amyloidogenen Prozessierung von APP. Bei der nicht-amyloidogenen Prozessierung wird das transmembrane Vorläuferprotein APP innerhalb der Region von A β (dargestellt als Zylinder in den Farben orange und gelb) von der α -Sekretase (roter Pfeil mit dem Buchstaben α) proteolytisch gespalten. Es entsteht das lösliche APPs α und das C-terminale Fragment (CTF α), das innerhalb der Membran (grauer Balken) weiter von der γ -Sekretase (roter Pfeil mit dem Buchstaben γ) gespalten werden kann. Dabei entsteht das etwa 3 kDa kurze Fragment p3 sowie die intrazelluläre Domäne des APP (AICD). Bei der amyloidogenen Prozessierung wird APP zunächst durch die β -Sekretase gespalten, dabei wird das lösliche APPs β freigesetzt und das C-terminale Fragment β (CTF β) kann weiter durch die γ -Sekretase gespalten werden, wodurch A β und AICD entstehen. Nach Haass et al. (2012).

chend kann A β sowohl im Liquor als auch im Gehirn von gesunden Personen und von Patienten mit AD nachgewiesen werden (Shoji et al., 1992; Haass et al., 1992).

Es gibt bereits Hinweise auf verschiedene Funktionen von A β im gesunden Menschen. Zou et al. (2002) konnten zeigen, dass monomeres A β als Antioxidanz gegen metallinduzierten oxidativen Schaden wirkt. Außerdem wurde für A β antimikrobielle Aktivität nachgewiesen (Soscia et al., 2010) und es gibt Hinweise darauf, dass es als Transkriptionsfaktor wirkt (Bailey et al., 2011) und bei dem Transport von Cholesterin eine Rolle spielt (Igbavboa et al., 2009).

Monomeres A β hat einen amphiphilen Charakter: Während der N-Terminus hydrophil ist, besteht der C-Terminus aus hydrophoben Aminosäuren, die als Teil des Vorläuferproteins APP in der Membran liegen.

Die im Abschnitt 1.1.3.1 beschriebenen vielfältigen Isoformen des A β weisen deutliche Unterschiede im Aggregationsverhalten auf. Das hydrophobere A β_{1-42} beispielsweise neigt stärker zur Oligomerisierung und Aggregation als das zwei Aminosäuren kürzere A β_{1-40} , das *in vitro* langsamer oligomerisiert (El-Agnaf et al., 2000). Auch die oben beschriebene A β -Spezies, die an Position 3 mit einem Pyroglutamat beginnt, neigt stark zur Aggregation (Harigaya et al., 2000). Neben der Vielfalt an A β -Isoformen verschiedener Längen wird die Vielfalt an Peptiden mit unterschiedlichen Eigenschaften durch posttranslationale Modifizierungen z.B. durch Glutaminylykolasen oder Phosphorylierung erhöht (Benilova et al., 2012).

Die Untersuchung der Oligomerisierung von A β und den verschiedenen oligomeren Spezies ist kompliziert, da die unterschiedlich großen A β -Spezies in einem dynamischen Verhältnis zueinander stehen und auch während der Analyse permanent weiter oligomerisieren und disaggregieren. Dazu kommt, dass die einzelnen Spezies in sehr geringen Konzentrationen vorkommen (Bruggink et al., 2012).

Trotz dieser Schwierigkeiten konnten einige Aggregationsformen von A β *in vitro* oder *in vivo* nachgewiesen werden. FINDER und GLOCKSHUBER (2007) fassen das Wissen über die Aggregationsmechanismen zusammen, wie in Abbildung 1.3 dargestellt. Bei physiologischem pH-Wert nimmt A β_{1-42} schnell eine β -Faltblatt-Struktur ein und oligomerisiert, während A β_{1-39} deutlich länger in einer *random-coil*-Konformation vorliegt, bevor es zu β -faltblattreichen Oligomeren aggregiert (Barrow und Zagorski, 1991). Aus Monomeren bilden sich intrazellulär Dimere (Walsh et al., 2000) und kleine, lösliche Oligomere, denen die größte Neurotoxizität zugesprochen wird (McLean et al., 1999; Cleary et al., 2004; Lesné et al., 2006). Zusätzlich zu diesen Oligomeren, die in Lösung vorkommen, werden ringförmige A β -Oligomere beschrieben, die in Membranen Ionenkanal-ähnliche Strukturen bilden. Diese stören möglicherweise die zelluläre Homöostase und könnten so die Degeneration der Zellen auslösen (Quist et al., 2005).

Protofibrillen stellen den nächstgrößeren Aggregationszustand dar. Hierbei handelt es sich um lösliche, stabförmige Strukturen, die einen hohen Gehalt an β -Faltblättern aufweisen. Sie werden als Vorläufer-Molekül für die größeren Fibrillen an-

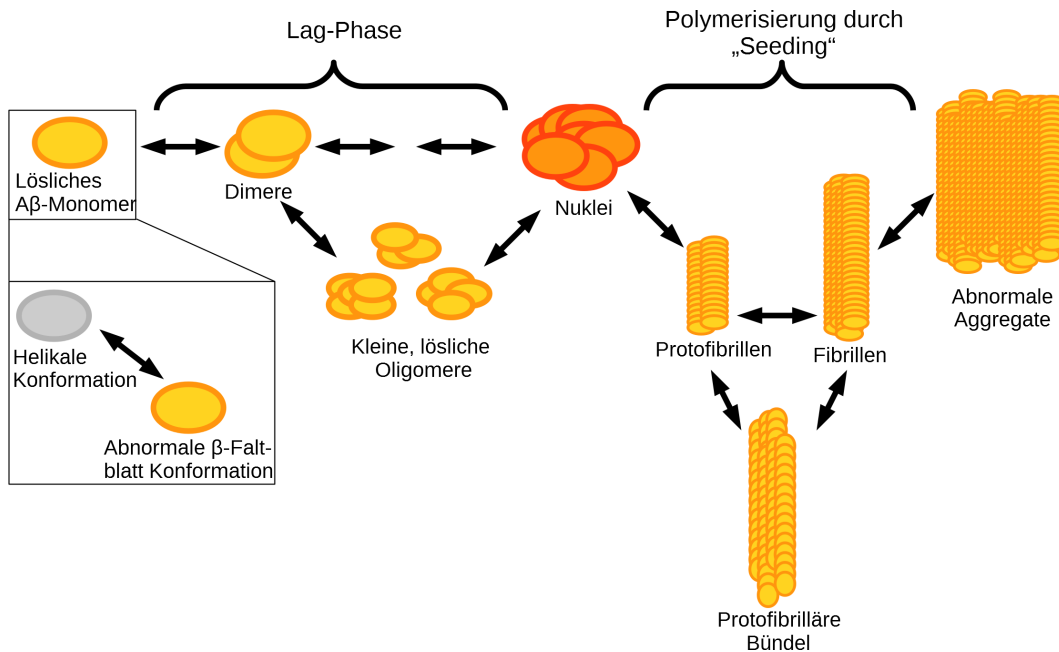


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Aggregation von A β . Es wird angenommen, dass A β -Monomere in einer helikalen und in einer β -Faltblatt-Konformation vorliegen können. Die β -Faltblatt-Konformation begünstigt die Oligomerisierung der Monomere zunächst zu Dimeren und kleinen löslichen Oligomeren. Nach einer lag-Phase entstehen sogenannte Nuklei, die per Seeding-Mechanismus die weitere Polymerisierung über Protofibrillen zu Fibrillen und großen Aggregaten beschleunigen. Nach Finder und Glockshuber (2007).

gesehen (Walsh et al., 1997), die als thermodynamisch stabile, unlösliche und β -faltblattreiche filamentöse Strukturen beschrieben werden (Ross und Poirier, 2005). Amyloide Plaques sind große, extrazellulär in den Gehirnen von AD-Patienten vorkommende Aggregate, die aus A β -Fibrillen bestehen (Friedrich et al., 2010). Nachdem lange Zeit die amyloiden Plaques im Verdacht standen, toxisch auf Nervenzellen zu wirken, gilt inzwischen als relativ sicher, dass die löslichen oligomeren und protofibrillären Formen von A β die toxischen Spezies sind (McLean et al., 1999).

Es gibt verschiedene Modelle, die die Fibrillisierung von A β beschreiben. Ein von vielen Wissenschaftlern favorisiertes Modell beschreibt die Fibrillisierung per *Seeding*-Mechanismus. Nach diesem Modell bilden sich zunächst sogenannte Nuklei, die die Anlagerung von weiteren A β -Molekülen begünstigen und so zu Protofibrillen und Fibrillen heranwachsen. Während dieser Zeit können sich immer wieder kleinere Einheiten – neue Nuklei – von den Fibrillen lösen, an denen wiederum weitere Oligomere polymerisieren. Für dieses Modell spricht, dass bei der Aggregation in einem A β -Gemisch zunächst eine lag-Phase beobachtet wird, in der die Oligo-

merisierung des A β nur langsam stattfindet. Nach dem Seeding-Modell entstehen in dieser Zeit die Nuklei; diese lag-Phase entfällt, wenn man bereits geformte Seeds zu dem A β -Gemisch dazugibt (Jarrett et al., 1993; Harper et al., 1997).

In den letzten Jahren häuften sich die Hinweise, dass sich bestimmte A β -Spezies durch einen Prionen-ähnlichen Mechanismus vermehren. Der Begriff Prion wurde von Prusiner 1982 zur Benennung eines proteinartigen, infektiösen Partikels in seiner Veröffentlichung zur Prionhypothese vorgeschlagen. Das infektiöse Partikel bei Prionen-Krankheiten besteht überwiegend oder sogar vollständig aus einer fehlerhaft gefalteten und aggregierten Form des Prion-Proteins, das in seiner normalen Form keinerlei pathogene Wirkung hat. Die fehlerhafte Faltung kann spontan entstehen, genetisch begünstigt sein (Goldmann, 2008) oder infektiös – durch Kontakt eines normal gefalteten Prion-Proteins mit Aggregaten aus fehlgefalteten Prion-Proteinen – entstehen. Hierdurch wird eine Kettenreaktion ausgelöst, in der immer mehr der normal gefalteten Prion-Proteine in die pathogene Konformation umgewandelt werden. Creutzfeld-Jakob Krankheit, Scrapie und BSE gehören zu den bekanntesten der Prion-Krankheiten (Aguzzi, 2008).

Für einen Prionen-artigen Mechanismus der Vermehrung von A β -Oligomeren oder Aggregaten sprechen insbesondere Arbeiten, die zeigten, dass die Injektion von fehlgefaltetem A β aus synthetischen oder biologischen Quellen in das Gehirn oder die Bauchhöhle von transgenen, A β -exprimierenden Mäusen das Auftreten und die Ausbreitung von aggregiertem A β beschleunigte (Stöhr et al., 2012; Eisele et al., 2009, 2010). Stöhr et al. konnten zeigen, dass die Inokulation von aufgereinigten Proteinase K-resistenten A β -Fibrillen aus transgenen, APP-exprimierenden Mäusen ausreichte, um Ablagerungen von A β *in vivo* auszulösen. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass andere A β -Spezies ebenfalls Prionen-ähnliche Mechanismen der Entstehung und Vermehrung besitzen.

1.1.3.3 Amyloid-Kaskaden-Hypothese

Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese zur Entstehung der AD wurde erstmals 1992 von Hardy und Higgins formuliert und seitdem permanent weiterentwickelt und neuen Erkenntnissen angepasst. Ursprünglich besagte die Hypothese, dass die A β -Ablagerungen in Form von Plaques im Gehirn alle anderen Symptome der AD wie neurofibrilläre Bündel, das Absterben von Neuronen und das Auftreten von Demenz auslösen. Inzwischen gilt jedoch als gesichert, dass die Menge der Plaques im

Gehirn nicht mit der Schwere der AD korreliert, sondern dass lösliche A β -Spezies, nicht aber Monomere, die toxischen Moleküle darstellen (McLean et al., 1999; Lue et al., 1999; Hardy und Selkoe, 2002). Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese wurde gemäß diesen Erkenntnissen folgendermaßen modifiziert dargestellt (Abbildung 1.4, nach Blennow et al. (2010)): Auslöser der Kaskade sind im Fall der familiären AD Mutationen in APP- oder Presenilin-Genen, im Fall der sporadischen AD steht die Alterung im Zusammenspiel mit genetischen und weiteren Risikofaktoren am Anfang der Kaskade.

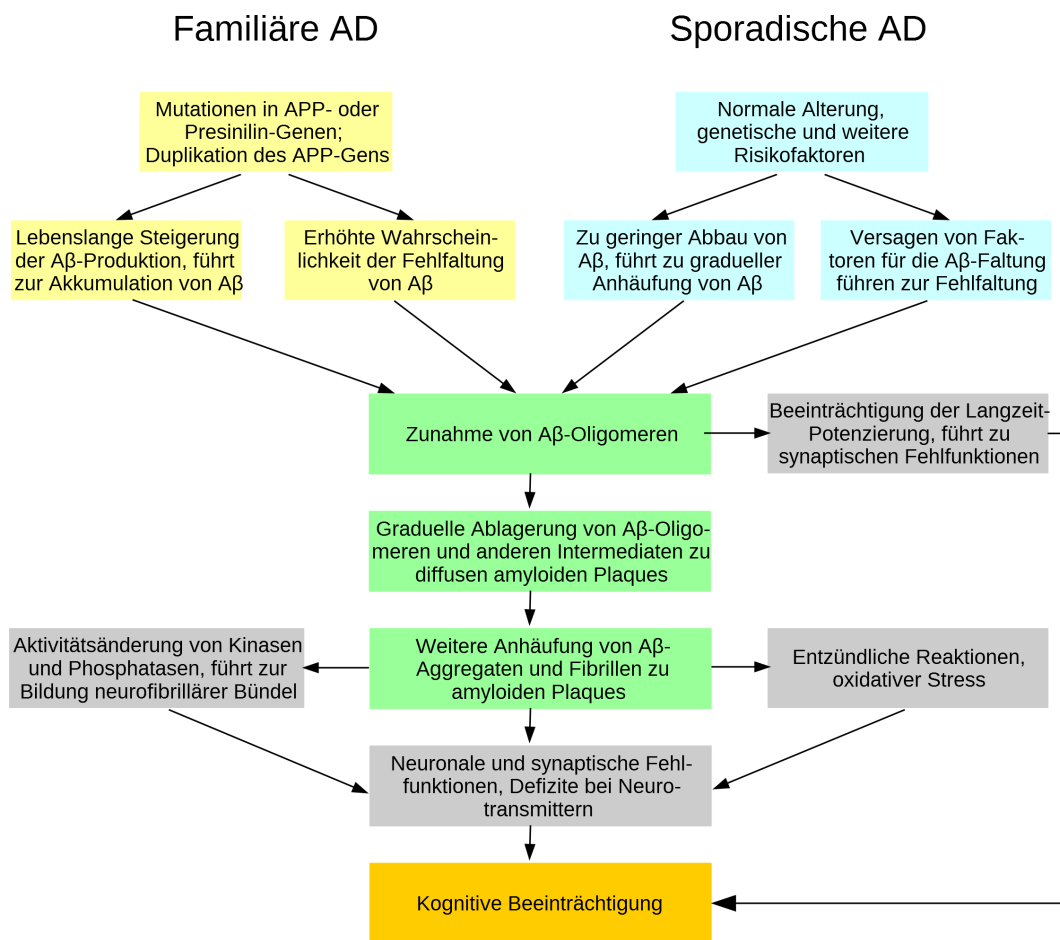


Abbildung 1.4: Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese. Nach diesem Modell führt sowohl bei der familiären als auch bei der sporadischen AD ein Ungleichgewicht zwischen der A β -Produktion und dem A β -Abbau oder eine Fehlfaltung und die daraus resultierende stärkere Neigung des A β zur Oligomerisierung zu einer Zunahme der Konzentration von A β -Oligomeren. Daraus resultieren alle weiteren Symptome der AD, wie zum Beispiel die Entstehung amyloider Plaques und die Bildung neurofibrillärer Bündel sowie entzündliche Reaktionen im Gehirn und neuronale und synaptische Fehlfunktionen, die letztendlich zu kognitiven Beeinträchtigungen führen. Nach Blennow et al. (2010).

Bei beiden Formen der AD sind die Folgen eine kontinuierliche Erhöhung der A β -Konzentration im Gehirn durch ein Ungleichgewicht von Produktion und Abbau des A β -Peptids oder eine inkorrekte Faltung des A β . Beides führt zu einer Zunahme an löslichen neurotoxischen A β -Oligomeren und unlöslichen Plaques. Der Verlust von Synapsen und das Fortschreiten der Krankheit korrelierten hierbei mit einer Zunahme von unlöslichem A β (McLean et al., 1999) und werden deshalb als direkte oder indirekte Folge dieser erhöhten A β -Konzentration angesehen. Auch die Hyperphosphorylierung von tau und die dadurch entstehenden neurofibrillären Bündel sind nach diesem Modell eine Folge der erhöhten A β -Konzentration.

Es ist jedoch zu betonen, dass es sich hierbei nur um eine Hypothese handelt, die zwar durch viele Forschungsergebnisse der letzten Jahre gestützt wird, jedoch auch noch deutlich Lücken aufweist. So ist zum Beispiel immer noch kein Mechanismus bekannt, der die Toxizität von löslichem A β erklärt.

1.1.4 Diagnose

1.1.4.1 Klinische Diagnose

Eine eindeutige Diagnose der AD kann bisher erst *post mortem* anhand des neuropathologischen Nachweises von amyloiden Plaques und neurofibrillären Bündeln in den Gehirnen der Patienten gestellt werden (Ballard et al., 2011). Einer eindeutigen und möglichst frühen Diagnose der AD kommt jedoch entscheidende Bedeutung zu – nicht nur für die Patienten selbst, sondern auch für die Entwicklung und spätere Anwendung von geeigneten Medikamenten. Da bisher keine eindeutige Diagnose der AD erfolgen kann, ist es nicht möglich, die Zielgruppe von klinischen Studien zum Testen von Medikamenten gegen AD genau festzulegen und den Krankheitsverlauf während der Studie zu verfolgen. Des Weiteren gilt eine frühe Behandlung der AD – möglichst noch vor dem Auftreten von kognitiven Symptomen und der irreversiblen Schädigung von Neuronen – als besonders aussichtsreich (Golde et al., 2011).

Die übliche Diagnose der AD erfolgt anhand von typischen Symptomen, ist jedoch – abhängig von den genauen klinischen und neuropathologischen Kriterien die zur Diagnose vor bzw. nach dem Tod der Patienten angewandt wurden – mit einer Sensitivität von 70,9 bis 87,3 % und einer Spezifität von nur 44,3 bis 70,8 % relativ

ungenau (Beach et al., 2012).

Es gibt verschiedene Empfehlungen zur Diagnose und Klassifizierung der AD (z.B. McKhann et al. 2011, ICD-10 der WHO 2010). Üblicherweise wird bei der klinischen Diagnose der AD zunächst eine Demenz festgestellt, zum Beispiel anhand des MMSE („*Mini-Mental-State-Examination*“), eines kurzen Tests, der als Interview mit Patienten durchgeführt wird, um deren kognitive Funktionen zu überprüfen. Dieser Test besteht aus verschiedenen Fragen und Aufgaben. Für jede erfolgreich absolvierte Aufgabe wird ein Punkt vergeben, maximal können 30 Punkte erreicht werden. Patienten, die weniger als 25 Punkte erreichen, gelten als kognitiv beeinträchtigt. Punktzahlen von unter 20 deuten auf eine Demenz des Patienten hin (Folstein et al., 1975).

Neben der Untersuchung von kognitiven Funktionen werden neuropsychologische Tests durchgeführt, genetische Prädispositionen geklärt und Hintergrundinformationen zu den Patienten und deren Angehörigen erfragt (Mucke, 2009). Hierbei ist eine Abgrenzung zu anderen Formen der Demenz und zur Depression wichtig. Letzteres stellt eine große Herausforderung dar (Beach et al., 2012). Zu diesem Zweck können bildgebende Verfahren (das sogenannte „Brain Imaging“) zum Feststellen einer Atrophie oder anderer Anzeichen von AD im Gehirn verwendet werden, oder Liquorproben der Patienten werden auf bestimmte Biomarker untersucht (Mucke, 2009). Beide Möglichkeiten werden in den nächsten Abschnitten erläutert.

1.1.4.2 Brain Imaging

Unter dem Begriff Brain Imaging werden verschiedene bildgebende Verfahren zusammengefasst, mit deren Hilfe direkt oder indirekt Struktur oder Aktivität des Gehirns dargestellt werden können (Gordon, 1999).

Durch Anwendung der Magnetresonanztomographie (MRT) kann die Struktur von Gewebe sichtbar gemacht und so eine Atrophie des Gehirns bzw. bestimmter Bereiche des Gehirns festgestellt werden. Mittels hoch-auflösender MRT konnte gezeigt werden, dass die Atrophie ein geeigneter Marker für die AD und deren Verlauf ist (Fox et al., 2000; Frisoni et al., 2010).

Mittels funktioneller Magnetresonanztomographie (fMRT) kann indirekt die neuronale Aktivität gemessen werden (Ogawa et al., 1990), wodurch schon in einem frühen Krankheitsstadium Fehlfunktionen des Gehirns im Zusammenhang mit AD detektiert werden können. Bisher wurden Untersuchungen mittels fMRT im Be-

reich der AD-Forschung allerdings erst von wenigen Arbeitsgruppen durchgeführt (Johnson et al., 2012). Die Studien zeigten verringerte Aktivität im Hippocampus (z.B. Grön et al. 2002; Greicius et al. 2004) sowie erhöhte Aktivität im präfrontalen Cortex von Patienten mit AD, letzteres eventuell zur Kompensation der verringerten Aktivitäten in anderen Arealen (Grady et al., 2003).

Auch die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) ist ein bildgebendes Verfahren, das in der Untersuchung und Diagnose der AD eingesetzt werden kann, indem es radioaktiv markierte Substanzen im Körper sichtbar macht. Hier werden insbesondere die beiden Substanzen ^{18}F -fluorodeoxyglucose (FDG) und ^{11}C -Pittsburgh compound B (PIB) häufig eingesetzt. Die Verwendung von FDG-PET gibt Aufschluss über den Glukose-Metabolismus und somit über die synaptische Aktivität. Mit dieser Methode konnte eine Verringerung des Glukose-Stoffwechsels im Gehirn von Patienten mit AD (Minoshima et al., 1995) auch schon Jahre vor den ersten klinischen Symptomen gezeigt werden (Mosconi et al., 2009). Mittels PIB-PET können unlösliche amyloide Ablagerungen im Gehirn der Patienten sichtbar gemacht werden. AD-Patienten zeigen eine deutlich stärkere PIB-Retention als eine Kontrollgruppe (Klunk et al., 2004). Der große Vorteil dieser Methode liegt in der sehr frühen Detektion von Amyloiden mittels PET, deutlich vor dem Einsetzen von kognitiven Beeinträchtigungen (Jack et al., 2013).

1.1.4.3 Molekulare Biomarker

Als Biomarker werden messbare Parameter bezeichnet, die als Indikatoren für biologische Prozesse dienen, wie zum Beispiel die Entwicklung und das Fortschreiten einer Krankheit (Blennow et al., 2010).

Im Falle der AD gelten neben Tests zur Bestimmung der kognitiven Fähigkeiten und den oben beschriebenen Methoden zum Brain Imaging insbesondere einige in Körperflüssigkeiten vorkommende Moleküle als vielversprechende Biomarker. Dabei wird der Biomarker-Gehalt meistens im *Liquor cerebrospinalis*, auch Zerebrospinalflüssigkeit (CSF) genannt und im Folgenden als Liquor bezeichnet, gemessen. Durch den direkten Kontakt des Gehirns mit dem Liquor geht man davon aus, dass sich biochemische Veränderungen des Gehirns auch im Liquor nachweisen lassen (Blennow et al., 2010). Zusätzlich wird angestrebt, geeignete Biomarker im peripheren Blut nachzuweisen (Geekiyana et al., 2012; Doecke et al., 2012), da Blutproben wesentlich einfacher und weniger invasiv als Liquorproben zu ent-

nehmen sind. Bisher entdeckte Biomarker für AD im Blut sind jedoch entweder nicht so zuverlässig wie die bisher gebräuchlichen Biomarker aus Liquor oder die Validierung der Biomarker steht noch aus (Hampel et al., 2010).

Insbesondere drei Liquor-Biomarker wurden bisher vielfach untersucht: $A\beta_{42}$ sowie Gesamt-tau und phosphoryliertes tau (Blennow, 2004; Hampel et al., 2010).

In vielen Studien konnte eine erhöhte Konzentration von Gesamt-tau im Liquor von AD-Patienten gegenüber Kontrollgruppen beobachtet werden (Kanai et al., 1998; Shaw et al., 2009; Sunderland et al., 2003). Die erhöhte tau-Konzentration spiegelt allerdings die neuronale und axonale Degeneration wider, ist also nicht spezifisch für AD, sondern kann auch bei Patienten festgestellt werden, die aus anderen Gründen von neuronaler Degeneration betroffen sind (Blennow, 2004).

Neben der Konzentration an Gesamt-tau im Liquor ist phosphoryliertes tau ein Biomarker für die AD. Hampel et al. (2004) untersuchten die Konzentration von phosphoryliertem tau-Protein mithilfe von Antikörpern, die spezifisch für drei verschiedene phosphorylierte Epitope sind, und ermittelten eine erhöhte Konzentration des phosphorylierten tau aller drei Epitope in AD-Patienten gegenüber einer nicht-dementen Kontrollgruppe und einer weiteren Gruppe, die Patienten mit anderen Demenzen umfasste.

Bei Autopsie-bestätigten AD-Patienten wurden mittels ELISA im Mittel geringere Konzentrationen von $A\beta_{42}$ im Liquor nachgewiesen als bei einer Gruppe kognitiv normaler Kontrollpersonen. Die $A\beta_{42}$ -Konzentration im Liquor von Patienten mit leichten kognitiven Beeinträchtigungen lagen zwischen diesen beiden Gruppen (Sunderland et al., 2003; Shaw et al., 2009). Auch eine inverse Korrelation der Menge an amyloiden Plaques im Gehirn und der $A\beta_{42}$ -Konzentration im Liquor konnte nachgewiesen werden (Fagan et al., 2006; Tapiola et al., 2009). Obwohl die Konzentration von $A\beta_{40}$ keinen signifikanten Unterschied zwischen AD- und Kontrollgruppen aufweist, wird in manchen Studien das Verhältnis von $A\beta_{40}$ zu $A\beta_{42}$ als genaueres Kriterium für die Diagnose oder den Verlauf von AD beschrieben als die Konzentration von $A\beta_{42}$ alleine (Shoji et al., 1998).

Als einzelner Marker gilt $A\beta_{42}$ als der genaueste zur Diagnose der AD (Welge et al., 2009), jedoch kann keiner der drei hier vorgestellten Biomarker mit den bisherigen Methoden als alleiniger Indikator für die eindeutige Diagnose der AD und die Abgrenzung zu anderen neurodegenerativen Krankheiten mit Demenz verwendet werden. Auch die Kombination von mehreren der hier vorgestellten Biomarker

ermöglicht keine absolut sichere Diagnose der AD, erhöht jedoch deren Genauigkeit (Welge et al., 2009; Andreasen et al., 2001; Maddalena et al., 2003). Für die Kombination aller drei Biomarker wurde eine Sensitivität von $> 95\%$ und eine Spezifität von $> 85\%$ für die Diagnose der sporadischen AD festgestellt (Humpel, 2011). Hansson et al. (2006) konnten anhand der Kombination von der Gesamttau- und der $A\beta_{42}$ -Konzentration mit einer Sensitivität von 95% und einer Spezifität von 83% schon im Stadium einer leichten kognitiven Beeinträchtigung die Entwicklung von AD vorhersagen.

1.1.4.4 Detektion von $A\beta$ -Oligomeren als Biomarker

Da inzwischen als sicher gilt, dass lösliche $A\beta$ -Oligomere, nicht aber Monomere und unlösliche Plaques, neurotoxische Wirkung haben und dadurch den Verlauf der AD beeinflussen oder sogar die AD auslösen könnten, gelten $A\beta$ -Oligomere als vielversprechende Biomarker für die AD. Die oben beschriebenen, mittels ELISA gemessenen, Konzentrationen von $A\beta$ beziehen sich auf die gesamte Menge an $A\beta$, oligomerisierte Spezies werden nicht von Monomeren unterschieden.

Es wurden bereits einige Studien über die Detektion speziell von $A\beta$ -Oligomeren in humanem Liquor mit verschiedenen Methoden veröffentlicht. Viele dieser Studien stellten eine höhere Oligomer-Konzentrationen in Liquor von AD-Patienten gegenüber Kontrollspendern fest (z.B. Sancesario et al. (2012); Herskovits et al. (2013); Georganopoulou et al. (2005); Hölttä et al. (2013)). Eine Beschreibung und Diskussion dieser Methoden erfolgt in Abschnitt 5.

Eine Methode zur sensitiven Detektion einzelner Moleküle ist das sFIDA-Verfahren, dessen Weiterentwicklung das Ziel dieser Arbeit ist. Nachfolgend werden die Entwicklung und Funktionsweise des sFIDA sowie bisherige Ergebnisse beschrieben.

1.2 sFIDA

sFIDA steht für *surface-based Fluorescence Intensity Distribution Analysis* und ist eine Methode, die schrittweise zur spezifischen und sensitiven Detektion von einzelnen Aggregaten und Oligomeren entwickelt wurde.

Pitschke et al. beschrieben bereits 1998, wie sie mittels FCS (fluorescence correlation spectroscopy) einzelne A β -Oligomere nachwiesen. Sie gaben Fluorochrom-markiertes A β zu Liquor von Patienten mit AD und von Kontrollspendern. Wenn im Liquor A β -Oligomere vorkommen, die als Seeds fungieren, werden diese schnell weiter oligomerisieren und markiertes A β inkorporieren. Bei Messungen im FCS diffundieren diese Fluorochrom-markierten A β -Oligomere durch einen Laserfokus und das vom Fluorochrom emittierte Licht wird detektiert. Bei diesem Experiment wurde mit Liquor von Kontroll-Spendern nur ein schwaches Signal aus gelegentlichen kleinen Fluoreszenz-Signalen detektiert, die auf eine spontane Oligomerisierung des markierten A β s zurückgeführt wurden. Mit Liquor aus AD-Patienten dagegen wurden deutlich stärkere Fluoreszenz-Signale gemessen. Dieses Ergebnis wurde auf das Vorkommen von Seeds im Liquor von AD-Patienten zurückgeführt, die die schnelle Polymerisierung des Fluorochrom-markierten A β an die Seeds auslösten.

Eine ähnliche Methode wurde von Bieschke et al. (2000) und Birkmann et al. (2006) angewandt, um die pathogene Form des Prion-Proteins im Liquor von Patienten mit Creutzfeld-Jakob-Krankheit bzw. in Gehirnhomogenaten von BSE-infizierten Rindern und Scrapie-infizierten Hamstern zu detektieren. Anstelle des oben beschriebenen Seeding-Mechanismus mit markierten Peptiden verwendeten sie jedoch zwei verschiedene und mit unterschiedlichen Fluorochromen markierte Antikörper. Nur bei gleichzeitiger Detektion beider Fluorochrome im FCS wurde ein Signal als Event gewertet, wodurch die Spezifität dieser Methode verbessert wird. Die Auswertung wurde als FIDA (Fluorescence-Intensity Distribution Analysis – „Analyse der Verteilung der Fluoreszenzintensitäten“) bezeichnet (Kask et al., 1999).

2007 veröffentlichten Birkmann et al. (2007) eine weitere Veränderung zur Erhöhung der Sensitivität dieser Methode, die sie „surface-FIDA“ nannten: Sie immobilisierten die Prionen-Aggregate mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers auf einer Glas-Oberfläche und umgingen so das Problem, dass Aggregate in den FCS-Messungen entweder nur sehr langsam diffundieren oder zu Boden sinken und immer nur ein kleiner Teil der Probe gemessen werden konnte. Nach der Immobilisierung wurden wieder zwei verschiedene, mit unterschiedlichen Fluorochromen markierte Detektionsantikörper auf die Oberfläche gegeben, die die Aggregate binden. Der Aufbau entspricht also dem eines ELISAs, allerdings wurde im Gegensatz zum ELISA nicht das Gesamt-Signal ausgelesen, sondern die Oberfläche wurde abge-

cannt. Dort, wo Prionen-Aggregate auf der Oberfläche gebunden waren, wurde ein kolokalisiertes Signal beider Fluorochrome aufgezeichnet. Mithilfe dieser Methode konnten die Autoren anhand von Gehirnhomogenaten Scrapie-infizierte Hamster von gesunden Hamstern und BSE-infizierte Rinder von gesunden Rindern unterscheiden, außerdem waren die Standardabweichungen der Ergebnisse gegenüber der FCS-Messung in Flüssigkeit deutlich verringert. Des Weiteren untersuchten sie Liquorproben von BSE-infizierten Rindern und konnten in 5 von 8 Fällen Prion-Protein-Aggregate nachweisen.

Funke et al. veröffentlichten 2007 und 2008 die Anwendung des surface-FIDA zur Detektion von A β -Oligomeren aus synthetischem A β oder in Liquorproben. Um keine Monomere zu detektieren, die in hoher Konzentration auch im Liquor gesunder Menschen vorkommen, wählten die Autoren zwei der verwendeten Antikörper (einen zur Immobilisierung und einen der beiden Detektionsantikörper) so aus, dass die Epitope überlappten. So kann neben dem Immobilisierungs-Antikörper maximal einer der beiden Detektionsantikörper an Monomeren binden und es kommt kein kolokalisiertes Signal beider Fluorochrome zustande. Oligomere dagegen können mehrere Detektionsantikörper binden. An jedem Oligomer, an dem beide Detektionsantikörper binden, wird ein kolokalisiertes Signal beider Fluorochrome detektiert. In ersten Anwendungen des surface-FIDA mit menschlichem Liquor konnte in den genannten Veröffentlichungen gezeigt werden, dass bei Messungen mit Liquor von AD-Patienten mehr kolokalisierte Signale auftraten als bei Liquor von Kontroll-Spendern.

2010 wurde über die Umstellung von FCS hin zur Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM) berichtet (Funke et al., 2010) und in einer neueren Veröffentlichung sind weitere Optimierungen des Assays und die damit erzielten Ergebnisse mit humanen Liquorproben beschrieben (Wang-Dietrich et al., 2013). In dieser Arbeit wurde die Glasoberfläche kovalent mit Dextran bedeckt, um unspezifische Wechselwirkungen von Probenbestandteilen mit dem Glas zu vermeiden. An das Dextran wiederum wurden A β -spezifische Immobilisierungs-Antikörper kovalent gebunden. Als Ergebnis (readout) des Assays gelten nach der Umstellung von FCS auf LSM nun nicht mehr Fluoreszenz-Signale, sondern die Anzahl an Pixeln, die heller sind als das Hintergrundsignal. Wang-Dietrich et al. demonstrierten mit diesem Assay ein eindeutig Oligomer-spezifisches Testsystem, das signifikante Unterschiede in den

gemessenen Oligomer-Konzentrationen in Liquorproben von AD-Patienten gegenüber den Proben einer Kontrollgruppe zeigte.

Abbildung 1.5 zeigt schematisch den Aufbau des inzwischen als sFIDA bezeichneten Assays.

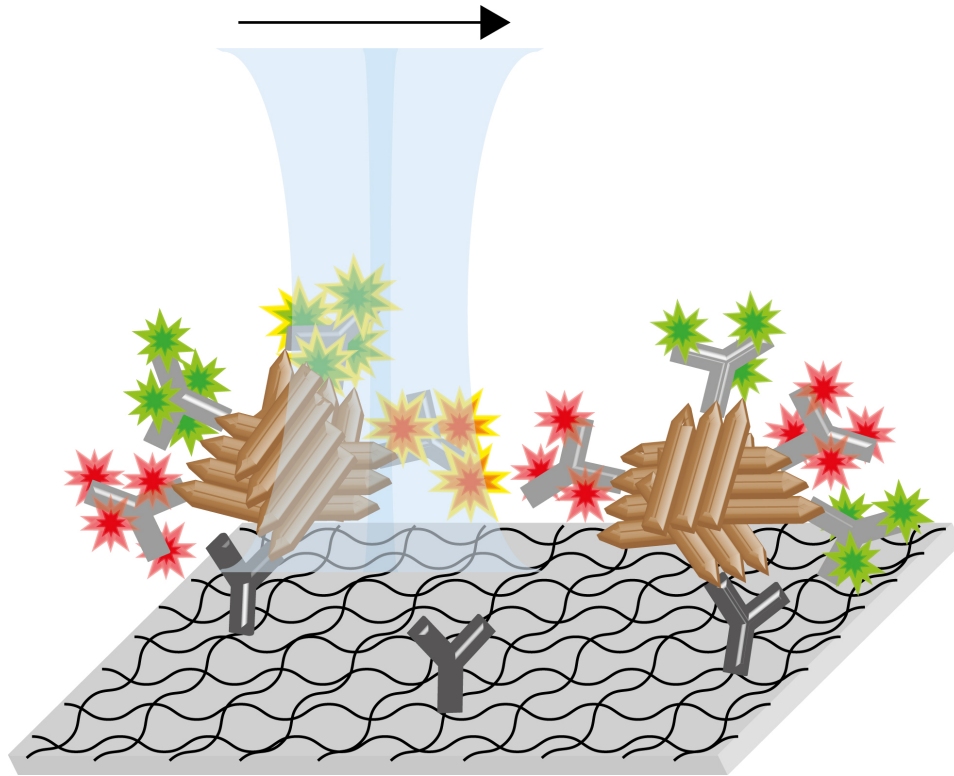


Abbildung 1.5: Schematischer Aufbau des sFIDA. Auf einer Glasplatte, in hellgrau dargestellt, sind vernetzte Dextran-Moleküle (schwarze Linien) kovalent gebunden, an die wiederum A β -spezifische Immobilisierungs-Antikörper gebunden sind (dunkelgraue Y-Symbole). In der Probe vorhandene A β -Oligomere (in braun dargestellt) binden an die Immobilisierungs-Antikörper. Die Detektionsantikörper (hellgraue Y-Symbole) sind mit zwei verschiedenen Fluorochromen (rote und grüne Sterne) markiert. Nach der Vorbereitung der Oberfläche wird diese mit Lasern (in hellblau dargestellt) der entsprechenden, zu den Fluorochromen passenden Wellenlängen gescannt. An den Stellen, an denen die Laser Oligomere und die daran gebundenen Fluorochrome scannen, entstehen fluoreszente Signale mit den entsprechenden spezifischen Wellenlängen der beiden Fluorochrome. Nur dort, wo ein Signal beider Fluorochrome detektiert wird, werden die entsprechenden Pixel als positive Pixel gewertet und tragen zu dem Endergebnis – dem readout – des Assays bei.

2. Zielsetzung

Weltweit sind etwa 5-7 % aller über 60-jährigen von einer Demenz betroffen. Die häufigste Form der Demenz ist die AD, deren genaue Diagnose und Abgrenzung zu anderen Demenzen bisher erst nach dem Tod der Patienten erfolgen kann. Eine eindeutige und möglichst frühe Diagnose der AD wäre jedoch von entscheidender Bedeutung: Einerseits für die Entwicklung von Medikamenten und andererseits um die Therapie der AD mit diesen Medikamenten einleiten zu können, noch bevor Neuronen irreversibel geschädigt werden und kognitive Beeinträchtigungen des Patienten auftreten.

Ein charakteristisches Merkmal der AD im Gehirn von Patienten sind Plaques aus A β . Studien deuten jedoch darauf hin, dass es nicht die großen unlöslichen Plaques, sondern kleinere, lösliche A β -Oligomere sind, die neurotoxische Wirkung besitzen und deshalb eine bedeutende Rolle in der Krankheitsentstehung der AD spielen könnten (Haass und Selkoe, 2007). Aus diesem Grund gelten A β -Oligomere in Körperflüssigkeiten als möglicher Biomarker für die frühe Diagnose der AD (Blennow et al., 2010).

Der in dieser Arbeit verwendete sFIDA-Assay basiert auf der sensitiven und spezifischen Detektion einzelner A β -Oligomere.

Der sFIDA soll in der vorliegenden Arbeit optimiert werden. Dafür werden einzelne Schritte des sFIDA-Protokolls überprüft und nach Möglichkeit so verändert, dass das Verhältnis von Nutzsignal zu Hintergrundsignal und somit die Sensitivität des Assays für A β -Oligomere verbessert wird. Das optimierte Protokoll soll anschließend anhand von Liquor-Proben von Patienten mit AD und Kontrollspendern getestet werden. Die hierbei erzielten Ergebnisse werden im Hinblick auf Unterschiede zwischen dem Liquor von AD- und Kontrollspendern untersucht.

Des Weiteren soll eine Machbarkeitsstudie durchgeführt werden: Hier wird geprüft, ob zum Nachweis der A β -Oligomere im sFIDA anstelle der herkömmlichen Analyse durch die Kollokalisierung zweier Fluorochrom-markierter Detektionsantikörper auch das resultierende FRET-Signal der beiden Fluorochrome verwendet werden kann.

Ein weiteres Teilprojekt beschäftigt sich mit der Herstellung von stabilisierten A β -Oligomeren für den Einsatz im sFIDA. Dazu soll eine geeignete Methode entwickelt werden, um die A β -Peptide einzelner Oligomere kovalent zu vernetzen. Die stabilisierten Oligomere sollen biochemisch und biophysikalisch charakterisiert und schließlich im sFIDA-Assay als Standardmolekül getestet werden.

Folgende Eigenschaften der Oligomere sind dabei wünschenswert: Sie sollen eine definierte Größe aufweisen, bei mehrmonatiger Lagerung unverändert bleiben, und die Bindung der Oligomere durch die im sFIDA verwendeten Antikörper muss trotz der Stabilisierung gewährleistet sein. Nur dann können die stabilisierten Oligomere als Standardmoleküle und zur weiteren Optimierung und Validierung des sFIDA dienen.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3.1: In dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien. (UZ = Ultrazentrifugation)

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
1,5 ml Zentrifugenröhrchen (für UZ)	Beckmann Coulter (Pasadena, USA)
15 ml Zentrifugenröhrchen	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
50 ml Zentrifugenröhrchen	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Any kD Mini-PROTEAN TGX Gel	Bio-Rad (München, Deutschland)
Einmal-Nitril-Handschuhe Format Blue	Unigloves (Troisdorf-Spich, Deutschland)
Fusselfreie Tücher: Kimtech Science	Kimberly-Clark (Dallas, USA)
Kupfernetz S160 für die Elektronenmikroskopie	Plano GmbH (Wetzlar, Deutschland)
Küvetten Uvette	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Pasteur-Pipetten aus Glas	Brand (Wertheim, Deutschland)
Polyallomer Centrifuge Tubes (11x34 mm, für UZ)	Beckmann Coulter (Pasadena, USA)
Protein LoBind Tube 1,5 ml	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Protein LoBind Tube 5 ml	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
SealPlate film	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Slide-A-Lyzer MINI Dialysis Devices, 20K MWCO, 0,5 ml	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)
Spritzen Ecoject Plus	Dispomed (Gelnhausen, Deutschland)
Spritzenfilter PVDF (0,22 µm)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Zeba Spin Desalting Columns, 40K MWCO, 2ml	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)
Zentrifugen-Säulen 2 ml	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)

3.1.2 Chemikalien

Tabelle 3.2: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller
β -Mercaptoethanol	Sigma (St. Louis, USA)
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC)	Fluka (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
A β ₁₋₄₂	Bachem (Bubendorf, Schweiz)
Albumin Fraktion V (BSA) ≥ 98 %	Carl Roth (Karslsruhe, Deutschland)
Bromphenol Blau	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
CM-Dextran sodium salt BioXtra	Sigma (St. Louis, USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO) $\geq 99,5$ %	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Di-Natriumphosphat Dihydrat $\geq 99,5$ %	Carl Roth (Karslsruhe, Deutschland)
Essigsäure (100 %)	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol (96 %)	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol absolut	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Ethanolamin $\geq 99,5$ %	Aldrich (St. Louis, USA)
Ethanolamin-Hydrochlorid $\geq 99,0$ %	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Fetales bovines Serum (FBS)	PAA Laboratories (Pasching, Österreich)
Formaldehyd	Carl Roth (Karslsruhe, Deutschland)
Glycerin	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Hexafluorisopropanol (HFIP)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kaliumchlorid	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat ≥ 99 %	Carl Roth (Karslsruhe, Deutschland)
Kaliumhexacyanoferrat ($K_3Fe(CN)_6$)	Fluka (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
Milchpulver: Nonfat dried milk powder	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Natriumazid	Carl Roth (Karslsruhe, Deutschland)
Natriumbicarbonat	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Natriumchlorid	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Natriumhydroxid (NaOH) ≥ 99 %	Carl Roth (Karslsruhe, Deutschland)
Natriumthiosulfat ($Na_2S_2O_3$)	Sigma (St. Louis, USA)
N-Hydroxysuccinimid (NHS) 98 %	Aldrich Chemistry
Page Ruler unstained broad range protein ladder	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)
Saccharose	Sigma (St. Louis, USA)
Schwefelsäure (96 %)	Fluka (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
SDS Pellets ≥ 99 %	Carl Roth (Karslsruhe, Deutschland)
Silbernitrat ($AgNO_3$)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Tris Buffer grade	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Tween 20	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Uranylacetat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Wasserstoffperoxid (30 %)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

3.1.3 Puffer und Lösungen

Wenn nicht anders angegeben, wurde in dieser Arbeit Milli-Q Wasser (erzeugt durch die Millipore-Anlage; Wasserwiderstand: 18,2 M Ω ·cm) verwendet.

Alle Puffer wurden vor der Verwendung autoklaviert (20 min, 1,2 bar, 121 °C).

Tabelle 3.3: In dieser Arbeit verwendete Puffer und Lösungen.

Puffer	Zusammensetzung/Hersteller
4x Lämmli-Probenpuffer	40 % Glycerin, 0,5 % Bromphenolblau Na-Salz, 8 % SDS, 0,225 mM Tris (pH 6,8), 8 % β -Mercaptoethanol
Dulbecco's PBS (10x)	GE-Healthcare (Uppsala, Schweden)
Laufpuffer (für SDS-Gele)	25 mM Tris, 250 mM Glycin
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,8 mM KH_2PO_4 , 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, pH 7,4
Piranha-Lösung	3 Teile Schwefelsäure (96 %) + 1 Teil Wasserstoffperoxid (30 %)
SEC-Puffer	50 mM Natriumphosphat (pH 7,4), 150 mM NaCl, 0,6 % Tween
TBS	136 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 24,7 mM Tris, pH 7,4
TBST	TBS + 0,05 % Tween

3.1.4 Kits und Antikörper

Tabelle 3.4: In dieser Arbeit verwendete Kits.

Kit	Hersteller
Alexa Fluor (AF) 546 Monoclonal Antibody Labeling Kit	Life Technologies (Carlsbad, USA)
Alexa Fluor (AF) 633 Protein Labeling Kit	Life Technologies (Carlsbad, USA)
Alexa Fluor (AF) 647 Monoclonal Antibody Labeling Kit	Life Technologies (Carlsbad, USA)
Antibody Clean-up Kit	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA)
Atto488 (NHS-Ester)	ATTO-TEC (Siegen, Deutschland)
Atto647 (NHS-Ester)	ATTO-TEC (Siegen, Deutschland)
ExtraSense BCA Protein Assay Kit	BioVision, Inc. (Milpitas, USA)
Gel Filtration Calibration Kit HMW	GE-Healthcare (Uppsala, Schweden)
Gel Filtration Calibration Kit LMW	GE-Healthcare (Uppsala, Schweden)
Zenon Alexa Fluor (AF) 405 Mouse IgG2a Labeling Kit	Life Technologies (Carlsbad, USA)

Tabelle 3.5: In dieser Arbeit verwendete Antikörper.

Antikörper	Hersteller
6E10	Covance (Princeton, USA)
6E10-Alexa Fluor (AF) 488	Covance (Princeton, USA)
IC16	Prof. Dr. Carsten Korth, Institut für Neuropathologie der Medizinischen Fakultät (Universität Düsseldorf, Deutschland)
Nab228	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

3.1.5 Geräte

Tabelle 3.6: In dieser Arbeit verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
ÄKTApurifier 900	GE-Healthcare (Uppsala, Schweden)
ChemiDoc MP Imaging System	Bio-Rad (München, Deutschland)
Elektrophorese-Kammer Mini Protean Tetra Cell	Bio-Rad (München, Deutschland)
Elektrophoresis Power Supply - EPS 1001	GE-Healthcare (Uppsala, Schweden)
Feinwaage AB54	Mettler-Toledo (Columbus, USA)
Lambda 25 UV/VIS Spectrometer	Perkin-Elmer Instruments (Waltham, USA)
Millipore-Anlage	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
pH-Meter MP 220	Mettler-Toledo (Columbus, USA)
Plasmacleaner Zepto	Diener electronic (Ebhausen, Deutschland)
Refraktometer AR4	Krüss (Hamburg, Deutschland)
Rotor TLS-55	Beckmann Coulter (Pasadena, USA)
Speedvac: Concentrator 5301	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Spritze (gasdicht)	Hamilton (Reno, USA)
SuperDex-Säule 75 10/300	GE-Healthcare (Uppsala, Schweden)
ThermoMixer C	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
TIRF-Mikroskop AM TIRF MC	Leica Microsystems (Wetzlar, Deutschland)
Tischzentrifuge	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Transmissions-Elektronenmikroskop Libra 120	Carl Zeiss AG (Jena, Deutschland)
Ultrazentrifuge Optima MAX-XP	Beckmann Coulter (Pasadena, USA)
Mikroplatten-Washer 405 Select LS	BioTek (Winooski, USA)
Zentrifuge 5427 R	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)

3.1.6 Software

Tabelle 3.7: In dieser Arbeit verwendete Software.

Software	Hersteller/Entwickler
Adobe Photoshop 5 CS5	Adobe Systems (San Jose, USA)
Fiji	Schindelin et al. (2012) (basiert auf ImageJ)
GIMP 2.8	Spencer Kimball, Peter Mattis und das GIMP-Entwicklerteam
ImageJ	National Institutes of Health (Bethesda, USA)
JabRef 2.9.2	Morten O. Alver, Nizar N. Batada u. a.
LAS AF	Leica Microsystems (Wetzlar, Deutschland)
LibreOffice (Draw) 4.2.5.2	The Document Foundation
LyX 2.1.1	LyX-Team
Microsoft Office 2010 (Excel)	Microsoft (Redmond, USA)
MikTeX 2.9	Christian Schenk
OriginPro 8.5.0	OriginLab Corporation (Northampton, USA)
sFIDa	Fabian Dreßen, Yvonne Herrmann, Johannes Willbold
TeXnicCenter 2.02	The TeXnicCenter Team

3.1.7 Multiwellplatten aus Glas

Die Rahmen vieler Multiwellplatten bestehen aus Polystyrol. Da A β dafür bekannt ist, an Polystyrol zu binden (Lewczuk et al., 2006), wurden im sFIDA zur Detektion von A β -Oligomeren nur Multiwellplatten verwendet, die vollständig aus Glas bestehen. Diese Glasplatten lassen sich einheitlich beschichten, um die unspezifische Bindung von A β an der Glasoberfläche zu verhindern.

Zu Beginn dieser Arbeit wurden sogenannte „Mikroglas-Platten“ der Firma mikroglass chemtech (Langen, Deutschland) verwendet, die als Sonderanfertigung für die Verwendung im sFIDA hergestellt wurden (Wang-Dietrich, 2012). Diese Glasplatten haben 384 Vertiefungen mit einem Durchmesser von je 3,5 mm und einer Höhe von 6 mm. Diese Vertiefungen, im Folgenden als Wells bezeichnet, haben also jeweils eine Fläche von 9,6 mm² und ein Volumen von 57 μ l. Auf dem aus 0,17 mm dickem Borosilikatglas bestehenden Boden der Glasplatte sind drei perforierte Glasplatten (mit je 2 mm Schichtdicke) mit je 384 Löchern ausschließlich durch Hitze und ohne Verwendung von Klebstoffen befestigt. Weil die Größe dieser Platten nicht den Standardmaßen von Multiwellplatten entspricht, wurde von der Zentralabteilung für Technologie (ZAT) im Forschungszentrum Jülich ein Aluminiumrahmen hergestellt, der als Adapter dient um die Glasplatte auf dem Mikroskopiertisch zu befestigen.

Durch die Produktion der Glasplatten ohne Verwendung von Klebstoffen wird ausgeschlossen, dass Klebstoff in die Wells gelangen kann – etwa durch unsaubere Verklebung oder weil Klebstoff durch die im Assay verwendeten Chemikalien gelöst wird. Klebstoff in den Wells stellt eine Verunreinigung dar und kann durch Autofluoreszenz oder Bindung von verschiedenen im sFIDA eingesetzten Reagenzien zu Artefakten führen. Die Befestigung der verschiedenen Komponenten aus Glas durch Hitze und Druck führt allerdings dazu, dass der Boden der Glasplatten nicht ganz eben ist. Bei der Messung durch TIRF-Mikroskopie, bei der die Bodenstärke der Glasplatte und der Einfallswinkel des Laserstrahls auf die Glasplatte entscheidende Bedeutung für die Eindringtiefe des Lichts in das Probenvolumen haben, führt das zu einer ungleichmäßigen Ausleuchtung der Fläche.

Um dieses Problem zu umgehen, wurden spezielle, bei der ZAT gefertigte Glasplatten für den sFIDA verwendet; diese Glasplatten werden im Folgenden als ZAT-Glasplatten bezeichnet. Sie wurden mit den Standardmaßen von Multiwellplatten angefertigt (127,76x85,48 mm) und haben 96 Wells im Abstand von je 9 mm. Jedes Well hat einen Durchmesser von 3,5 mm, eine Oberfläche von 9,6 mm² und ein Volumen von 52,8 µl. Diese Glasplatten werden hergestellt, indem eine 5,5 mm starke Glasplatte mit 96 gebohrten Löchern auf einer 0,17 mm dicke Glasplatte mithilfe eines UV-Klebers befestigt wird. Dieser Kleber härtet unter Bestrahlung mit UV-Licht aus und wird nicht durch die im sFIDA verwendeten Chemikalien gelöst.

Welche der hier beschriebenen und in Abbildung 3.1 gezeigten Glasplatten für die einzelnen Versuche jeweils verwendet wurden, ist an entsprechender Stelle im experimentellen Teil vermerkt.

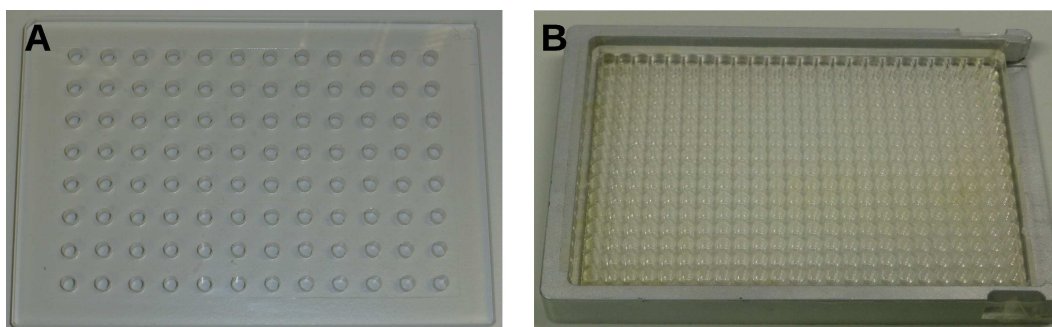


Abbildung 3.1: In dieser Arbeit verwendete Multiwellplatten aus Glas. A: ZAT-Platte, B: Mikroglass-Platte mit dem von der ZAT gefertigten Adapter aus Aluminium.

3.2 Methoden

3.2.1 Vorbereitung des A β

Lyophilisiertes, synthetisches A β_{1-42} der Firma Bachem wurde zunächst in einer Konzentration von 0,5 mM in Hexafluorisopropanol (HFIP) über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde das A β mit Hilfe einer gasdichten Spritze in Protein low-binding Reaktionsgefäße aliquotiert. Die Aliquots wurden entweder direkt weiterverwendet oder bei -80°C bis zur Verwendung eingefroren.

Vor der Verwendung wurde das HFIP 1 h bei 30°C ohne Rotation in der Speedvac verdampft. Danach kann das A β zur Oligomerisierung in PBS gelöst werden.

3.2.2 Präparation von A β -Aggregaten

Das gemäß den Angaben in Abschnitt 3.2.1 vorbereitete A β_{1-42} wurde in einer Konzentration von 100 μM in PBS gelöst und mindestens 3 h bei Raumtemperatur oder 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. In dieser Zeit bilden sich im PBS lösliche Oligomere und unlösliche Aggregate, die nicht näher untersucht wurden und im Folgenden als „A β -Aggregate“ bezeichnet werden.

3.2.3 Präparation von „SEC-Oligomeren“

„SEC-Oligomere“ wurden mittels Größenausschluss-Chromatographie (engl.: size exclusion chromatography, abgekürzt SEC) von Monomeren getrennt. Dafür wurden zunächst 250 μg A β_{1-42} wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben vorbereitet. Das A β wurde in 530 μl SEC-Puffer gelöst und 10 min bei 37°C (ohne Schütteln) inkubiert. Die Probe wurde 30 s mit 20.000 g zentrifugiert; direkt im Anschluss 450 μl des Überstands auf die an der ÄKTA angeschlossene Säule (SuperDex 75 10/300) aufgetragen. Die Flussrate (SEC-Puffer) betrug 0,6 ml. Die erste proteinhaltige Fraktion mit den Oligomeren wurde aufgefangen und die A β -Konzentration mittels BCA-Assay (Durchführung: Maren Hülsemann) bestimmt.

3.2.4 Reinigung der Mikroglas-Platten mit Piranha-Lösung

Vor ihrer Wiederverwendung wurden die Mikroglas-Platten mit Piranha-Lösung gereinigt. Dafür wurde zu 3 Teilen 96 %iger Schwefelsäure langsam ein Teil Was-

serstoffperoxid gegeben. Nach vorsichtiger Mischung wurde die Lösung auf die Mikroglass-Platten geträufelt, bis alle Wells gefüllt und die Platte vollständig benetzt war. Eventuelle Luftblasen in den Wells wurden mit Hilfe einer Pasteur-Pipette aus Glas entfernt. Die Lösung wurde 30 min inkubiert, anschließend wurden Platte und Wells lange und gründlich mit VE-Wasser, zum Schluss mit Millipore-Wasser, gespült. Die Platten wurden mit den Wellöffnungen nach unten getrocknet, um zu vermeiden, dass Staub in die Wells gelangt.

3.2.5 Fluorochrom-Markierung von Antikörpern

Der Antikörper 6E10 wurde mit den Fluorochromen Alexa Fluor 488 oder Atto 488 im sFIDA eingesetzt, der Antikörper IC16 mit den Fluorochromen Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 647 oder Atto 647N. 6E10-Alexa Fluor 488 wurde kommerziell von der Firma Covance bezogen, für alle anderen Kombinationen aus Antikörpern und Fluorochromen wurde die Markierung im eigenen Haus durchgeführt.

Vor der Markierung der Antikörper mit Fluorochromen wurde eventuell vorhandenes Natriumazid durch Dialyse gegen PBS entfernt.

Die Markierung mit dem Fluorochrom Alexa Fluor 647 erfolgte mit dem „Alexa Fluor 647 Monoclonal Antibody Labeling Kit“, die Markierung mit Alexa Fluor 633 mit dem „Alexa Fluor 633 Protein Labeling Kit“ nach Herstellerangaben. Nach Aufreinigung der Fluorochrom-markierten Antikörper wurde die Antikörper-Konzentration und die Markierungseffizienz (durchschnittliche Anzahl Fluorochrome pro Antikörper) anhand des Absorptionsspektrums berechnet.

Für die Markierung der Antikörper mit Atto 488 und Atto 647N wurden mit NHS-Estern modifizierte Fluorochrome verwendet. Zu dem Antikörper wurde ein Zehntel des Gesamtvolumens Natriumbicarbonat (1 M, pH 9) gegeben. Dann wurde das Atto-Fluorochrom im 5-fachen molaren Überschuss zu dem Antikörper gegeben, gut gemischt und 1 h bei Raumtemperatur und vor Licht geschützt unter Schütteln inkubiert. Die Reinigung erfolgte mit Gelfiltrations-Säulen, gefüllt mit 1,5 ml der Komponente C (Purification Resin) aus dem Alexa Fluor 647 Monoclonal Antibody Labeling Kit. Die Matrix wurde bei 1.000 g für 1 min zentrifugiert. Nach dem Auftragen des Gemischs aus Antikörpern und Fluorochromen wurde 3 min bei 1.000 g zentrifugiert. Antikörper mit gebundenen Fluorochromen befinden sich danach im Durchfluss, während freier Farbstoff im Säulenmaterial verbleibt. Auch hier wurden durch Absorptionmessung die Proteinkonzentration und die Markie-

rungseffizienz der im Durchfluss enthaltenen markierten Antikörper bestimmt.

Mit welchen Fluorochromen die Detektionsantikörper in den jeweiligen Versuchen markiert waren, ist an entsprechender Stelle vermerkt.

3.2.6 Produktion und Charakterisierung stabilisierter A β -Oligomere („KK-Oligomere“)

3.2.6.1 Herstellung von KK-Oligomeren aus A β _{1–42}

Es wurde zunächst eine Lösung mit 62,5 % (w/v) Saccharose in PBS hergestellt. Aus dieser Lösung wurden alle anderen, für den Dichtegradienten benötigte Lösungen mit geringeren Saccharose-Konzentrationen hergestellt. Standardmäßig wurde den Fraktionen mit 10 bis 50 % Saccharose zusätzlich 200 mM EDC und 100 mM NHS zugefügt (Abweichungen sind an entsprechender Stelle im experimentellen Teil notiert). Tabelle 3.8 zeigt die eingesetzten Konzentrationen und Volumina der verschiedenen Fraktionen. Der Dichtegradient wurde zunächst in Zentrifugenröhrchen vorsichtig geschichtet, angefangen mit der höchsten Saccharose-Konzentration hin zu den geringeren Konzentrationen. Schließlich wurden 200 μ l Probe (A β _{1–42}, vorbereitet wie in 3.2.1 beschrieben, danach 80 μ M in PBS gelöst und 45-70 min bei Raumtemperatur vorinkubiert) vorsichtig auf den Dichtegradienten geschichtet.

Tabelle 3.8: Saccharose-Konzentrationen und Volumina der einzelnen Fraktionen in der Dichtegradientenzentrifugation zur Produktion von quervernetzten A β -Oligomeren

Saccharosekonzentration in PBS (% w/v)	Volumen (μ l)
5	100
10	300
15	300
20	300
25	200
30	200
40	200
50	100

Die anschließende Ultrazentrifugation erfolgte im Ausschwing-Rotor TLS-55 für 3 h 10 min bei 259.000 g und 4°C, die Beschleunigung wurde auf 8 eingestellt (1 ist die schnellste, 9 die langsamste Beschleunigung), die Bremse wurde

ausgeschaltet (Einstellung „Coast“).

Nach dem Ende der Zentrifugation wurden Fraktionen mit je 150 µl sehr sorgfältig von oben nach unten entnommen und in dieser Reihenfolge mit den Nummern 1-13 benannt. Sofern dem Gradienten EDC und NHS zugefügt worden war, wurde jede der Fraktionen mit 30 µl Ethanolamin-Hydrochlorid gemischt, um die Quervernetzung des Aβ zu stoppen.

3.2.6.2 Reinigung der KK-Oligomere

Um Saccharose, EDC, NHS und Ethanolamin-Hydrochlorid aus den Fraktionen mit den stabilen Oligomeren zu entfernen, wurden die Fraktionen zunächst mit Entsalzungssäulen (40 kDa Ausschlussgrenze) nach Herstellerangaben gereinigt. Als Puffer wurde PBS verwendet. Im Anschluss wurden die Fraktionen 3x mindestens 8 h gegen je 2 l PBS dialysiert (mit 20 kDa Ausschlussgrenze).

3.2.6.3 Lagerung der KK-Oligomere

Die KK-Oligomere wurden in Aliquots bei -20°C eingefroren.

3.2.6.4 SDS-PAGE und Silberfärbung

SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) ist eine Methode zur Analyse von Proteinen. Zunächst werden die Proteine mit Lämmli-Probenpuffer versetzt und aufgekocht. Durch die Hitzedenaturierung werden die Proteine linearisiert. Durch die Anwesenheit von negativ geladenem SDS, welches an das Proteinrückgrat bindet (1 Molekül SDS pro 2 Aminosäuren), bleibt diese Linearisierung auch nach dem Abkühlen der Proben erhalten. Im Anschluss werden die so vorbereiteten Proteine auf ein Gel aufgetragen und ein elektrisches Feld angelegt, das zur Migration der negativ geladenen Proben durch das Gel führt. Diese Elektrophorese erlaubt eine Auftrennung der Proteine im Wesentlichen nach deren Molekülmasse, die durch die Linearisierung proportional zur Kettenlänge ist. Bei Molekülen, die sich aufgrund ihrer kovalenten Quervernetzung nicht linearisieren lassen, ist die Auftrennung allerdings auch von der Konformation und der Menge an gebundenem SDS abhängig.

Die Silberfärbung ist ein sensitives Verfahren zur Visualisierung von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen. Silber-Ionen aus Silbernitrat binden dabei an Prote-

ine im Gel. Durch Formaldehyd werden die Silber-Kationen reduziert, was zu einer dunklen Färbung der Proteine im Gel führt.

Es wurden Polyacrylamid-Gele („Any kD MINI“) verwendet. 11 µl Probe wurden jeweils mit 4 µl Lämmli-Probenpuffer gemischt und 10 min bei 95 °C inkubiert. Das gesamte Volumen wurde als Probe in die Geltaschen aufgetragen. Als Proteinmarker wurden 1,3 µl PageRuler unstained broad range ladder verwendet. Die Gele wurden nach Herstellerangaben bei 200 V mit maximal 50 mA pro Gel für etwa 30 min laufen gelassen. Im Anschluss wurden die Gele kurz mit voll-entsalztem (VE-) Wasser abgespült und in Fixierlösung (50 % Ethanol, 10 % Essigsäure) über Nacht unter Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte die SDS-Entfernung (10 % Ethanol und 5 % Essigsäure, 2x 5 min). Die Gele wurden 1 min in Farmers Reagenz (50 mg Na₂CO₃, 150 mg K₃Fe(CN)₆, 300 mg Na₂S₂O₃ in 100 ml Wasser) inkubiert, 3x 20 s mit Wasser gewaschen, 20 min in 0,012 M Silbernitratlösung gefärbt, erneut 3x 20 s gewaschen und anschließend entwickelt (0,28 M Na₂CO₃ mit 0,05 % frisch hinzugefügtem Formaldehyd). Sobald die gewünschte Intensität der Proteinbanden erreicht war, wurde die Entwicklungslösung entfernt und 1 % Essigsäure auf die Gele gegeben, um die Reaktion zu stoppen.

3.2.6.5 BCA-Assay zur Bestimmung der Protein-Konzentration

Zur Bestimmung von Protein-Konzentrationen wurde das Kit „ExtraSense BCA Protein Kit“ der Firma BioVision verwendet. Die Durchführung des Assays (nach Herstellerangaben) erfolgte durch Christina Linnartz. Als Proben wurden die über Entsalzungssäulen und mittels Dialyse gereinigten Fraktionen mit KK-Oligomeren in einer 1:3 Verdünnung in PBS eingesetzt.

3.2.6.6 Transmissions-Elektronenmikroskopie

20 µl Probe wurde 3 min auf dem Kupfernetz inkubiert, im Anschluss wurde die überschüssige Flüssigkeit vorsichtig und ohne das Kupfernetz zu beschädigen mit Hilfe von Whatman-Filterpapier entfernt. Das Kupfernetz wurde 3x gewaschen, indem jeweils 20 µl Wasser auf das Kupfernetz pipettiert und direkt wieder durch Whatman-Filterpapier entfernt wurden. 5 µl Uranylacetat (2 % w/v in Wasser) wurde auf das Kupfernetz gegeben und direkt wieder entfernt, weitere 5 µl wurden 1 min auf dem Kupfernetz inkubiert. Nach der Entfernung des Uranylacetats wurde das Kupfernetz vor Staub geschützt an der Luft getrocknet. Die Bedienung des

TEM und die Aufnahmen der Bilder erfolgten durch Maren Hülsemann und Antonia Klein.

3.2.7 Vorbereitung der Oberfläche nach dem sFIDA-Protokoll

3.2.7.1 Allgemeine Übersicht

Da der sFIDA-Assay im Laufe dieser Arbeit permanent weiterentwickelt und optimiert wurde, hat sich auch das Protokoll zur Vorbereitung der Oberfläche kontinuierlich verändert. Die generelle Vorgehensweise blieb jedoch die gleiche:

Zunächst wurde die Glasoberfläche gereinigt und aktiviert, sodass CM-Dextran kovalent auf der Oberfläche binden konnte. Auf dieser Dextran-Matrix wurden anti-A β -Antikörper immobilisiert und im Anschluss eventuell noch auf der Oberfläche vorhandene reaktive Gruppen inaktiviert. Während der anschließenden Inkubation der Probe auf dieser Oberfläche wurde in der Probe enthaltenes A β von den Antikörpern gebunden und dadurch auf der Oberfläche immobilisiert. Schließlich wurden zwei verschiedene, mit unterschiedlichen Fluorochromen markierte Antikörper auf die Oberfläche gegeben. Diese Fluorochrom-markierten Antikörper binden dasselbe Epitop von A β wie der Antikörper zur Immobilisierung des A β .

Im Folgenden werden die einzelnen Arbeitsschritte detailliert beschrieben. Dabei werden zwei verschiedene Protokollversionen (1 und 2) unterschieden. Die Version 1 entspricht dem Protokoll, wie es zu Beginn dieser Arbeit durchgeführt wurde, die Version 2 wurde gegen Ende dieser Arbeit standardmäßig verwendet. Tabelle 3.9 auf Seite 36 stellt eine Übersicht dar, wie die Arbeitsschritte nach den beiden Protokollversionen durchgeführt wurden. Im experimentellen Teil ist für jedes Experiment vermerkt, welche Protokollversion (und ggfs. welche Abweichungen davon) verwendet wurde.

Zunächst werden noch einige Begriffe definiert und generelle Vorgehensweisen erläutert:

Waschen: Ein Waschschrift wird definiert als Zugabe von 45 μ l der genannten Lösung, nachdem die vorher im Well vorhandene Flüssigkeit entfernt wurde.

Volumenangaben im sFIDA-Protokoll beziehen sich immer auf die Flüssigkeitsmenge, die in ein Well gegeben wird.

Pufferlösungen die in Version 2 des sFIDA-Protokolls verwendet werden, wurden bei 15.000 g für 60 min in 50 ml Zentrifugenröhrchen zentrifugiert. Nur die oberen 25 ml wurden direkt nach der Zentrifugation abgenommen und im sFIDA eingesetzt.

Blockingreagenzien und Antikörper, sowohl Immobilisierungs- als auch Detektionsantikörper, wurden vor Verwendung zentrifugiert (sofern nicht anders angegeben bei 20.000 g, 10 min) und nur der Überstand wurde im sFIDA verwendet. Ausnahme: Milchpulver als Blocking-Reagenz.

Trockenfallen der Wells muss ab dem Schritt mit 5 M Ethanolamin in DMSO (Schritt 3 in der Tabelle 3.9) unbedingt vermieden werden. Die Wells sollten ab diesem Zeitpunkt nicht länger als 2 min ohne Flüssigkeit vorliegen.

Temperatur: wenn nicht anders angegeben, wurden alle Schritte bei Raumtemperatur durchgeführt.

3.2.7.2 Reinigung der Glasplatten und Aktivierung der Glasoberfläche

Die Reinigung der Glasplatten erfolgte nach Protokollversion 1 durch das Abwischen der Glasplatten mit fussselfreien Tüchern. Diese Protokollversion wurde für Mikroglassplatten angewandt, die durch Piranha-Lösung gereinigt wurden und dadurch schon sauber für die nächste Benutzung vorlagen. Für ZAT-Platten wurde ein aufwändigeres Reinigungsverfahren etabliert, da diese Platten bei der Herstellung eventuell Verunreinigungen ausgesetzt sein können. Nach Protokollversion 2 wurden die Platten zunächst mit Ethanol (absolut) und Wasser gründlich abgespült. Anschließend wurden die Wells 3x mit Ethanol, 3x mit Wasser, 1x mit Ethanol und 1x mit Wasser gewaschen.

Nach der Reinigung erfolgte die Aktivierung der Glasoberfläche. Nach Protokollversion 1 wurde die Platte einmal im Plasmacleaner (Wasserplasma, 0,3 mbar, 95 Watt, 40 kHz, 6 min) behandelt, direkt im Anschluss wurden 45 µl 5 M NaOH 3 h in den Wells inkubiert. Nach 5 Waschschritten mit Wasser wurden 40 µl 5 M Ethanolamin in DMSO in die Wells gegeben, nach der Reaktion über Nacht wurden die Wells weitere 5x mit Wasser gewaschen.

Nach Protokollversion 2 erfolgte zuerst die Hydroxylierung der Glasoberfläche mit 45 µl 5 M NaOH über 2-3 h. Nach 5 Waschschritten mit Wasser wurde die Platte im Luftstrom unter der Sterilbank getrocknet und 2x mit dem Plasmacleaner behandelt (Einstellungen wie oben). Direkt im Anschluss wurden 40 µl 5 M Ethanolamin in DMSO in die Wells gegeben. Nach der Reaktion über Nacht wurden die Wells 10x mit Wasser gewaschen.

3.2.7.3 Immobilisierung des CM-Dextran und der Immobilisierungsantikörper

CM-Dextran wurde gelöst (Protokollversion 1: 20 mg/ml in Wasser; Protokollversion 2: 10 mg/ml in PBS), mit einem Sterilfilter (0,2 µm) filtriert und 10 min bei 20.000 g zentrifugiert. Weitergearbeitet wurde mit dem Überstand. Es wurden je 1 M EDC und NHS Lösungen (Protokollversion 1: in Wasser; Protokollversion 2: in PBS) hergestellt. Aus diesen Lösungen wurde nach beiden Protokollversionen eine Lösung mit 200 mM EDC und 50 mM NHS im CM-Dextran hergestellt. Diese Lösung wurde für 2 h in die Wells gegeben (Protokollversion 1: 20 µl, 4°C; Protokollversion 2: Bildung des NHS-Esters für 10 min, dann 45 µl pro Well, 1 h). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Wells gewaschen (Protokollversion 1: 3x mit Wasser; Protokollversion 2: 5x mit PBS).

In beiden Protokollversionen wurde der als Immobilisierungsantikörper verwendete Nab228 in der benötigten Konzentration in PBS zentrifugiert (20.000 g, 10 min); es wurde mit dem Überstand weitergearbeitet.

Für Protokollversion 1 wurde zunächst das Dextran mit 10 µl einer Lösung mit 300 mM EDC und 75 mM NHS in PBS aktiviert, nach 10 min wurden 5 µl mit 0,09 µg/ml Nab228 dazugegeben und 2 h bei 4°C inkubiert. Die Endkonzentrationen betragen also 200 mM EDC, 50 mM NHS und 0,03 µg/ml Nab228. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Wells 3x mit PBS gewaschen, im Anschluss wurden zur Inaktivierung der Oberfläche 45 µl 1 M Ethanolamin in DMSO (pH 7,4) für 5 min in die Wells gegeben und erneut 3x mit PBS gewaschen.

Nach Protokollversion 2 wurde das Dextran zunächst für 10 min mit 15 µl 200 mM EDC und 50 mM NHS in PBS aktiviert, danach wurde 3x mit PBS gewaschen und anschließend wurden 15 µl 0,01 mg/ml Nab228 in PBS 30 min in den Wells inkubiert. Danach wurde die Antikörper-Lösung aus den Wells entfernt, die

Oberfläche inaktiviert (10 min 45 µl 0,1 M Ethanolamin-Hydrochlorid in PBS) und anschließend 5x mit PBS gewaschen.

3.2.7.4 Auftragung von Proben und Detektionsantikörpern

Pro Well wurden meist 15 µl einer Probe eingesetzt, abweichende Volumina sind an entsprechender Stelle im experimentellen Teil gekennzeichnet. Jede Probe wurde doppelt oder dreifach bestimmt, d.h. jede Probe wurde in 2 oder 3 Wells eingesetzt. Die Inkubation der Proben erfolgte für 1 h, im Anschluss wurde 3x mit TBS gewaschen.

Die Detektionsantikörper wurden in Konzentrationen von 1,25 µg/ml in PBS eingesetzt und vor der Verwendung zentrifugiert (Protokollversion 1: 20.000 g, 10 min, 4°C; Protokollversion 2: 100.000 g, 1 h bei 4°C in der Ultrazentrifuge), es wurde nur mit dem Überstand weitergearbeitet. 15 µl des Überstands wurden 1 h inkubiert (Protokollversion 1: bei 4°C; Protokollversion 2: bei Raumtemperatur). Nach Protokollversion 1 wurde im Anschluss 6x mit TBST und 3x mit Wasser gewaschen (optional wurde die Platte nach drei der Waschschritten mit TBST bei 4°C in TBST gelagert, die restlichen Waschschrritte erfolgten dann am nächsten Tag). Nach Protokollversion 2 wurde 1x mit TBST und 1x mit TBS gewaschen. Optional erfolgte die Lagerung über Nacht in TBS. Nach beiden Protokollversionen wurden die Wells vor der Durchführung der Messung am TIRF-Mikroskop mit Wasser gefüllt.

Tabelle 3.9: Übersicht des Protokolls zu Vorbereitung der Oberfläche für das sFIDA-Assay. (ü. N. = über Nacht)

Funktion	Schritt	Protokollversion 1	Protokollversion 2
Reinigung der Glasoberfläche	1	Abwischen der Platte mit Ethanol	Abspülen der Platte mit Ethanol (abs.) und Wasser, Waschen der Wells: 3x Ethanol, 3x Wasser, 1x Ethanol, 1x Wasser
Aktivierung d. Glasoberfläche durch Entstehung von Hydroxylgruppen	2	1x Plasmacleaner 45 µl 5 M NaOH, 3 h; 5x waschen mit Wasser	45 µl 5 M NaOH, 2-3 h; 5x waschen mit Wasser 2x Plasmacleaner
Aktivierung der Glasoberfläche mit Aminogruppen	3	40 µl 5 M Ethanolamin in DMSO ü. N.; 5x waschen mit Wasser	40 µl 5 M Ethanolamin in DMSO ü. N.; 10x waschen mit Wasser
Immobilisierung von CM-Dextran	4	45 µl 200 mM EDC/50 mM NHS in 20 mg/ml CM-Dextran (2 h, alles in Wasser); 3x waschen mit Wasser	200 mM EDC/50 mM NHS in 10 mg/ml CM-Dextran 10 min vorinkubieren, dann 45 µl für 1 h; 5x waschen mit PBS
Immobilisierung von Antikörpern	5a 5b	10 µl EDC/NHS (300 nM/75 mM) in PBS, Inkubation 10 min; dann Zugabe von 5 µl Nab228 (0,09 mg/ml), 2 h, 4°C; 3x waschen mit PBS	15 µl 200 mM EDC/50 mM NHS in PBS, 10 min; 3x waschen mit PBS 15 µl 0,01 mg/ml Nab228 in PBS, 30 min
Inaktivierung von reaktiven Gruppen auf der Oberfläche	6	45 µl 1 M Ethanolamin in DMSO (pH 7,4), 5 min; 3x waschen mit PBS	45 µl 0,1 M Ethanolamin-Hydrochlorid in PBS, 10 min; 3x waschen mit TBST, 3x mit TBS
Inkubation der Probe, Bindung von Aβ an die Antikörper	7	15 µl Probe, 1 h; 3x waschen mit TBS	15 µl Probe, 1 h; 3x waschen mit TBS
Auftragen der Detektionsantikörper	8	15 µl Fluorochrom-markierte Detektions- antikörper in PBS (6E10: 1,25 µg/ml; IC16: 2 µg/ml), 1 h, 4°C; 3x waschen mit TBST, optional: Lagerung ü. N. in TBST	15 µl der Fluorochrom-markierten Detektions- antikörper, jeweils 1,25 µg/ml in PBS; 1x waschen mit TBST, 1x TBS optional: Lagerung ü. N. in TBS (4°C)
Vorbereitung zur TIRF-Mikroskopie	9	3x waschen mit TBST, 3x mit Wasser; am Ende 45 µl Wasser	TBS entfernen, durch 45 µl Wasser ersetzen

3.2.8 Datenerfassung und -auswertung

3.2.8.1 TIRF-Mikroskopie

Die Erfassung der Daten erfolgte am TIRF-Mikroskop. Interne Totalreflexionsfluoreszenz- (TIRF-) Mikroskopie ist eine spezielle Methode der Lichtmikroskopie, die die Abbildung einer sehr dünnen Schicht der Probe nahe dem Objektträger ermöglicht. Das Prinzip der internen Totalreflexion ist in Abbildung 3.2 dargestellt.

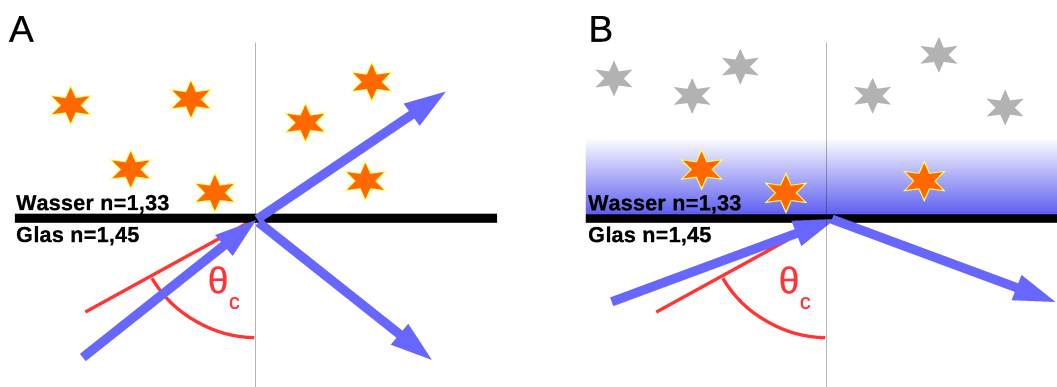


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der internen Totalreflexion in der TIRF-Mikroskopie. A: Der Winkel des einfallenden Lichts an der Grenze zwischen Glas und Wasser ist geringer als der kritische Winkel (θ_c ; in rot). Deshalb wird ein Teil des Lichts in das Wasser abgelenkt und regt die Fluorochrome (als Sterne dargestellt; in orange: angeregt, in grau: nicht angeregt) in dem gesamten Volumen an. B: Der Winkel des einfallenden Lichts ist größer als der kritische Winkel, weshalb das Licht totalreflektiert wird und ein evaneszentes Feld entsteht, welches maximal etwa 200 nm in das Wasser über der Grenzschicht von Glas und Wasser hineinreicht und nur in diesem Volumen die Fluorochrome anregt. Nach: Reck-Peterson et al. (2010).

Interne Totalreflexion kommt zustande, wenn Licht in einem flachen Winkel auf eine Grenzschicht von einem Medium mit einem hohen Brechungsindex in ein Medium mit niedrigem Brechungsindex einfällt. In der TIRF-Mikroskopie handelt es sich bei dem Medium mit hohem Brechungsindex meist um das Glas des Objektträgers, bei dem Medium mit geringem Brechungsindex um eine wässrige Lösung, in der die Probe vorliegt. Der Winkel, in dem das Licht auf diese Grenzschicht zwischen Glas und Wasser fällt, muss größer als der kritische Winkel sein. Dann wird das Licht an der Grenzschicht der beiden Medien totalreflektiert und es entsteht ein dünnes Lichtfeld, welches in die wässrige Lösung eindringt. Dieses Lichtfeld wird als evaneszentes Feld bezeichnet. Die Intensität des evaneszenten Felds nimmt exponentiell mit der Entfernung von der Grenzschicht der beiden Medien ab und

behält die Frequenz des einfallenden Lichts bei. Für sichtbares Licht beträgt die Eindringtiefe des evaneszenten Felds maximal etwa 200 nm, nur in diesem Bereich können Fluorochrome also angeregt werden. Weil Fluorochrome in anderen Bereichen der Probe nicht angeregt werden, zeichnet sich diese Methode durch sehr geringe Hintergrundsignale aus (Trache und Meininger, 2008).

3.2.8.2 Datenerfassung

Mittels TIRF-Mikroskopie wurden in jedem Well an mindestens 25 Positionen Bilder aufgenommen. Wie in Abschnitt 1.2 beschrieben, wurden zur Detektion der A β -Oligomere zwei verschiedene Detektionsantikörper eingesetzt. Von diesen war jeweils einer mit den Fluorochromen Alexa Fluor488 oder Atto488 und der andere mit Alexa Fluor647, Alexa Fluor633 oder Atto647N markiert. Die Fluoreszenz-Signale wurden deshalb in zwei Kanälen detektiert, wie in Tabelle 3.10 dargestellt.

Tabelle 3.10: In dieser Arbeit eingesetzte Fluorochrome und deren Anregungs- und Detektionswellenlängen am verwendeten TIRF-Mikroskop von Leica. BP: Bandpassfilter

	Fluorochrom	Absorptions- maximum	Laser [nm]	Emmissions- maximum	Emmissions- filter [nm]
Kanal 0	Alexa Fluor647	650 nm		665 nm	
	Alexa Fluor633	621 nm	633	639 nm	BP 705/72
	Atto647N	644 nm		669 nm	
Kanal 1	Alexa Fluor488	490 nm	488	523 nm	BP 525/36
	Atto488	501 nm			

Jedes Bild ist am verwendeten TIRF-Mikroskop mit einem Objektiv mit 100-facher Vergrößerung etwa 116x116 μm groß, die Fläche von 25 Positionen entspricht bei einer Wellfläche von 9,6 mm^2 also etwa 3,5 % der gesamten Wellfläche. Die Einstellungen von Laserintensität, Belichtungszeit und Gain am Mikroskop wurden für jedes Experiment so angepasst, dass der gesamte Helligkeitsbereich genutzt wurde und die Helligkeit der Bilder in beiden Kanälen möglichst ähnlich war. Die Bilder wurden in beiden Kanälen jeweils mit einer Graustufenauflösung von 14 Bit aufgenommen, d.h. die Intensitäten der einzelnen Pixel konnten zwischen 0 (schwarz) und 16383 (hellste messbare Intensität) variieren.

3.2.8.3 Datenauswertung

In den beschriebenen sFIDA-Experimenten entstehen große Datenmengen in Form von am TIRF-Mikroskop aufgenommenen Bildern, sodass die Auswertung der Daten automatisch erfolgen muss. Zu Beginn der Arbeit erfolgte die Auswertung mittels selbstgeschriebener ImageJ- und VBA-Makros in Excel, später wurde eine professionelle und deutlich benutzerfreundlichere Analyse-Software entwickelt („sFIDa“, entwickelt durch Fabian Dreßen, Yvonne Herrmann und Johannes Willbold). Im Folgenden wird das Prinzip der Auswertung erklärt, wie es sowohl von den oben genannten Makros als auch in sFIDa umgesetzt wird.

Im ersten Schritt der Auswertung werden zunächst alle Bilder gesichtet, um solche Bilder von der Analyse auszuschließen, die Artefakte oder Inhomogenitäten aufweisen. Diese können zum Beispiel durch mechanische Beschädigung der Oberfläche mit der Pipettenspitze entstehen.

Der nächste und wichtigste Schritt der Auswertung besteht darin, zwischen Hintergrundsignal und Nutzsignal zu unterscheiden. Hintergrundsignal entsteht einerseits durch das Dunkelrauschen des Detektors selbst und durch Streulicht, das den Detektor erreicht. Dazu kommt Hintergrundsignal, das durch Autofluoreszenz von eingesetzten Materialien und Verunreinigungen oder durch unspezifisch auf der Oberfläche bindende Moleküle zustande kommt. Nutzsignal entsteht durch mehrere Fluorochrome, die auf engem Raum über die Detektionsantikörper an ein A β -Oligomer gebunden sind.

Um für jeden Kanal den Schwellenwert festzulegen, der Hintergrundsignal von Nutzsignal trennt, wurde eine Vorgehensweise entwickelt, bei der die Histogramme der Pixelintensitäten hinzugezogen werden. Wenn man Histogramme der Bilder von Messungen mit verschiedenen Konzentrationen von A β -Oligomeren und einer Negativkontrolle vergleicht, kann man anhand der Histogramme abschätzen, bis zu welcher Signalintensität nur Hintergrundsignal gemessen wird.

Noch deutlicher wird der Zusammenhang zwischen einem gegebenem Schwellenwert und der Anzahl von Pixeln, deren Intensität über diesem Schwellenwert liegen, wenn man statt des üblichen Histogramms die Anzahl der Pixel mit einer Intensität höher als der jeweiligen (auf der x-Achse aufgetragenen) Pixelintensität darstellt (im Folgenden als „integriertes“ Histogramm bezeichnet). Abbildung 3.3 zeigt beide Histogrammtypen:

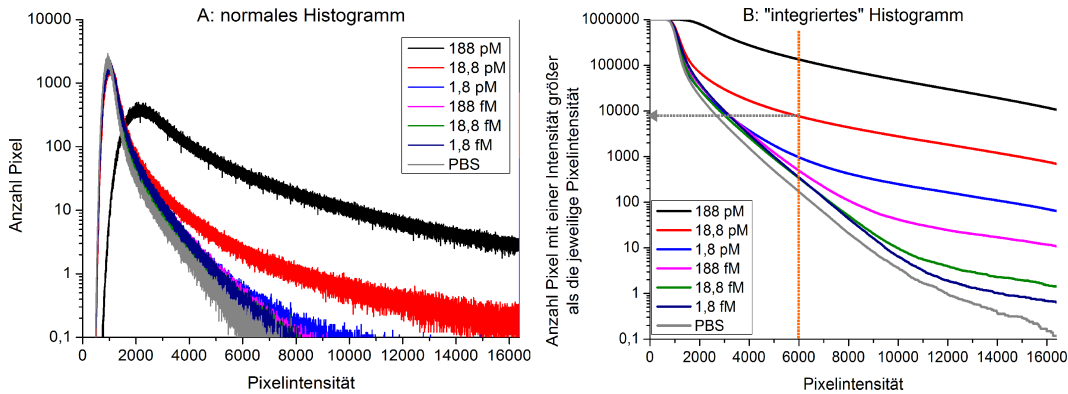


Abbildung 3.3: Normale und „integrierte“ Histogramme von sFIDA-Messungen. Dargestellt sind jeweils die Histogramme von den Bildern aus Wells mit verschiedenen Konzentrationen stabilisierter Oligomere (Crossbeta). A: Anzahl der Pixel mit der entsprechenden Intensität gegen die Pixelintensität; B: Anzahl der Pixel mit einer höheren Intensität als die auf der x-Achse aufgetragene Pixelintensität. Es handelt sich jeweils um die durchschnittliche Anzahl von Pixeln, berechnet über drei Wells mit je 25 Bildern.

- Auf der linken Seite (A) sind die Histogramme von Messungen mit einer Negativkontrolle (PBS) und Konzentrationen von 1,8 fM bis 188 pM stabilisierter Oligomere (von Crossbeta) dargestellt. Je höher die Konzentration der eingesetzten Oligomere, desto heller ist das Bild und desto mehr Pixel zeigen hohe Pixelintensitäten.
- Auf der rechten Seite (B) sieht man die Daten derselben Bilder, mit dem Unterschied, dass hier jeweils die Anzahl von Pixeln angegeben ist, deren Intensität höher als die (auf der x-Achse aufgetragene) Pixelintensität liegt. Dieser Funktionswert ergibt sich aus dem in Abb. 3.3 A dargestellten Histogramm, indem man für eine gegebene Intensität die Summe aller Histogrammwerte größerer Intensitäten berechnet. Es kann also direkt abgelesen werden, wie viele Pixel oberhalb eines beliebigen Schwellenwertes liegen. Anhand dieser Darstellung kann sehr einfach der Schwellenwert ausgewählt werden, der eine Unterscheidung von möglichst geringen Probenkonzentrationen gegenüber der Negativkontrolle erlaubt. Zur Veranschaulichung symbolisiert in Abbildung 3.3 B die orange gestrichelte Linie einen Schwellenwert von 6000. Möchte man nun beispielsweise die Anzahl von Pixeln mit einer Intensität von über 6000 für die Bilder der Wells mit einer Oligomerkonzentration von 18,8 pM (rote Linie) ermitteln, dann muss lediglich am Schnittpunkt der orangenen Linie mit der roten Linie der entsprechende Wert auf der y-Achse abge-

lesen werden (verdeutlicht durch den Pfeil in grau). In dem hier gezeigten Beispiel weisen also etwa 8000 Pixel eine Signalintensität von über 6000 auf.

Nach dem Festlegen der jeweiligen Schwellenwerte für die beiden Kanäle erfolgt im dritten Schritt der Auswertung die Analyse durch Kollokalisierung. Die Tatsache, dass bei einem Schwellenwert von 6000 in dem in Abb. 3.3 B dargestellten einzelnen Kanal keine Unterscheidung der beiden geringsten Konzentrationen (1,8 fM in blau und 18,8 fM in grün) festgestellt werden kann, schließt nicht aus, dass eine solche Unterscheidung in der Kollokalisierung möglich ist.

Bei der Kollokalisierung werden alle Pixel gezählt, die in beiden Kanälen an gleicher Position eine Intensität über dem Schwellenwert des jeweiligen Kanals aufweisen. Aus diesen Pixelanzahlen für jedes Bild wird im Allgemeinen ein Mittelwert über alle Bilder aus einem Well berechnet, oder sogar aus allen Bildern der Doppel- oder Dreifachbestimmungen derselben Probe. Im Folgenden wird diese durchschnittliche Anzahl der Pixel pro Bild, die in beiden Kanälen eine Intensität oberhalb der festgelegten Schwellenwerte aufweisen, als sFIDA readout bezeichnet. Da jedes am verwendeten TIRF-Mikroskop gemessene Bild 1000 x 1000 Pixel groß ist, kann der maximale sFIDA readout 1 Million betragen.

3.2.8.4 Statistische Analysen

Statistische Analysen wurden mit der Software OriginPro durchgeführt.

Zur Untersuchung, ob sich die sFIDA readouts verschiedener Personengruppen unterschieden, wurde der Kruskal-Wallis-ANOVA, ein Rangsummentest, angewandt.

Zur Untersuchung, ob die sFIDA readouts mit anderen Parametern korrelieren, wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman berechnet.

4. Experimenteller Teil

4.1 Detektion von A β -Oligomeren mittels Analyse des FRET-Signals im sFIDA

4.1.1 Hintergrund

In diesem Teil der Arbeit wurde untersucht, ob anstelle der Auswertung mittels Kolllokalisierung der Signale zweier verschiedener Fluorochrom-markierter Antikörper auch die Auswertung eines FRET-Signals im sFIDA zur Detektion von A β -Oligomeren verwendet werden kann.

FRET steht für Förster-Resonanzenergietransfer (manchmal auch Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer). Für die Entstehung eines FRET-Signals sind zwei Fluorochrome erforderlich: Eines davon wird als Donor bezeichnet, das andere als Akzeptor. Bei der Auswahl der Fluorochrome ist wichtig, dass das Emissionsspektrum des Donor-Fluorochroms und das Absorptionsspektrum des Akzeptor-Fluorochroms überlappen und dass der räumliche Abstand der beiden Fluorochrome weniger als 10 nm beträgt. Wird nun der Donor-Fluorochrom in den angeregten Zustand versetzt, kann es seine Energie strahlungsfrei auf das Akzeptor-Fluorochrom übertragen. Dieses emittiert dann Licht seines charakteristischen Emissionsspektrums (Arai und Nagai, 2013).

Die Planung und Durchführung dieser Experimente erfolgte gemeinsam mit Marlen Hülsemann.

4.1.2 Vergleich von sFIDA-Ergebnissen: Analyse mittels Kolo- kalisierung gegenüber dem FRET-Signal

Es wurden sFIDA-Ergebnisse verglichen, die durch die herkömmliche sFIDA-Analyse mittels Kolo-kalisation der Signale zweier Fluorochrom-markierter Detektionsantikörper bzw. durch die Analyse des resultierenden FRET-Signals der beiden Fluorochrome ermittelt wurden.

Dafür wurde die Oberfläche nach der Protokollversion 1 hergestellt, als Detektionsantikörper wurde die übliche Kombination aus Antikörpern und Fluorochromen (6E10-Alexa Fluor488 und IC16-Alexa Fluor647) mit einer Konzentration von je 1,25 $\mu\text{g/ml}$ verwendet. Als Proben wurden 2 μM A β -Aggregate sowie 2 nM und 20 nM SEC-Oligomere verwendet, PBS diente als Negativkontrolle.

Mit jeder der genannten Proben wurden zudem weitere Kontrollen durchgeführt, in denen nur jeweils einer der beiden Detektionsantikörper im sFIDA eingesetzt wurde.

Zusätzlich zu den beiden Kanälen, die der Detektion von Alexa Fluor488 und Alexa Fluor647 dienen, wurde ein dritter Kanal verwendet, in dem Alexa Fluor488 bei 488 nm angeregt wird und das Signal von Alexa Fluor647 mit dem Bandpass-Filter um 705 nm ausgelesen wird. In diesem Kanal wird also das FRET-Signal detektiert. Die Analyse der in diesem Kanal aufgenommenen Bilder erfolgte wie bei der Kolo-kalisation durch Festlegung eines Schwellenwertes: Nur Pixel mit Intensitäten oberhalb dieses Schwellenwertes tragen zum sFIDA readout bei.

Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abbildung 4.1 dargestellt. Auf der linken Seite sind die sFIDA readouts nach Analyse durch Kolo-kalisation gezeigt, auf der rechten Seite die Ergebnisse nach Analyse des FRET-Signals.

Nach Doppelfärbung und der herkömmlichen Analyse durch Kolo-kalisation zeigte sich für alle Proben ein gegenüber der Negativkontrolle (PBS) deutlich erhöhter readout. Der readout für 20 nM Oligomere liegt etwa drei Größenordnungen über der Negativkontrolle, der für 2 nM etwa eine Größenordnung; die eingesetzten Konzentrationen korrelieren also mit dem readout. Die readouts, die nach den Einzelfärbungen ermittelt wurden, sind sehr gering: Für alle Proben ist der sFIDA readout nach Doppelfärbung um mindestens einen Faktor 25 höher als nach den Einzelfärbungen.

Auch die Auswertung der FRET-Signale zeigt für alle Proben einen höheren

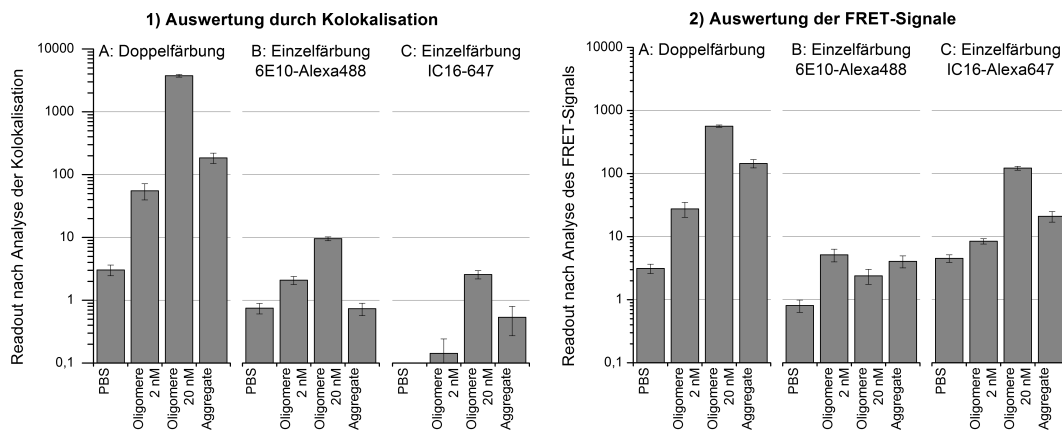


Abbildung 4.1: sFIDA readouts durch Kolokalisation und bei Auswertung des FRET-Signals im Vergleich. 1) Der sFIDA wurde auf herkömmliche Art, durch Kolokalisation der Signale der beiden Detektionsantikörper 6E10-AF488 und IC16-AF647, ausgewertet (Schwellenwerte: 3000/7000). 2) Es wurde das resultierende FRET-Signal der beiden Detektionsantikörper ausgewertet, indem die Anregung bei 488 nm erfolgte und das Signal durch den Bandpass-Filter um 705 nm ausgelesen wurde (Schwellenwert: 5000). A: Readouts des sFIDA bei Verwendung beider Detektionsantikörper. B und C: Kontrollen, in denen jeweils nur einer der beiden Detektionsantikörper verwendet wurde (B: 6E10-AF488, C: IC16-AF647). Gezeigt werden jeweils die Mittelwerte und Standardfehler über alle in die Analyse einbezogenen Bilder aus zwei identisch behandelten Wells nach Messungen mit je 25 Bildern pro Well.

readout als für die Negativkontrolle sowie eine Korrelation der eingesetzten Probenkonzentration mit dem readout. Der readout für 20 nM Oligomere liegt hier etwa zwei Größenordnungen über dem readout der Negativkontrolle, der für 2 nM etwa eine Größenordnung über der Negativkontrolle. Allerdings ist hier das Verhältnis der readouts nach Doppelfärbung zu den readouts nach Einzelfärbung deutlich kleiner als bei der Auswertung durch Kolokalisation. Bei Analyse der FRET-Signale beträgt der readout nach Einzelfärbung mit IC16-Alexa Fluor 647 etwa 25 % des readouts nach Doppelfärbung – das bedeutet, dass auch IC16-Alexa Fluor 647, das nicht in enger räumlicher Nähe zu dem zweiten eingesetzten Antikörper liegt, einen nicht unbedeutenden Anteil am Gesamt-readout hat und daher im Falle einer unspezifischen Bindung des IC16-Alexa Fluor 647 auf die sFIDA-Oberfläche die Spezifität der FRET-Analyse verringert.

Bei einer Analyse der Kolokalisation würde diese unspezifische Bindung kaum zum Gesamt-readout beitragen, solange der 6E10-Alexa Fluor 488 nicht gleichzeitig unspezifisch in räumlicher Nähe bindet, da die Einzelfärbungen hier nur zu sehr geringen readouts in der Kolokalisations-Analyse führen.

Die Analyse des FRET-Signals im sFIDA ist also möglich und zeigt ebenso wie die Analyse durch Kollokalisierung eine positive Korrelation der eingesetzten Probenkonzentrationen mit dem sFIDA readout. Unter den hier gewählten Bedingungen wurde allerdings eine geringere Sensitivität und Spezifität für die Analyse des FRET-Signals gegenüber der Analyse durch Kollokalisierung beobachtet. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass es sich bei diesem Versuch nur um eine Machbarkeitsstudie gehandelt hat und keine Optimierung des Assays in Bezug auf die Analyse des FRET-Signals durchgeführt wurde.

4.1.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

In diesem Teil des Projektes wurde untersucht, ob im sFIDA eine Auswertung des FRET-Signals anstelle der herkömmlichen Analyse durch Kollokalisierung der beiden Fluorochrom-markierten Detektionsantikörper möglich ist.

In einem sFIDA, in dem beide Detektionsantikörper (6E10-Alexa Fluor 488 und IC16-Alexa Fluor 647) gleichzeitig sowie zur Kontrolle auch einzeln eingesetzt wurden, zeigte sich, dass die Analyse des sFIDA mit Hilfe des FRET-Signals möglich ist. Unter den hier gewählten Bedingungen, die allerdings nicht in Hinblick auf die Analyse durch das FRET-Signal optimiert wurden, lieferte das FRET-Signal jedoch gegenüber der Auswertung durch Kollokalisierung eine verringerte Sensitivität und Spezifität der sFIDA readouts.

4.2 Optimierung des sFIDA-Protokolls

4.2.1 Zielsetzung

Im sFIDA sollen sehr geringe Konzentrationen von A β -Oligomeren in Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden. Dafür ist eine sehr sensitive Detektion der Oligomere bei gleichzeitig geringem Hintergrundsignal erforderlich.

Die folgenden Untersuchungen hatten zum Ziel, einzelne Schritte des sFIDA-Protokolls zu überprüfen und wenn möglich zu optimieren. Dafür wurden jeweils einzelne Schritte des Protokolls leicht verändert oder neue Schritte hinzugefügt. Diese veränderte Version des Protokolls wurde gegen die vorher übliche Version getestet.

Als Proben für diese Experimente dienten stabilisierte A β -Oligomere, die die Firma Crossbeta unserer Arbeitsgruppe im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt hat. Diese Oligomere werden im Folgenden als CB-Oligomere bezeichnet. Nach Herstellerangaben besteht ein CB-Oligomer aus etwa 200 A β _{1–42}-Peptiden, ebenso war die Konzentration der Oligomere angegeben.

Die CB-Oligomere wurden jeweils in verschiedenen Konzentrationen als Probe im sFIDA eingesetzt. Für die Beurteilung der Ergebnisse hinsichtlich einer Optimierung des Protokolls galten die folgenden Kriterien:

- Die Oberfläche sollte auf den Bildern homogen aussehen und keine Artefakte zeigen. Regionale Unterschiede in der Helligkeit der Bilder innerhalb eines Wells deuten darauf hin, dass die Oberfläche des sFIDAs nicht homogen ist. Artefakte kommen durch mechanische Beschädigungen der Oberfläche (zum Beispiel durch Pipettenspitzen), durch Verunreinigungen der verwendeten Reagenzien oder durch eine unsaubere Verklebung der Glasplatten zustande.
- Auch die Mehrfachbestimmung derselben Probe sollte in den Bildern ähnliche Pixelintensitäten zeigen sowie zu ähnlichen readouts führen. Nur dann kann der Assay als reproduzierbar gelten.
- Der sFIDA readout sollte über einen möglichst weiten Bereich mit der eingesetzten Konzentration der stabilen Oligomere korrelieren. Je geringer die

niedrigste Probenkonzentration, deren readout über dem readout der Negativkontrolle liegt, desto niedriger ist auch die Nachweisgrenze.

4.2.2 Inkubationszeit von Natriumhydroxid

Zunächst wurde untersucht, ob die Inkubation des Natriumhydroxid (NaOH) hinsichtlich der Inkubationszeit optimiert werden kann.

Nach der gründlichen Reinigung der Multiwell-Platten erfolgt die Behandlung der Glasoberfläche mit 5 M NaOH. NaOH dient ebenfalls der Reinigung der Glasoberfläche, bewirkt aber auch die Abtragung der obersten Glasschicht und die Bildung von Silanolverbindungen an der Oberfläche durch hydrolytische Spaltung der Siloxanbindungen. Im nächsten Schritt des sFIDA-Protokolls reagiert diese Silanolverbindung mit dem zugegebenen Ethanolamin. Dabei entsteht eine kovalente Bindung zwischen dem Silanol und dem Kohlenstoff der Hydroxylgruppe unter Freisetzung von Wasser.

Im ursprünglichen Protokoll war die Inkubationszeit von NaOH mit 3 h angegeben. Um festzustellen, ob diese Inkubationszeit verkürzt werden kann, wurde der sFIDA mit NaOH-Inkubationszeiten zwischen 15 min und 3 h durchgeführt. Als Proben wurden 240 fM, 2,4 pM und 24 pM CB-Oligomere eingesetzt, als Negativkontrolle wurde PBS anstelle einer Probe verwendet.

Abbildung 4.2 zeigt die Ergebnisse dieses Versuches. Unabhängig von den Inkubationszeiten des NaOH nimmt der sFIDA readout mit steigender Konzentration der eingesetzten CB-Oligomere zu, mit Ausnahme der readouts von 2,4 pM nach 30-minütiger NaOH-Inkubation. Die Differenz zwischen den readouts der höchsten Konzentration und der Negativkontrolle (PBS) ist jedoch für die kürzeren NaOH-Inkubationszeiten geringer als bei einer zwei- oder dreistündigen Inkubation des NaOH. Längere Inkubationszeiten führen also zu einer höheren Sensitivität des Assays, gleichzeitig zeigen die sFIDA readouts bei dreistündiger NaOH-Inkubation die beste Korrelation mit der eingesetzten Konzentration der Oligomere.

Eine geringe Inkubationszeit des NaOH führt vermutlich dazu, dass weniger Silanol-Gruppen an der Glasoberfläche entstehen. Dies hätte zur Folge, dass weniger funktionelle Gruppen für die Oberflächenbeschichtung zur Verfügung stehen und deshalb weniger Dextran und Immobilisierungs-Antikörper an die Oberfläche gebunden werden können. Dementsprechend kann auch nur eine geringere Anzahl

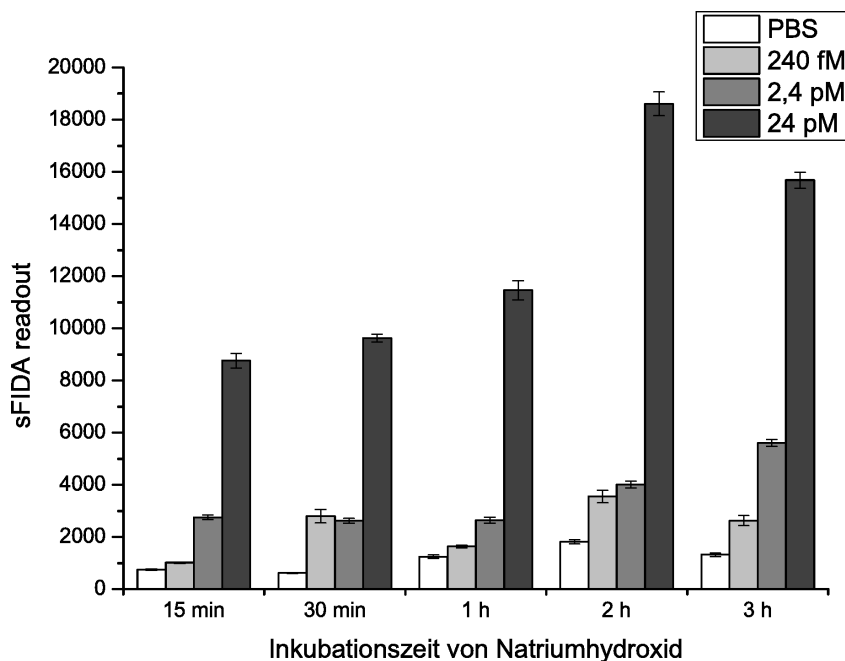


Abbildung 4.2: sFIDA readouts nach Variation der Inkubationszeiten von Natriumhydroxid. Dargestellt sind die sFIDA readouts der Negativkontrolle (PBS; in weiß), von 240 fM (hellgrau), 2,4 pM (grau) und 24 pM (dunkelgrau) CB-Oligomeren in PBS, je nach Inkubationszeit des 5 M NaOH zur Aktivierung der Glasoberfläche. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte und Standardfehler über alle in die Analyse einbezogenen Bilder aus zwei identisch behandelten Wells mit je 25 Bildern. Protokollversion 1, Mikroglas-Platte, verwendete Detektionsantikörper: 6E10-AF488 und IC16-AF647, Schwellenwerte (Kanal 0/Kanal 1): 5000/5000.

an β -Oligomeren auf der Oberfläche binden, was zu geringeren readouts insbesondere bei höheren Probenkonzentrationen führt. Allerdings nehmen auch die readouts der geringeren Probenkonzentrationen und der Negativkontrolle bei längeren NaOH-Inkubationszeiten zu. Aus einem nicht bekannten Grund scheint also bei längerer Inkubation des NaOH auch unspezifisches Signal zuzunehmen.

Dennoch bleibt als Fazit, dass die Sensitivität des sFIDA bei Inkubationszeiten von 2-3 h am höchsten ist. Diese Inkubationszeit sollte also eingehalten werden, um die Oberfläche vollständig zu behandeln und möglichst hohe Probenkonzentrationen auf der Oberfläche binden zu können.

4.2.3 Untersuchung verschiedener Blocking-Reagenzien

Es wurde ein sFIDA-Experiment durchgeführt, in dem die Detektion von CB-Oligomeren derselben Konzentrationen in Liquor von Kontroll-Spendern und in PBS

verglichen wurde. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.3 dargestellt.

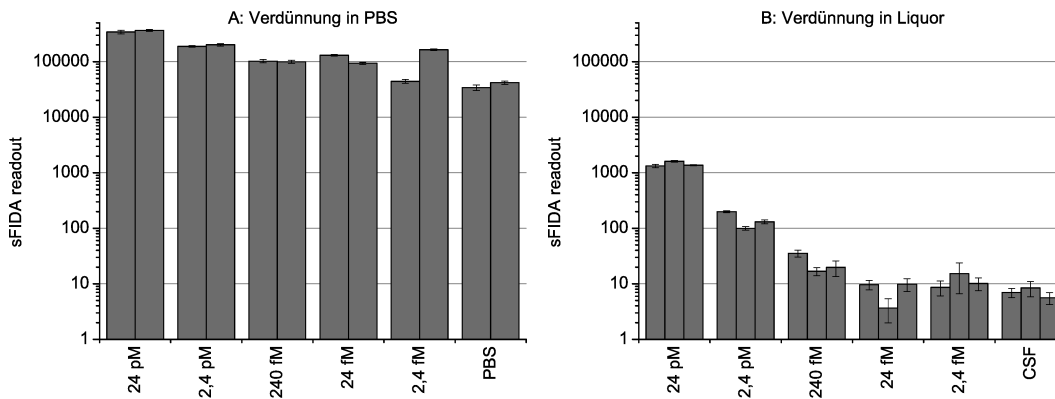


Abbildung 4.3: sFIDA readouts nach Verdünnung der CB-Oligomere in PBS und Liquor. A: Verdünnung der Oligomere in PBS; B: Verdünnung der Oligomere in Liquor (pooled, von gesunden Kontrollspendern). Gezeigt werden jeweils die Mittelwerte und Standardfehler über alle in die Analyse einbezogenen Bilder der Doppel- (PBS) bzw. Dreifachbestimmung (Liquor) nach Messungen mit je 25 Bildern pro Well. Protokollversion 1, ZAT-Platte, verwendete Detektionsantikörper: 6E10-AF488 und IC16-AF647. Schwellenwerte (Kanal 0/Kanal 1) für die Verdünnung in PBS: 3328/1216; für die Verdünnung in Liquor: 4480/4480.

Der linke Teil der Abbildung (A) zeigt die sFIDA readouts nach Verdünnung der CB-Oligomere in PBS. Abgesehen von einigen Ausreißern nehmen die sFIDA readouts für geringere Probenkonzentrationen ab, es handelt sich jedoch nicht um eine lineare Korrelation der Probenkonzentration mit dem readout. Bei 10-facher Abnahme der Konzentration verringert sich der sFIDA readout jeweils nur um etwas weniger als die Hälfte. Bei Verdünnung der Oligomere in Liquor (B; rechter Teil der Abbildung) dagegen ist im Bereich von 24 pM bis 240 fM eine nahezu lineare Korrelation des sFIDA readouts mit der eingesetzten Probenkonzentration erkennbar. Die sFIDA readouts der Negativkontrolle (reines CSF) sind hier jedoch nicht von den readouts der 24 fM und 2,4 fM CB-Oligomere zu unterscheiden. Während sich die sFIDA readouts der verschiedenen Oligomer-Konzentrationen nach Verdünnung in PBS kaum voneinander abgrenzen, führen die in Liquor verdünnten Oligomere zwar insgesamt zu geringeren readouts, die readouts der verschiedenen Konzentrationen sind jedoch deutlicher voneinander abgegrenzt.

Eine mögliche Erklärung für diese Ergebnisse liegt in der Zusammensetzung von Liquor. Menschliches Liquor enthält bis zu 0,45 g/l Protein (Deisenhammer et al., 2010). Die Proteine im Liquor könnten eine Art Blocking-Effekt bewirken: Beim

Blocking werden freie Bindungsstellen an der Oberfläche durch Proteine abgesättigt, so dass die unspezifische Bindung der Detektionsantikörper an die Oberfläche verhindert wird. Proteine aus dem Liquor könnten also überall dort über unspezifische, elektrostatische Wechselwirkungen binden, wo nicht spezifisch und mit deutlich höherer Affinität das Zielprotein A β an die Immobilisierungs-Antikörper bindet. Ohne dieses Blocking könnten Detektionsantikörper, die im nächsten Schritt auf die Oberfläche gegeben werden, unspezifisch an dieselben Stellen binden und so zu einem höheren Hintergrundsignal führen. Falls auch Proteine des Blocking-Reagenzes an das Zielmolekül binden, sollte diese Interaktion unspezifischer Art sein. Während der Inkubation der Detektionsantikörper sollten diese die unspezifisch gebundenen Proteine ersetzen, da die Antikörper wesentlich affiner an A β binden.

Da jedoch in der Zusammensetzung des Liquors sowohl Proteingehalt (Normalwerte zwischen 150-450 mg/l nach Lang et al. (2005)) als auch Existenz und Konzentration von natürlich vorkommenden Antikörpern gegen A β (Britschgi et al., 2009) von Spender zu Spender variieren, ist die standardmäßige Verdünnung von Proben in Liquor nicht sinnvoll. Die Reproduzierbarkeit der Messung von in Liquor verdünnten Proben wäre nicht gegeben. Ein Blocking-Effekt lässt sich aber auch durch die Zugabe anderer Protein-Lösungen erzielen: Häufig werden hierzu fetales bovines Serum (FBS), entfettetes Milchpulver, Rinderserumalbumin (BSA) oder ähnliche proteinhaltige Lösungen verwendet.

Die oben aufgezählten Reagenzien wurden im sFIDA getestet. Die Zugabe von 20 μ l Blocking-Reagenz erfolgte nach der Inkubation der Proben und drei Waschschritten mit TBST. Die Blocking-Reagenzien wurden eine Stunde bei 4°C inkubiert. Die Kontrollen ohne Blocking wurden in derselben Zeit in PBS inkubiert. Als Probe wurden die CB-Oligomere in verschiedenen Konzentrationen sowie PBS als Negativkontrolle verwendet.

Abbildung 4.4 zeigt die Ergebnisse dieses Versuchs. Mit Ausnahme der Kontrolle ohne Blocking korrelieren die sFIDA readouts unter allen Versuchsbedingungen mit den eingesetzten Konzentrationen der CB-Oligomere. Die größten Differenzen zwischen den sFIDA readouts der Probe mit der höchsten Konzentration (24 pM) und der Negativkontrolle entstand nach Blocking mit 10 % FBS und 2,5 % Milchpulver. Durch Verwendung von 3 % BSA oder Liquor als Blocking-Reagenzien sind

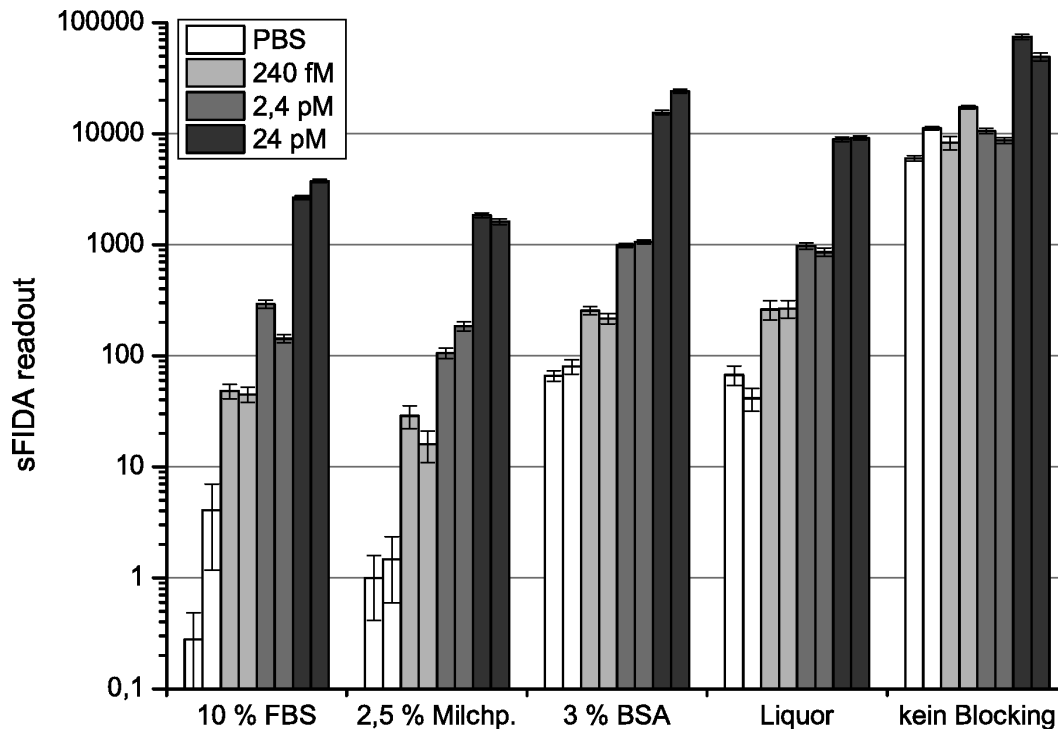


Abbildung 4.4: Test verschiedener Blocking-Reagenzien im sFIDA. Dargestellt sind die sFIDA readouts der Negativkontrolle (PBS; in weiß), von 240 fM (hellgrau), 2,4 pM (grau) und 24 pM (dunkelgrau) CB-Oligomeren in PBS, jeweils in Doppelbestimmung, bei Verwendung verschiedener Blocking-Reagenzien. Gezeigt werden jeweils die Mittelwerte und Standardfehler über alle in die Analyse einbezogenen Bilder nach Messungen mit je 25 Bildern pro Well. FBS = fetales bovines Serum; Milchp. = Milchpulver. Protokollversion 1, Mikroglas-Platte, verwendete Detektionsantikörper: 6E10-AF488 und IC16-AF647. Schwellenwerte (Kanal 0/Kanal 1): 4500/4500.

die sFIDA readouts zwar allgemein höher, der Unterschied zwischen der geringsten Proben-Konzentration (240 fM) und der Negativkontrolle ist hier aber geringer als nach Blocking mit FBS oder Milchpulver, was für eine höhere Sensitivität des sFIDA nach Blocking mit den letztgenannten Reagenzien spricht. Bei den Ergebnissen der Kontrolle ohne Blocking werden die höchsten sFIDA readouts durch die Probe mit 24 pM CB-Oligomeren erzielt, die sFIDA readouts mit den geringeren Probenkonzentrationen zeigen jedoch keine Korrelation zwischen der eingesetzten Probenkonzentration und dem sFIDA readout.

Nachdem Blocking mit FBS und Milchpulver die deutlichste Unterschiede in den readouts von unterschiedlichen Oligomer-Konzentrationen im sFIDA zeigte, wurden daraufhin verschiedene Konzentrationen von FBS und Milchpulver als Blocking-Reagenz im sFIDA getestet (Ergebnisse s. Abbildung 4.5).

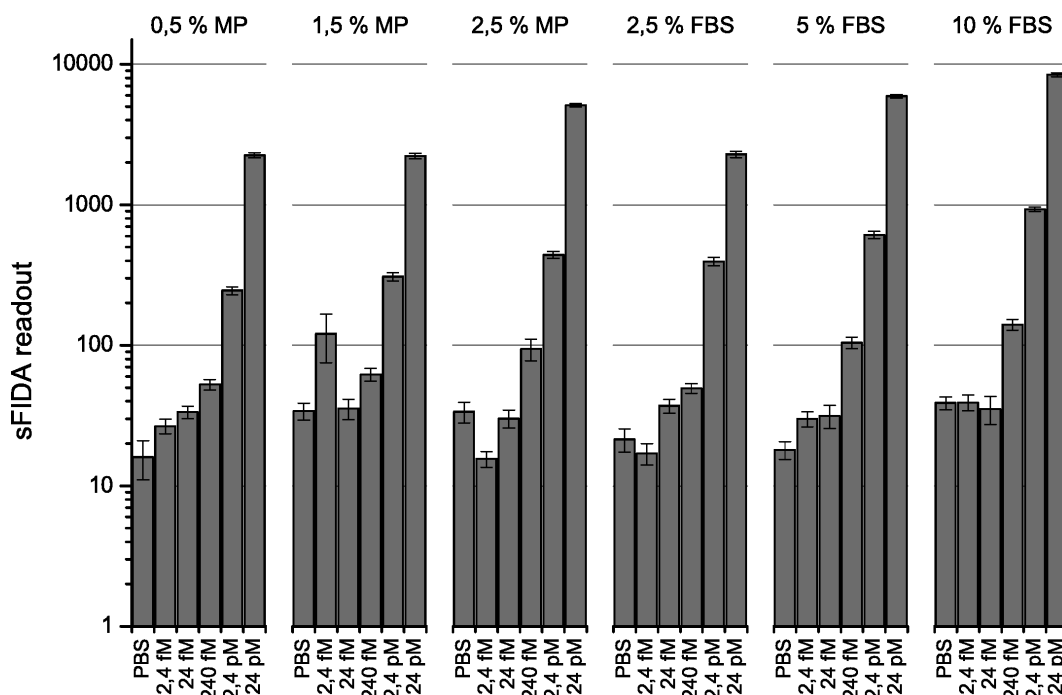


Abbildung 4.5: Test verschiedener Konzentrationen von Milchpulver oder FBS als Blocking-Reagenzien. Dargestellt sind die sFIDA readouts der Negativkontrolle (PBS) und verschiedenen Konzentrationen CB-Oligomere in PBS, nach Verwendung verschiedener Konzentrationen von Milchpulver oder FBS als Blocking-Reagenz. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte und Standardfehler über alle in die Analyse einbezogenen Bilder aus zwei identisch behandelten Wells nach Messungen mit je 25 Bildern pro Well. FBS = fetales Kälberserum; MP = Milchpulver. Protokollversion 1, Mikroglass-Platte, verwendete Detektionsantikörper: 6E10-AF488 und IC16-AF647. Schwellenwerte (Kanal 0/Kanal 1): 5000/4500.

Die sFIDA-Ergebnisse für alle getesteten Konzentrationen der beiden Blocking-Reagenzien sind hier recht ähnlich: Die sFIDA readouts korrelieren mit den eingesetzten Probenkonzentrationen zwischen 24 pM und 240 fM. Die sFIDA readouts für 24 fM und 2,4 fM CB-Oligomere und die Negativkontrolle können meist nicht eindeutig unterschieden werden. Da bei der Verwendung von Milchpulver ein sichtbarer, weißlicher Film auf der Glasoberfläche zu erkennen war und Milchpulver den Nachteil hat, dass es vor der Verwendung nicht zur Entfernung eventuell in der Suspension enthaltener Partikel zentrifugiert werden kann, sollte das Blocking in Zukunft mit FBS erfolgen. Die sFIDA readouts nach Blocking mit 5 % FBS zeigen die größte Differenz zwischen der Negativkontrolle und der höchsten eingesetzten Probenkonzentration. Unter diesen Bedingungen wird also die deutlichste Unterscheidung der verschiedenen Proben-Konzentrationen ermöglicht. In zukünftigen sFIDA-Experimenten wird das Blocking deshalb mit 5 % FBS erfolgen.

Nachdem ein geeignetes Blocking-Reagenz und dessen Konzentration ermittelt wurde, sollte in einem letzten Experiment zur Festlegung des Blocking-Schritts im sFIDA-Protokoll die Inkubationszeit des Blocking-Reagenzes optimiert werden. Dafür wurde der Blocking-Schritt mit 20 μ l 5 % FBS bei 4 °C für 10, 30 oder 60 min durchgeführt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die entsprechenden Wells dreimal mit TBST gewaschen. Das TBST verblieb in den Wells, bis alle Wells gleichzeitig mit Detektionsantikörpern beladen wurden.

Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abbildung 4.6 zusammengefasst. Bei

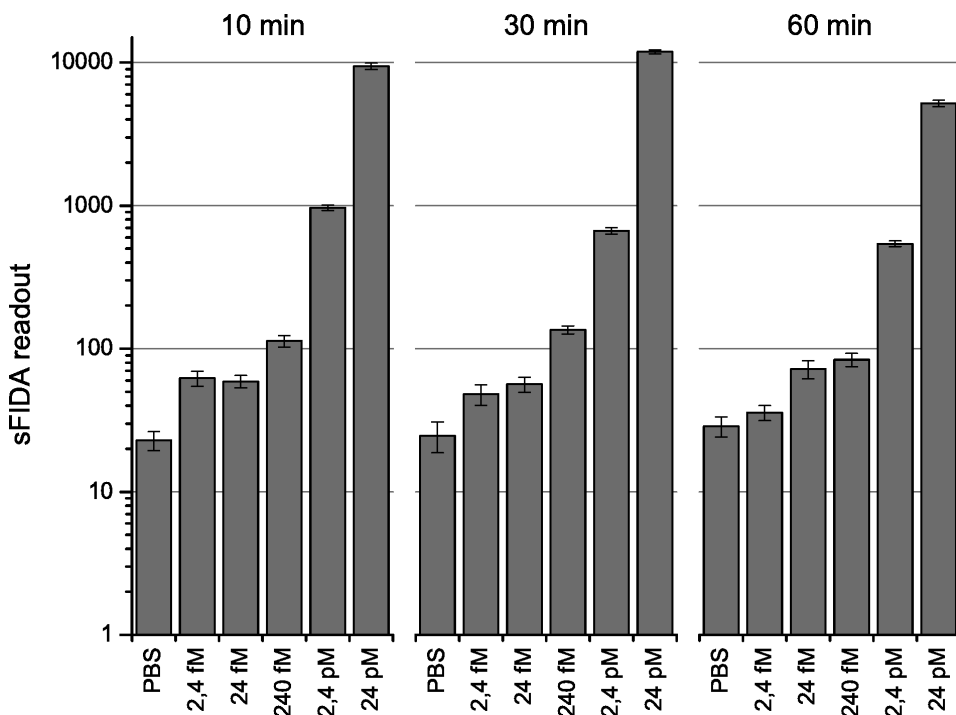


Abbildung 4.6: Test verschiedener Inkubationszeiten des Blockings mit 5 % FBS. Dargestellt sind die sFIDA readouts der Negativkontrolle (PBS) und verschiedenen Konzentrationen CB-Oligomere in PBS nach Blocking mit 5 % FBS und Inkubationszeiten von 10, 30 und 60 min. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte und Standardfehler über alle in die Analyse einbezogenen Bilder aus zwei identisch behandelten Wells nach Messungen mit je 25 Bildern pro Well. Protokollversion 1, Mikroglass-Platte, verwendete Detektionsantikörper: 6E10-AF488 und IC16-AF647. Schwellenwerte (Kanal 0/Kanal 1): 5000/5300.

allen Inkubationszeiten korreliert der sFIDA readout mit der eingesetzten Konzentration an CB-Oligomeren, mit Ausnahme von einem Ausreißer (readout von 2,4 fM Oligomeren nach 10-minütigem Blocking). Nach 60-minütiger Inkubation des Blocking-Reagenzes ist die Differenz zwischen den readouts der Negativkontrolle und der höchsten eingesetzten Konzentration von Oligomeren (24 pM) aller-

dings geringer als nach 10 oder 30 min Inkubationszeit, und auch der Unterschied der readouts von 240 fM und 24 fM CB-Oligomeren ist bei 60-minütiger Inkubation des Blocking-Reagenzes deutlich geringer als nach den kürzeren Inkubationszeiten. Da eine kurze Inkubationszeit zudem den Vorteil hat, dass das Protokoll schneller durchführbar ist, wird eine Inkubationszeit von 10 min mit 5 % FBS als geeignet betrachtet, um mit möglichst geringem Zeitaufwand die Sensitivität des sFIDA zu erhöhen und eine Unterscheidung der sFIDA readouts für geringe Probenkonzentrationen im fM-Bereich zu erreichen.

Daraufhin wurden im Folgenden sowohl synthetische als auch biologische Proben mit und ohne Blocking im sFIDA getestet.

Dafür wurden als synthetische Proben CB-Oligomere über sechs Größenordnungen von 188 pM bis 1,88 fM und PBS als Negativkontrolle in den sFIDA eingesetzt (Abbildung 4.7).

Ohne Blocking korrelieren die sFIDA readouts mit den eingesetzten Oligomerkonzentrationen in dem Bereich von 188 pM bis 188 fM, und die sFIDA readouts der geringeren Konzentrationen bis einschließlich 18,8 fM und der Negativkontrollen sind nicht unterscheidbar.

Nach Blocking durch 5 % FBS korrelieren die readouts im Bereich von 188 pM bis 18,8 fM mit der eingesetzten Probenkonzentration. Hier kann nur der readout von 1,88 fM CB-Oligomeren nicht vom readout der Negativkontrolle unterschieden werden.

Die Anwendung des Blocking-Schrittes im sFIDA führt bei der Messung von CB-Oligomeren zu einer Korrelation von sFIDA readout und eingesetzter Probenkonzentration über fünf Größenordnungen, im Gegensatz zu vier Größenordnungen ohne den Blocking-Schritt. Die Nachweisgrenze des sFIDA kann also für diese Probe durch Blocking erhöht werden.

Unter der Annahme, dass alle Oligomere der Probenlösung mit 18,8 fM Oligomeren auf der sFIDA-Oberfläche binden und keine Oligomere während der seriellen Verdünnung, dem Auftragen oder den verschiedenen Waschschritten im sFIDA verloren werden, müssten pro Bildausschnitt am verwendeten TIRF-Mikroskop etwa 237 Oligomere vorliegen. Es ist jedoch – trotz der Verwendung von „low retention“-Pipettenspitzen und „protein low binding“-Reaktionsgefäßen – unwahrscheinlich, dass die verschiedenen Pipettier-Schritte noch vor dem Auftragen der Probe ohne

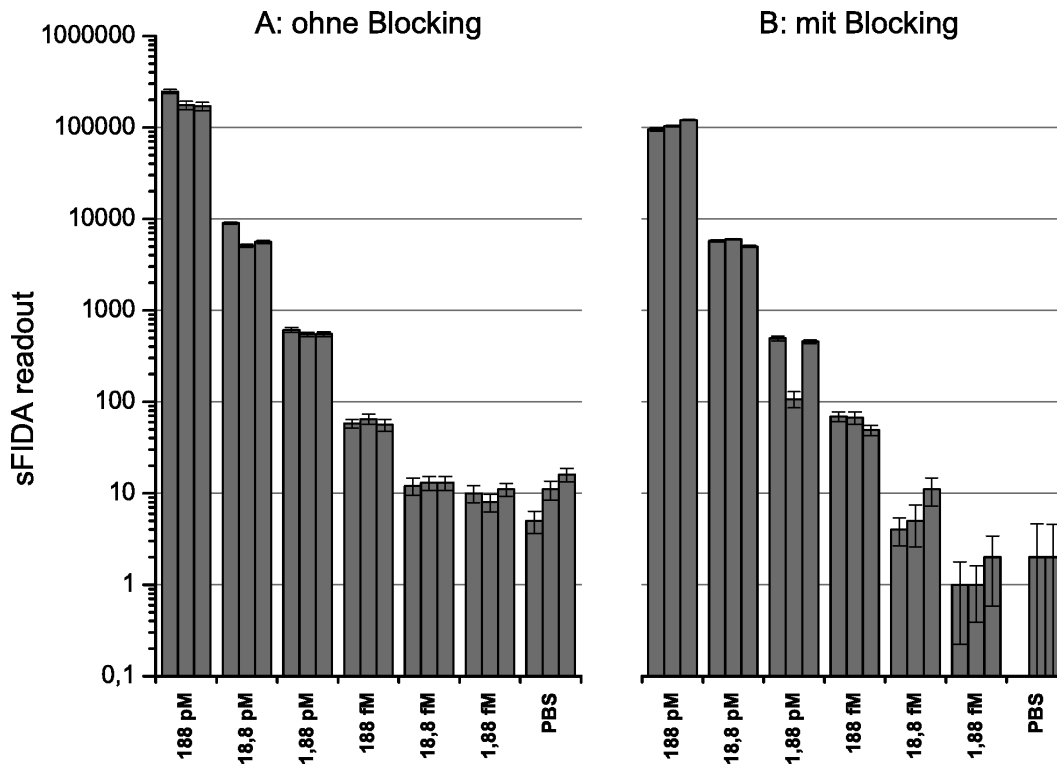


Abbildung 4.7: Verschiedene Konzentrationen von CB-Oligomeren mit und ohne Blocking. Blocking erfolgte mit 5 % FBS in PBS für 10 min. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte und Standardfehler der sFIDA readouts über alle in die Analyse einbezogenen Bilder aus einem Well nach Messungen mit je 25 Bildern pro Well. Jede Probe wurde dreifach bestimmt. Protokollversion 2 (Abweichungen: Schritt 1 (s. Tab. 3.9) wie in Protokollversion 1, Konzentration von CM-Dextran in Schritt 4: 20 mg/ml), ZAT-Platten, verwendete Detektionsantikörper: 6E10-Atto488 und IC16-Atto647N. Schwellenwerte (Kanal 0/Kanal 1): 6000/6000.

Verlust zumindest eines Teils der Oligomere ablaufen. Die Berechnung einer Wiederfindungsrate ist zwar nicht möglich, da nicht abgeschätzt werden kann, wie groß der Verlust von Oligomeren vor dem Auftragen der Probe ist. Dennoch spricht die Tatsache, dass eine Konzentration von 18,8 fM CB-Oligomeren gegenüber der Negativkontrolle zu höheren readouts führt, für eine relativ hohe Wiederfindungsrate.

Vergleicht man die sFIDA-Ergebnisse ohne Blocking aus Abbildung 4.7 mit den vor der Protokolloptimierung erzielten Ergebnissen aus Abb. 4.3 (Verdünnung in PBS; s. S. 50), so fällt auf, dass die Korrelation zwischen dem sFIDA readout und der eingesetzten Oligomer-Konzentration nun linear ist, während in Abb. 4.3 bei 10-facher Konzentrationsabnahme nur eine Verringerung des readouts um die Hälfte beobachtet wurde. Das liegt vermutlich am zwischenzeitlichen Wechsel von Pro-

tokollversion 1 auf Protokollversion 2 (s. Tab. 3.9) und der damit einhergehenden Optimierung der sFIDA-Oberfläche.

Da der sFIDA zur Messung biologischer Proben, insbesondere von Liquorproben von Spendern mit und ohne AD, verwendet werden soll, wurden die sFIDA-Ergebnisse mit und ohne Blocking auch für diese Proben verglichen.

Abbildung 4.8 zeigt die sFIDA readouts von Liquorproben von 5 Kontroll- und 4 AD-Spendern aus einer Kooperation mit Prof. Lewczuk (Universität Erlangen). Ohne Blocking variieren die readouts der verschiedenen Proben zwischen einem

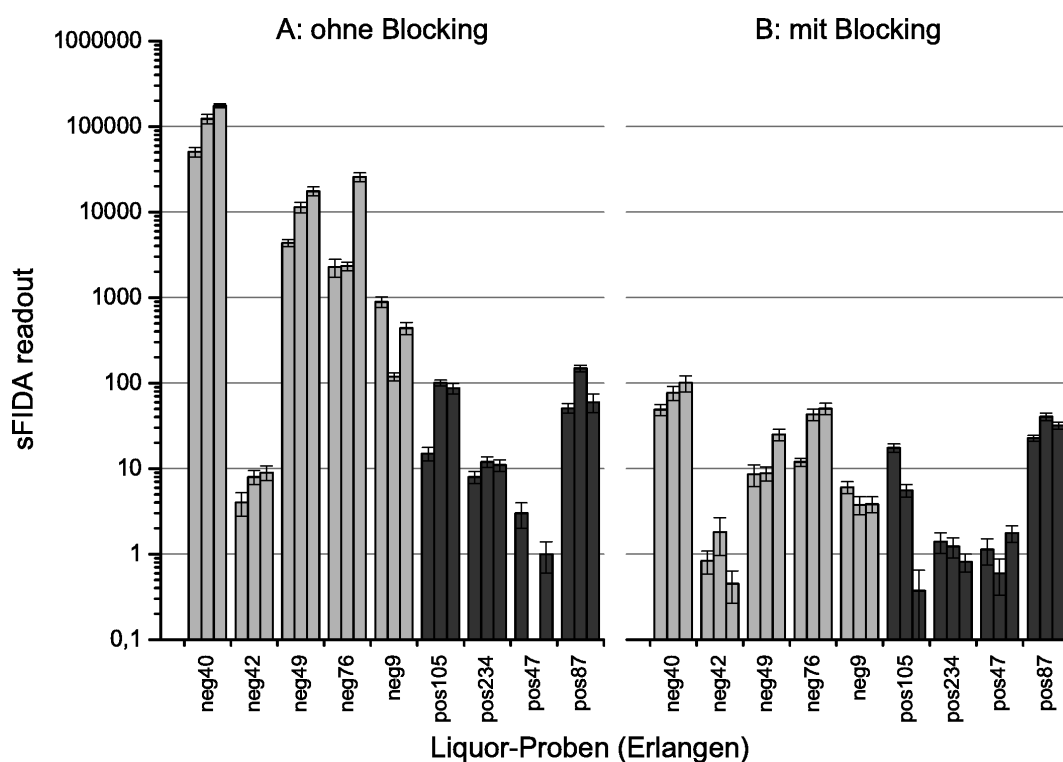


Abbildung 4.8: sFIDA readouts von Liquorproben mit und ohne Blocking. Dargestellt sind die Ergebnisse der Dreifachbestimmungen. A: sFIDA-Protokoll ohne Blocking, B: sFIDA-Protokoll mit Blocking durch 5 % FBS für 10 min. In hellgrau: Ergebnisse der Proben von nicht-dementen Kontroll-Spendern, in dunkelgrau: Ergebnisse der Proben von Spendern mit wahrscheinlicher AD. Gezeigt werden jeweils die Mittelwerte und Standardfehler über alle in die Analyse einbezogenen Bilder aus einem Well nach Messungen mit je 25 Bildern pro Well. Proben aus Studie 2. Protokollversion 2 (Abweichungen: Schritt 1 (s. Tab. 3.9) wie in Protokollversion 1, Konzentration von CM-Dextran in Schritt 4: 20 mg/ml), ZAT-Platten, verwendete Detektionsantikörper: 6E10-Atto488 und IC16-Atto647N. Schwellenwerte (Kanal 0/Kanal 1): 6000/6000

und etwa 100.000 positiven Pixeln pro Bild. Die Kontroll-Proben (hellgraue Bal-

ken) zeigen dabei mit Ausnahme der Probe „neg42“ höhere readouts als die Proben von AD-Patienten (dunkelgraue Balken), deren readouts bei Werten zwischen 1 und etwa 100 liegen. Die Ergebnisse mit Blocking zeigen dagegen deutlich geringere Werte: Hier liegen die sFIDA readouts aller Proben in einem Bereich zwischen 1 und 100, der Unterschied zwischen den readouts der Kontroll- und AD-Proben ist geringer als bei den Ergebnissen ohne Blocking.

Die Ergebnisse der Messungen von weiteren humanen Liquorproben (5 AD- und 5 Kontrollproben) mit und ohne Blocking sind in Abbildung 4.9 dargestellt. Auf der linken Seite sind die Ergebnisse ohne Blocking gezeigt. Hier liegen die readouts zwischen 0 und etwa 750.000. Abgesehen von einer Kontrollprobe (neg316), die

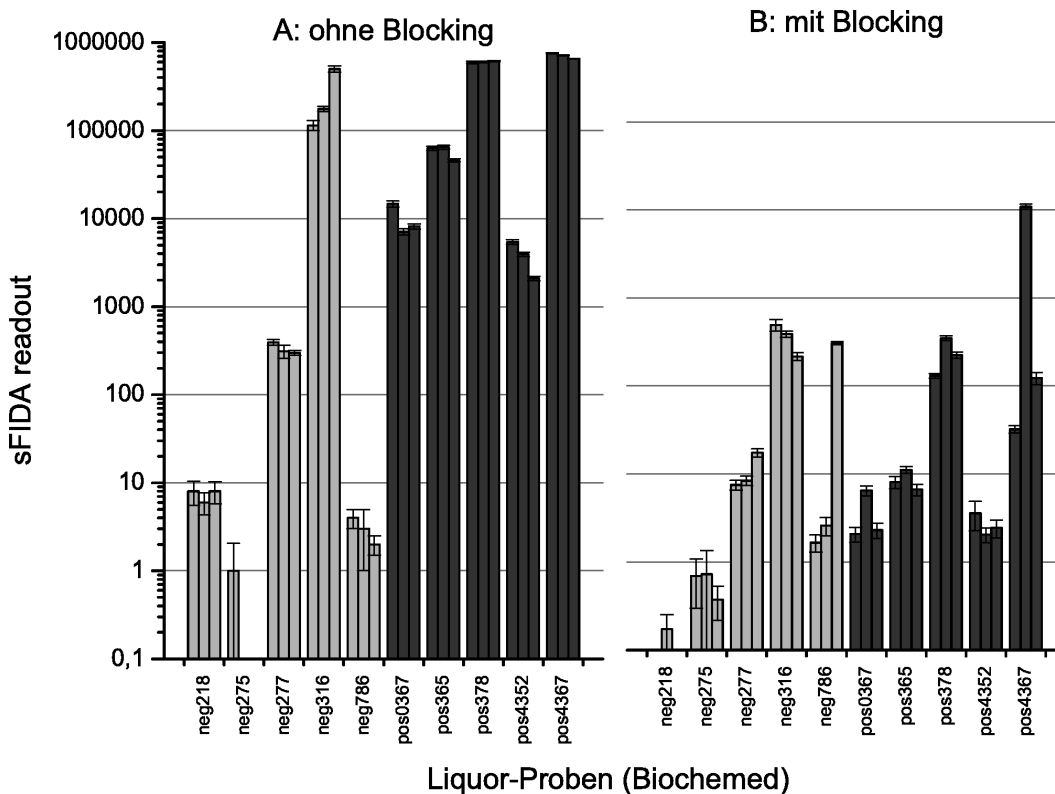


Abbildung 4.9: sFIDA readouts von Liquorproben mit und ohne Blocking. Dargestellt sind die Ergebnisse der Dreifachbestimmungen. A: sFIDA-Protokoll ohne Blocking, B: sFIDA-Protokoll mit Blocking durch 5 % FBS für 10 min. In hellgrau: Ergebnisse der Proben von Kontroll-Spendern, in dunkelgrau: Ergebnisse der Proben von Spendern mit wahrscheinlicher AD. Gezeigt werden jeweils die Mittelwerte und Standardfehler über alle in die Analyse einbezogenen Bilder aus einem Well nach Messungen mit je 25 Bildern pro Well. Proben aus Studie 1. Protokollversion 2 (Abweichungen: Schritt 1 (s. Tab. 3.9) wie in Protokollversion 1, Konzentration von CM-Dextran in Schritt 4: 20 mg/ml), ZAT-Platten, verwendete Detektionsantikörper: 6E10-Atto488 und IC16-Atto647N. Schwellenwerte (Kanal 0/Kanal 1): 6000/6000.

sehr hohe readouts zeigte, waren die readouts der Kontrollproben (hellgraue Balken in Abb. 4.9) mit Werten zwischen 0 und 400 deutlich geringer als die der AD-Proben (dunkelgraue Balken) mit readouts von etwa 2000 bis 750.000.

Die Ergebnisse derselben Proben mit Blocking zeigen deutlich geringere Variationen in den readouts der verschiedenen Proben: Hier lagen alle readouts im Bereich zwischen 0 und 500, mit Ausnahme eines Ausreißers bei etwa 11.000 (zweite Messung der Probe pos4367). Die readouts der Kontroll- und AD-Gruppe zeigen hier deutliche Überlappungen und sind im Gegensatz zu den readouts, die ohne Blocking erzielt wurden, nicht unterscheidbar.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass 10-minütiges Blocking mit 5 % FBS eine erhöhte Sensitivität des sFIDA für Messungen mit synthetischen CB-Oligomeren bewirkt. Diese erhöhte Sensitivität des sFIDA ist vermutlich auf ein geringeres Hintergrundsignal zurückzuführen, da durch das Blocking weniger Detektionsantikörper unspezifisch auf der Oberfläche binden, was ein besseres Signal-zu-Rauschen-Verhältnis zur Folge hat.

Bei Untersuchungen von humanen Liquorproben im sFIDA mit und ohne Durchführung des Blocking-Schrittes zeigte sich allerdings, dass die sFIDA readouts mit Blocking deutlich geringer waren als ohne Blocking. Gleichzeitig war eine Unterscheidung der sFIDA readouts von AD- und Kontrollproben anhand der mit Blocking erzielten Ergebnisse nicht möglich; Die ohne Blocking erzielten Ergebnisse hingegen ermöglichten eine solche Unterscheidung.

Im Gegensatz zu den stabilen Oligomeren der Firma Crossbeta scheint Blocking mit fetalem bovines Serum Einfluss auf die A β -Oligomere aus Liquor oder auf deren Fähigkeit zur Antikörper-Bindung zu haben.

Eine mögliche Ursache könnte sein, dass Proteine aus FBS A β -Moleküle im Liquor binden und dadurch die Epitope, an die auch die Detektionsantikörper binden, maskieren. Albumin macht den größten Anteil an Proteinen in FBS aus (17-34 g/l, Herstellerangaben von RMBIO) und es gibt Hinweise in der Literatur, dass Albumine aus humanem und bovinem Serum an oligomeres A β binden (Barcelo et al., 2009; Milojevic et al., 2007; Bohrmann et al., 1999). Dadurch wird wahrscheinlich die Anlagerung von weiteren A β -Peptiden und somit die weitere Polymerisierung verhindert (Milojevic et al., 2009).

Bezüglich der Affinität des A β für humanes Serumalbumin sind K_D -Werte zwischen 5 μ M (Rózga et al., 2007; Stanyon und Viles, 2012) für monomeres A β bzw. 1-100 nM (Milojevic und Melacini, 2011) für oligomeres A β genannt. Milojevic und Melacini nutzten für Experimente neben A β_{1-42} auch A β_{12-28} -Fragmente, die mit humanem Serumalbumin interagierten. In einer anderen Veröffentlichung (Defelice und Ferreira, 2002) ist angegeben, dass die Aminosäuren 1-28 des A β mit humanem Serumalbumin interagiert.

Unter der Annahme, dass bovines Serumalbumin (BSA) humanem Serumalbumin in der Affinität zu A β -Oligomeren ähnelt und auch dieselbe Region des A β bindet – nämlich den N-terminalen Bereich – könnte Albumin aus FBS viele der A β -Oligomere auf der sFIDA-Oberfläche binden. Dadurch könnten die Bindestellen der ebenfalls am N-Terminus bindenden Detektionsantikörper maskiert und eine Detektion der A β -Oligomere verhindert werden.

Allerdings enthält auch humanes CSF etwa 3 μ M Albumin (Stevens et al., 1979); ein Unterschied in der Albumin-Konzentration von AD-Patienten und einer Kontrollgruppe konnte nicht nachgewiesen werden (Serot et al., 1997).

Die molare Konzentration von Albumin in 5 % FBS, wie es zum Blocking in diesem Abschnitt verwendet wurde, entspricht etwa 12,8-25,6 μ M; die Konzentration von Albuminen in der Blocking-Lösung entsprach also mindestens der vierfachen Konzentration von Albuminen in CSF. Im Vergleich zur Konzentration des BSA beträgt die molare Konzentration der Detektionsantikörper nur je 8,9 nM. Wenn der K_D -Wert von Albuminen und Antikörpern für A β im nanomolaren Bereich liegt ist es also durchaus plausibel, dass durch Blocking mit FBS Albumine an den größten Teil der A β -Oligomere binden und diese deshalb nicht mehr detektiert werden können.

Dass die synthetischen CB-Oligomere nach Inkubation mit FBS im Gegensatz zu den Oligomeren aus Liquor Detektionsantikörper binden, liegt vermutlich daran, dass Albumine (oder andere Bestandteile des Serums) die CB-Oligomere nicht binden können. Das kann entweder allgemein an einer anderen Konformation der synthetischen Oligomere liegen, oder die Modifizierung, die diese Oligomere stabilisiert, verhindert die Bindung. Möglich ist auch, dass weitere im Liquor vorhandene Moleküle für die Bindung des A β an Albumine nötig sind.

Die beschriebenen Experimente wurden in diesem Abschnitt nur hinsichtlich der

Auswirkungen des Blockings im sFIDA diskutiert. Weitere Aspekte der sFIDA-Ergebnisse mit humanen Liquorproben von Patienten mit AD und von Kontroll-Spendern werden in Abschnitt 4.4 ausgewertet und diskutiert.

4.2.4 Optimierung der Anzahl der Waschschritte nach Inkubation von Proben und Detektionsantikörpern

In diesem Abschnitt sollen die Waschbedingungen im sFIDA-Protokoll nach dem Auftrag der Proben und Detektionsantikörper untersucht werden.

Dem sFIDA-Protokoll entsprechend werden nach der Vorbereitung der Glasplatte zunächst primäre Amingruppen durch die Reaktion der Hydroxygruppen des Ethanolamins mit den Silanolgruppen auf der Glasoberfläche eingeführt. Über Aminokopplungen mit EDC und NHS wird CM-Dextran im nächsten Schritt kovalent an die Glasoberfläche gebunden. Nach Aktivierung der Carboxylgruppen des Dextrans werden im nächsten Schritt die Immobilisierungsantikörper an die Dextran-Matrix auf der Glasoberfläche gebunden. Die hierbei entstehenden kovalenten Bindungen erlauben sehr stringente Waschbedingungen.

In den darauf folgenden Schritten des sFIDA-Protokolls, bei der Bindung des A β an die Immobilisierungsantikörper sowie der Bindung des A β durch Fluorochrom-markierte Antikörper, entstehen zwar affine Bindungen des A β mit anti-A β -Antikörpern, diese sind jedoch nicht kovalent und können sich wieder lösen. Deshalb ist es wichtig, nach diesen Schritten ausreichend intensiv zu waschen, um unspezifisch bindende Moleküle von der Oberfläche zu entfernen und somit unspezifisches Signal zu verhindern. Es darf allerdings auch nicht so intensiv gewaschen werden, dass zu viele der spezifisch gebundenen Moleküle von der Oberfläche entfernt werden. Hierdurch würde das spezifische Signal verringert, was eine Abnahme der Sensitivität des Assays zur Folge hätte.

Aus diesem Grund wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem die Anzahl der Waschschr

itte jeweils nach der Inkubation der Proben und nach der Inkubation der Detektionsantikörper variiert wurde. Hierfür wurden drei verschiedene Protokollvarianten gewählt:

- A) stringentes Waschen: Entspricht dem vor der durchgeführten Messreihe angewandten Protokoll. Nach der Inkubation der Proben wurde 3x mit TBST gewaschen, nach der Inkubation der Detektionsantikörper 3x mit TBST und

3x mit Wasser

- B) gemäßigtes Waschen: Nach der Inkubation der Proben wurde 2x mit TBST gewaschen, nach der Inkubation der Detektionsantikörper 2x mit TBST und 1x mit Wasser
- C) mildes Waschen: Nach der Inkubation der Proben wurde 1x mit TBST gewaschen, nach der Inkubation der Detektionsantikörper 1x mit TBST und 1x mit Wasser

Als Proben wurden stabilisierte Oligomere der Firma Crossbeta in verschiedenen Konzentrationen und PBS als Negativkontrolle eingesetzt. Abbildung 4.10 zeigt die Ergebnisse dieses Versuchs.

Abgesehen von der Negativkontrolle nach stringenten Waschschritten (A) korrelieren die sFIDA readouts unter allen getesteten Versuchsbedingungen mit den eingesetzten Oligomer-Konzentrationen. Die Bereiche, in denen die readouts liegen, variieren jedoch. Unter Versuchsbedingung A (stringentes Waschen) liegen die sFIDA readouts etwa zwischen 48 (2,4 fM Oligomere) und 19.000 für die höchste Probenkonzentration, unter Versuchsbedingungen B (gemäßigtes Waschen) zwischen 47 für die Negativkontrolle und 22.000 für die höchste Konzentration und unter milden Waschbedingungen (C) zwischen 190 und 175.000. Insgesamt ergibt sich bei milden Waschbedingungen der beste Kompromiss zwischen einerseits guter Differenz zwischen den readouts der Negativkontrolle und der geringsten Probenkonzentration und andererseits guter Korrelation der readouts mit der Probenkonzentration.

Die Trennung der verschiedenen Oligomer-Konzentrationen ist also bei Verwendung des sFIDA-Protokolls mit milden Waschbedingungen am deutlichsten. Diese Ergebnisse können folgendermaßen interpretiert werden: Je weniger gewaschen wird, desto mehr Hintergrundrauschen wird gemessen, weil mehr unspezifisch bindende oder in Lösung vorkommende Fluorochrome auf der Oberfläche verbleiben. Deshalb ist unter milden Waschbedingungen der sFIDA readout der Negativkontrolle und von geringen Oligomer-Konzentrationen höher als nach einer größeren Anzahl von Waschschritten. Gleichzeitig wird durch geringeres Waschen aber auch weniger im Probenmaterial enthaltene A β -Oligomere und spezifisch daran bindende Detektionsantikörper von der Oberfläche entfernt. Dies ist daran zu erkennen, dass der Unterschied der readouts zwischen der niedrigsten und der höchsten

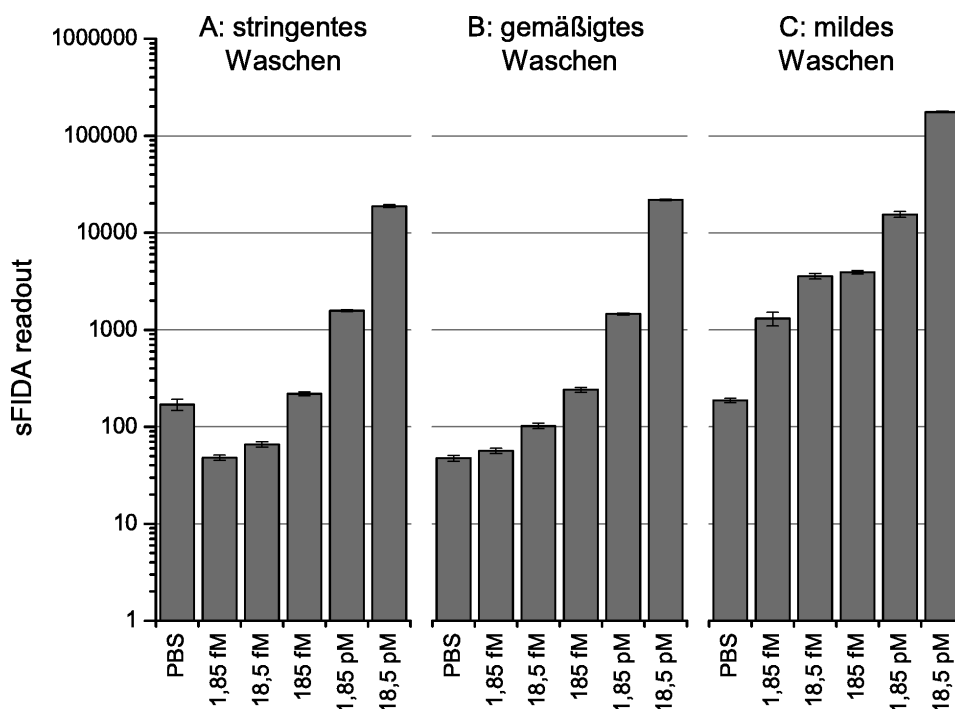


Abbildung 4.10: Vergleich verschiedener Waschbedingungen im sFIDA. Als Proben wurden CB-Oligomere in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. A: stringentes Waschen (3x TBST nach Inkubation der Proben, 3x TBST und 3x H₂O nach Inkubation der Detektionsantikörper); B: gemäßigtes Waschen (2x TBST nach Inkubation der Proben, 2x TBST und 1x H₂O nach Inkubation der Detektionsantikörper); C: mildes Waschen (1x TBST nach Inkubation der Proben, 1x TBST und 1x H₂O nach Inkubation der Detektionsantikörper). Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte und Standardfehler über alle in die Analyse einbezogenen Bilder aus zwei (18,5 pM) bzw. drei (alle anderen Konzentrationen) identisch behandelten Wells nach Messungen mit je 25 Bildern pro Well. Protokollversion 1, ZAT-Platte, verwendete Detektionsantikörper: 6E10-Atto488 und IC16-Atto647N. Schwellenwerte (Kanal 0/Kanal 1): 4000/6000.

Konzentration unter milden Waschbedingungen größer ist als unter stringenteren Waschbedingungen.

Dieser Versuch wurde mit synthetischen CB-Oligomeren durchgeführt. Aus theoretischen Überlegungen wurde die Schlussfolgerung auch auf Versuche mit Liquorproben übertragen: A β -Oligomere in Liquorproben sind wahrscheinlich deutlich kleiner als die aus etwa 200 Monomeren bestehenden synthetischen Oligomere der Firma Crossbeta. Je kleiner die Oligomere sind, umso weniger Immobilisierungs-Antikörper binden an die Oligomere und halten sie dadurch auf der Oberfläche. Die Wahrscheinlichkeit, dass kleine Oligomere von der Oberfläche gewaschen werden ist deshalb größer als bei größeren Oligomeren. Weil erwartet wird, dass die Konzentration von A β -Oligomeren in Liquor gering ist, ist es wichtig, möglichst alle

in der Lösung vorkommenden Oligomere auf der Oberfläche zu binden. Aus diesen Gründen sollten die milderen Waschschrirte auch für sFIDA-Experimente mit Liquorproben angewandt werden.

Es wurde also entschieden, dass in zukünftigen Versuchen nach der Inkubation der Proben auf der Oberfläche nur einmal mit Puffer und nach der Inkubation der Detektionsantikörper einmal mit Puffer und einmal mit Wasser gewaschen werden soll.

4.2.5 Zusammenfassung der Protokolloptimierung

In diesem Teil der Arbeit wurde die Optimierung des sFIDA-Protokolls beschrieben. Einzelne Schritte des Protokolls wurden dabei leicht verändert oder neu zu dem Protokoll hinzugefügt und die Ergebnisse, die durch das veränderte Protokoll erzielt wurden, wurden mit denen des vorher üblichen Protokolls verglichen.

Im ersten Abschnitt wurde untersucht, ob die Inkubation von Natriumhydroxid verkürzt werden kann. Das Ergebnis des Versuchs zeigte, dass eine deutliche Verkürzung der Inkubationszeit von NaOH nicht sinnvoll ist, da diese eine geringere Differenz der readouts von hohen Probenkonzentrationen gegenüber der Negativkontrolle und somit eine geringere Sensitivität des sFIDA zur Folge hätte.

Weiterhin wurde festgestellt, dass in Liquor verdünnte CB-Oligomeren eine deutlichere Abgrenzung der sFIDA readouts verschiedener Oligomer-Konzentrationen voneinander und eine bessere Korrelation des sFIDA readouts mit den eingesetzten Konzentrationen zeigt als in PBS verdünnte Oligomere. Dies wurde auf die Anwesenheit von Proteinen im Liquor zurückgeführt, die denselben Effekt haben könnte wie die Verwendung eines Blocking-Reagenzes.

Um den Einsatz von Blocking im sFIDA zu untersuchen, wurden zunächst verschiedene Blocking-Reagenzien und Inkubationszeiten des Blocking-Reagenzes getestet. Die Ergebnisse dieser Versuche zeigten, dass von allen getesteten Blocking-Bedingungen das Blocking mit 5 % FBS über 10 min die geringste Nachweisgrenze in der Detektion von CB-Oligomeren und die beste Korrelation der sFIDA readouts mit den eingesetzten Oligomer-Konzentrationen ermöglichte.

Der direkte Vergleich des sFIDA mit synthetischen CB-Oligomeren mit und oh-

ne Blocking zeigte, dass die Anwendung des Blocking-Schrittes die Sensitivität des sFIDA um den Faktor 10 erhöht. Der sFIDA readout von 18,8 fM stabilisierten Oligomeren konnte mit Blocking vom readout der Negativkontrolle unterschieden werden, während im selben Versuch ohne Blocking erst der readout der nächsthöheren Konzentration (188 fM) klar vom readout der Negativkontrolle abgegrenzt werden konnte.

Dagegen zeigten die Ergebnisse mit Liquorproben von AD- und Kontroll-Spendern aus zwei verschiedenen Quellen, dass die sFIDA readouts nach Blocking deutlich geringer waren als ohne Blocking. Ohne Blocking waren die sFIDA readouts von den AD- und Kontrollgruppen – abgesehen von Ausreißern – unterscheidbar; diese Unterschiede waren im selben Versuch mit Blocking jedoch nicht zu beobachten. Nach diesen Ergebnissen sollte für Liquorproben also kein Blocking-Schritt mit 5 % FBS verwendet werden.

Schließlich wurde untersucht, ob die zuvor angewandten Waschschrte nach dem Auftragen von Probe und Detektionsantikörpern zu stringent sind. Dabei zeigte sich, dass die readouts bei wenigen Waschschrten insgesamt höher sind. Die Korrelation der readouts mit der eingesetzten Probenkonzentrationen ist bei Verwendung des sFIDA-Protokolls mit milden Waschbedingungen am deutlichsten. Dieser Versuch wurde nur mit synthetischen stabilen Oligomeren durchgeführt, aus theoretischen Überlegungen wurden die Ergebnisse jedoch auch auf Liquorproben übertragen. Deshalb wurde beschlossen, in zukünftigen Versuchen mildere Waschbedingungen anzuwenden und nach der Inkubation der Proben nur einmal mit Puffer zu waschen sowie nach der Inkubation der Detektionsantikörper einmal mit Puffer und einmal mit Wasser.

4.3 Herstellung und Charakterisierung stabilisierter „KK-“Oligomere aus $A\beta_{1-42}$

4.3.1 Hintergrund

In dieser Arbeit wurden häufig CB-Oligomere – stabilisierte $A\beta$ -Oligomere der Firma Crossbeta – als Standardmoleküle im sFIDA eingesetzt. Diese Oligomere haben den Vorteil, dass sie über einen Zeitraum von mehreren Monaten stabil sind und so die Reproduzierbarkeit von sFIDA-Experimenten überprüft werden kann. Auch für Experimente zur Protokoll-Optimierung sind stabilisierte $A\beta$ -Oligomere, die ohne aufwändige Vorbereitung vor jedem einzelnen Versuch zur Verfügung stehen, eine große Erleichterung.

Die CB-Oligomere bestehen jeweils aus etwa 200 $A\beta_{1-42}$ Monomeren und sind damit vermutlich größer als Oligomere, die in humanem Liquor vorkommen. Aus diesen Gründen wären selbst hergestellte, kleinere und gut charakterisierte stabilisierte Oligomere aus $A\beta$ hilfreich als Standardmolekül und für die weitere Entwicklung des sFIDA. Die theoretischen Vorüberlegungen zur Herstellung solcher stabilisierten Oligomere, die entsprechenden Versuche zur Herstellung und die Charakterisierung der produzierten $A\beta$ -Oligomere werden in diesem Abschnitt beschrieben. Die selbst hergestellten, stabilisierten $A\beta$ -Oligomere werden im Folgenden als KK-Oligomere bezeichnet.

4.3.2 Produktion quervernetzter $A\beta$ -Oligomere

4.3.2.1 Theoretische Vorüberlegungen

2008 beschrieben Kastner et al. eine Methode („GraFix“), nach der sie Makromoleküle während der Zentrifugation in einem Dichtegradienten fixierten, um die Aggregation der Makromoleküle zu verhindern und die einzelnen Moleküle für die spätere Untersuchung mittels Elektronen-Mikroskopie zu stabilisieren.

In Anlehnung an diese Methode entstand die Idee, $A\beta_{1-42}$ zunächst in Puffer oligomerisieren zu lassen und die resultierenden Oligomere entweder vor oder während der Dichtegradientenzentrifugation (DGZ) durch kovalente Quervernetzung der einzelnen Peptide eines Oligomeres zu stabilisieren.

Bei der DGZ (schematisch in Abb. 4.11 dargestellt) werden Partikel anhand ihrer

Sedimentationsgeschwindigkeit in einem Dichtegradienten getrennt. Die Sedimentationsgeschwindigkeit der Partikel ist dabei zum einen abhängig von Parametern, die vom Anwender bestimmt werden können, nämlich der Stärke der Beschleunigung (durch die Zentrifuge) sowie der Viskosität und Dichte des Mediums. Zum anderen hängt die Sedimentationsgeschwindigkeit von der Beschaffenheit – der Konformation, Dichte und Masse – der Partikel ab. In der Annahme, dass A β -Oligomere unabhängig von ihrer Masse ähnliche Konformationen und Dichten aufweisen, werden die stabilen Oligomere im Wesentlichen anhand der Masse, also der Anzahl an Peptiden pro Oligomer, aufgetrennt.

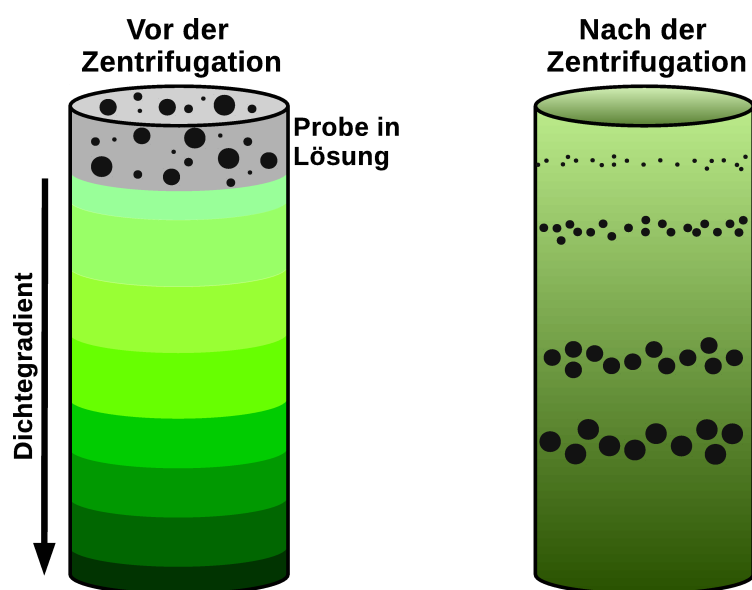


Abbildung 4.11: Schematische Darstellung der DGZ. In einem Zentrifugenröhrchen (schwarzer Zylinder) wird ein Dichtegradient hergestellt, indem verschiedene Fraktionen mit geringer werdender Konzentration eines gelösten Stoffes (in verschiedenen Grüntönen dargestellt) von unten nach oben geschichtet werden. Auf diesen Dichtegradienten wird die Probe (in grau) geschichtet, die Partikel verschiedener Größen (schwarze Kreise) enthält. Während der DGZ wird durch Diffusion aus diesem schrittweisen Dichtegradienten ein linearer Gradient und die in der Probe enthaltenen Partikel sedimentieren entsprechend ihrer Konformation, Dichte und Masse.

Zur kovalenten Quervernetzung des A β gibt es verschiedene Möglichkeiten, die von Moore et al. (2009) untersucht wurden. Sie beschreiben die Quervernetzung des A β durch Glutaraldehyd oder durch das Enzym Transglutaminase. Die Autoren stellten fest, dass Glutaraldehyd verstärkt mit der N-terminalen Aminogruppe des A β reagiert und ein Piperidin-Konjugat formt. Diese Modifizierung kann die Bindung von Antikörpern am N-Terminus verhindern, weshalb die Quervernetzung des A β

durch Glutaraldehyd für den hier beschriebenen Einsatz der stabilisierten Oligomere im sFIDA ungeeignet erscheint. Die Ergebnisse der Ansätze mit dem Enzym Transglutaminase zeigten, dass hier nicht nur die Peptide der A β -Oligomere quervernetzt wurden, sondern dass A β auch an das Enzym selbst gebunden wurde. Aus diesem Grund wurde die Verwendung von Transglutaminasen zum Stabilisieren der A β -Oligomere ebenfalls verworfen.

Eine weitere Möglichkeit zur Quervernetzung der Peptide ist eine Reaktion mit EDC. EDC reagiert mit dem Carboxylat einer Aminosäure (z. B. von einem Peptid), wobei ein reaktives Zwischenprodukt (O-Acylisoharnstoff) entsteht, das durch einen nukleophilen Angriff eines primären Amins (z. B. von einem zweiten Peptid) leicht verdrängt wird. Bei dieser Reaktion werden die beiden Peptide kovalent miteinander verknüpft, am effektivsten bei pH-Werten um 4,5. Um die Reaktion effizienter ablaufen zu lassen, kann zusätzlich zum EDC ein weiteres Reagenz, N-Hydroxysuccinimid (NHS), eingesetzt werden. Über das EDC bindet NHS an Carboxyle, wodurch ein NHS-Ester gebildet wird. NHS-Ester stellen ein stabiles Intermediat dar, im Gegensatz zum deutlich instabileren Intermediat O-Acylisoharnstoff, das bei der Reaktion mit EDC alleine entsteht. Bei physiologischem pH-Wert kann dieser NHS-Ester effizient an primäre Amine binden. Die Reaktion mit EDC und NHS ist in Abbildung 4.12 dargestellt.

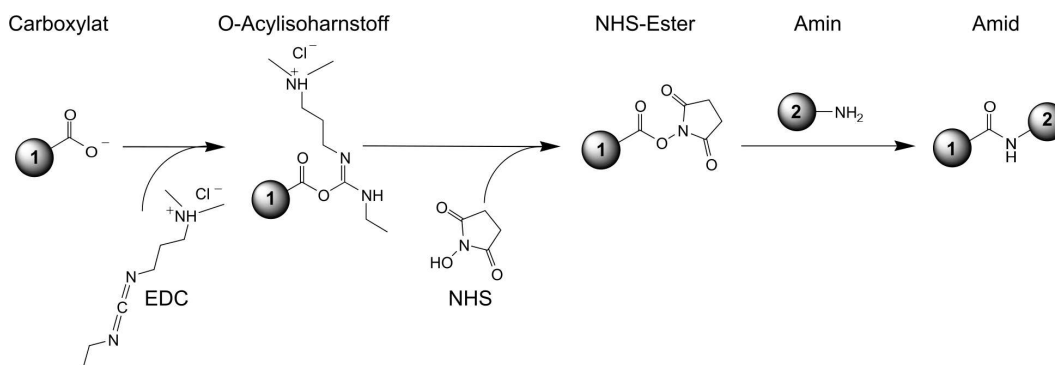


Abbildung 4.12: Schematische Darstellung der Verknüpfung zweier Peptide mittels EDC und NHS. Die runden Kreise mit den Ziffern 1 und 2 stellen Peptide dar. Quelle: wikipedia.org

Diese Art der Quervernetzung von A β zur Produktion von stabilisierten Oligomeren wurde getestet. Die Experimente hierzu und die schrittweise Entwicklung der Produktion von stabilisierten Oligomeren werden im Folgenden beschrieben.

4.3.2.2 Kovalente Quervernetzung von A β ₁₋₄₂

Zunächst wurde untersucht, ob A β ₁₋₄₂ durch EDC und NHS quervernetzt werden kann. Dafür wurde A β ₁₋₄₂ in einer Konzentration von 80 μ M in PBS in Anwesenheit von EDC (200 mM) und NHS (50 mM) inkubiert. Nach verschiedenen Inkubationszeiten wurden je 5 μ l dieser Reaktionsansätze entnommen und zum Stoppen der Reaktion mit 5 μ l Ethanolamin-Hydrochlorid (1 M in PBS) gemischt. Anschließend wurden die mit verschiedenen Inkubationszeiten hergestellten Ansätze denaturiert und mittels SDS-PAGE untersucht. Die Proteinbanden wurden durch Silberfärbung sichtbar gemacht.

Das Ergebnis ist in Abbildung 4.13 dargestellt. Für alle Inkubationszeiten sind

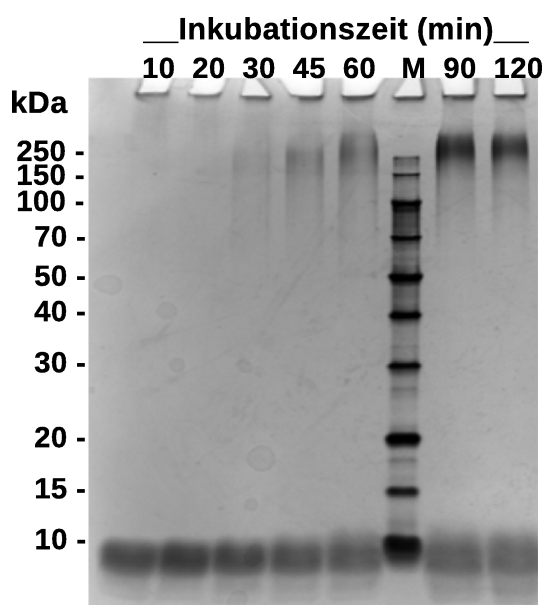


Abbildung 4.13: Kovalente Quervernetzung von A β durch EDC und NHS nach verschiedenen Inkubationszeiten. SDS-PAGE von 80 μ M A β ₁₋₄₂, das 10-120 min in Anwesenheit von EDC und NHS inkubiert wurde. M: Proteinmarker (PageRuler Unstained Broad Range Protein Ladder von Thermo Scientific).

Proteinbanden am unteren Gel-Ende erkennbar, die A β -Monomeren mit einem Molekulargewicht von 4,5 kDa entsprechen. Ab einer Inkubationszeit von 30 min sind auch am oberen Gel-Ende Banden erkennbar, die mit zunehmender Dauer der Inkubation intensiver gefärbt sind. Diese Banden sind im Gel noch etwas langsamer gelaufen als das 250 kDa große Markerprotein und entsprechen quervernetztem A β .

Dass bei Inkubationszeiten bis 120 min Monomere im Gel nachgewiesen wurden, zeigt, dass bei diesem Reaktionsansatz auch nach 120 min nicht alle A β -Peptide zu Oligomeren quervernetzt wurden. Bis zu einer Inkubationszeit von 90 min nimmt die Intensität der Banden von quervernetzten A β -Molekülen zu und somit auch deren Konzentration in den jeweiligen Ansätzen. Die Oligomer-Banden, die durch 90 bzw. 120 min Inkubationszeit entstehen, zeigen keine Unterschiede in der

Intensität der Silberfärbung. Es kann also angenommen werden, dass eine weitere Konzentrationszunahme des quervernetzten A β nach 90 min Inkubationszeit nicht mehr stattfindet oder relativ gering ist.

Dieser Versuch zeigt also, dass Reaktionen durch EDC und NHS zur Quervernetzung von A β_{1-42} geeignet sind und dass die Reaktion unter den gewählten Bedingungen mindestens 90 min lang aktiv ist.

4.3.2.3 Vergleich der Quervernetzung vor und während der Auftrennung von A β -Oligomeren mittels DGZ

Nachdem experimentell bestätigt wurde, dass A β mittels EDC und NHS quervernetzt wird, wurde im Folgenden die Quervernetzung mit der DGZ kombiniert. Als Gradientenmaterial wurde Saccharose gewählt, die in Konzentrationen zwischen 5 und 50 % (w/v) eingesetzt wurde. Der generelle Ablauf einer DGZ zur Produktion von stabilen Oligomeren wird im Folgenden kurz beschrieben:

Ausgehend von der Fraktion mit der höchsten Saccharose-Konzentration hin zu den geringer werdenden Konzentrationen werden die Fraktionen in einem Zentrifugenröhrchen vorsichtig übereinander geschichtet, eine Durchmischung der verschiedenen Fraktionen soll dabei vermieden werden. Auf die Fraktion mit 5 % Saccharose werden vorsichtig 200 μ l der Probe (vorinkubiertes A β , 80 μ M in PBS) gegeben. Daraufhin wird die Ultrazentrifugation des Dichtegradienten für 3 h 10 min bei 259.000 g gestartet. Nach der Zentrifugation werden die Gradienten der Zentrifuge entnommen. Sorgfältig werden Fraktionen mit je 150 μ l von oben nach unten entnommen und in dieser Reihenfolge mit den Nummern 1-13 benannt. In den verschiedenen Fraktionen sollten nun also die Moleküle sortiert nach ihrer Konformation, Dichte und Masse vorliegen. Geht man davon aus, dass alle A β -Moleküle eine ähnliche Dichte und Konformation aufweisen, dann sollten die leichtesten und kleinsten Partikel in der Fraktion 1 vorliegen, die schwersten und größten in der Fraktion 13.

Die Quervernetzung des A β kann entweder vor oder während der DGZ erfolgen. Beide Möglichkeiten wurden getestet:

Nach Protokoll A wurde das A β zunächst 10 min in PBS vorinkubiert, nach Zugabe von EDC und NHS wurde es weitere 30 min inkubiert. Vor dem Auftragen der Probe auf den Dichtegradienten wurde die Quervernetzung durch EDC und NHS gestoppt, indem Ethanolamin-Hydrochlorid dazugegeben wurde.

Nach Protokoll B wurde das A β 45 min in PBS vorinkubiert, EDC und NHS wurden den Fraktionen mit 10-50 % Saccharose zugefügt. Das A β kam also erst während der Zentrifugation in Kontakt mit EDC und NHS und wurde dementsprechend auch erst im Gradienten quervernetzt. Nach der Zentrifugation wurden alle Fraktionen mit Ethanolamin-Hydrochlorid gemischt, um die Quervernetzung durch EDC und NHS zu stoppen.

Im Anschluss an die DGZ wurden alle Fraktionen denaturiert und mittels SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung der Gele untersucht (s. Abbildung 4.14).

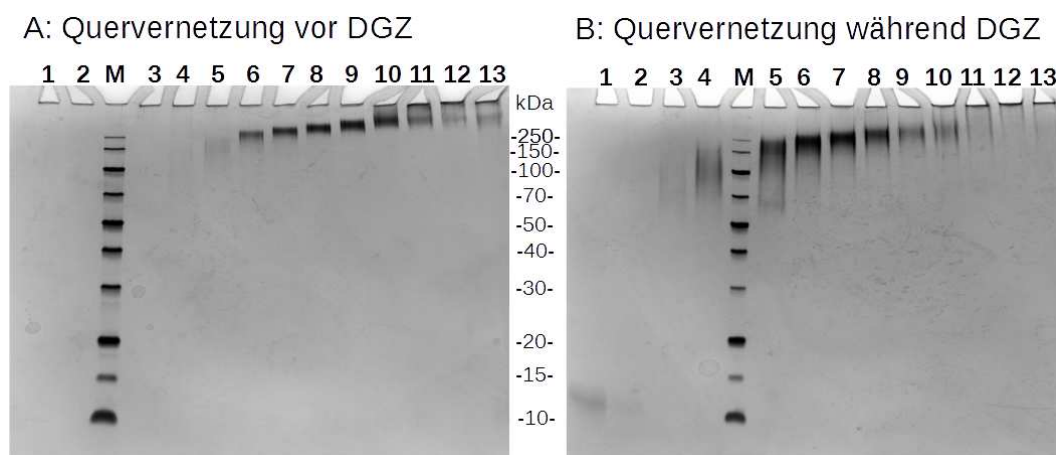


Abbildung 4.14: Vergleich der A β -Quervernetzung vor und während der DGZ. Die Zahlen über den Geltaschen stehen für die dort applizierten Fraktionen. M: Markerproteine. Zwischen den beiden Gelen sind auf Höhe der Markerproteine deren jeweilige Größe in kDa angegeben.

Nach Protokoll A (Quervernetzung des A β vor der DGZ) sind keine Banden mit Monomer-Größe (4,5 kDa) im Gel erkennbar, was dafür spricht, dass der größte Teil des A β quervernetzt wurde. In den Fraktionen 5-13 sind jeweils einzelne Banden zu erkennen, die aus quervernetzten A β -Molekülen bestehen. Fraktion 5 zeigt eine sehr schwache Bande, die etwa auf derselben Höhe wie das Markerprotein mit 150 kDa liegt. Die Bande von Fraktion 6 liegt etwa auf Höhe des 250 kDa schweren Markerproteins und in den weiteren Fraktionen zeigen die quervernetzten A β -Moleküle geringere Laufweiten als das größte Markerprotein mit 250 kDa. Alle Banden sind hier relativ schmal und deutlich abgegrenzt.

Nach Protokoll B (Quervernetzung des A β während der DGZ) sind in den Fraktionen 1 und 2 sehr schwache Banden erkennbar, die A β -Monomeren entsprechen. In den Fraktionen 3-11 sind Banden aus quervernetztem A β sichtbar, wobei die

intensivsten Banden, die vermutlich den größten Proteingehalt aufweisen, in den Fraktionen 5-8 liegen. Die Bande der Fraktion 5 liegt etwa zwischen den Laufweiten der Markerproteine mit 70 und 250 kDa, die Bande der Fraktion 6 liegt etwa auf einer Höhe mit dem Markerprotein mit 250 kDa, ist jedoch etwas breiter, umfasst also Moleküle mit einer größeren Bandbreite an Laufweiten. Die Proteine der Fraktionen 7-11 zeigten geringere Laufweiten im Gel als das Markerprotein mit 250 kDa.

Es kann nicht davon ausgegangen werden, dass die quervernetzten A β -Oligomere das gleiche Molekulargewicht haben wie Markerproteine, die in der Gel-Elektrophorese ebenso weit gelaufen sind, da das Laufverhalten der Proteine im Gel nicht nur vom Molekulargewicht des Proteins, sondern auch von der Konformation und der Fähigkeit des Proteins, negativ geladenes SDS zu binden, abhängt. Diese Eigenschaften können bei dicht gepackten A β -Oligomeren und den Markerproteinen deutlich unterschiedlich sein, da die Markerproteine vor der Gelelektrophorese durch Hitzedenaturierung und die Zugabe von SDS linearisiert werden; eine solche Linearisierung kann bei quervernetzten A β -Oligomeren nicht erfolgen.

Eine Bestimmung des Molekulargewichts von quervernetzten Oligomeren anhand des Vergleichs der Laufweiten von Oligomeren und Markerproteinen dürfte demnach sehr ungenau sein. Wenn man jedoch davon ausgeht, dass die A β -Oligomere verschiedener Fraktionen ähnliche Eigenschaften hinsichtlich ihrer Konformation und der Anlagerung von SDS aufweisen, sollten die Laufweiten mit der Masse der quervernetzten A β -Moleküle korrelieren.

Die Ergebnisse zeigen also, dass die entstehenden Moleküle aus quervernetztem A β wie geplant durch beide Varianten des Protokolls während der DGZ ihren Größen nach aufgetrennt werden und dementsprechend in den Fraktionen mit geringeren Saccharose-Konzentrationen auch die kleineren Moleküle vorliegen. Bei Quervernetzung des A β bereits vor dem Auftragen auf den Dichtegradienten entstehen größere A β -Oligomere als bei der Quervernetzung erst während der DGZ. Eine Erklärung hierfür ist, dass bei der Quervernetzung während der Vorinkubation das A β in einer höheren Konzentration vorliegt als später, wenn es während der DGZ durch das Gradientenmaterial verdünnt wird. Wenn die A β -Peptide dichter zusammenliegen, ist auch die Wahrscheinlichkeit größer, dass Peptide, die zwar nicht im selben Oligomer vorliegen, aber z. B. durch Diffusion in enge räumliche

Nähe geraten, kovalent miteinander verknüpft werden. Daraus würde resultieren, dass die vor der DGZ quervernetzten Peptide nicht unbedingt in einer oligomeren Konformation vorliegen, sondern dass die Peptide auch an zufälligen Positionen verknüpft werden.

Weil jedoch quervernetzte A β -Moleküle gewünscht sind, die möglichst in einer oligomeren Konformation vorliegen, soll für zukünftige Produktionen von stabilen Oligomeren die Variante B des Protokolls mit der Quervernetzung des A β während der Zentrifugation der Oligomere durch den Gradienten durchgeführt werden. Mit dieser Methode können Oligomere hergestellt werden, die in der SDS-PAGE ein ähnliches Laufverhalten zeigen wie die Markerproteine mit Größen zwischen 70 und 250 kDa. Die auf diese Weise hergestellten Oligomere werden im Folgenden als KK-Oligomere bezeichnet.

4.3.2.4 Reinigung der KK-Oligomere

Da Saccharose, Ethanolamin-Hydrochlorid, EDC und NHS nach der DGZ in den Fraktionen mit den KK-Oligomeren vorliegen und bei einigen der Methoden zur Charakterisierung der Oligomere das Ergebnis beeinflussen könnten, wurden diese Reagenzien im nächsten Schritt möglichst vollständig aus dem PBS entfernt. Anschließend wurde überprüft, ob die KK-Oligomere nach der Reinigung noch in der Lösung vorhanden waren.

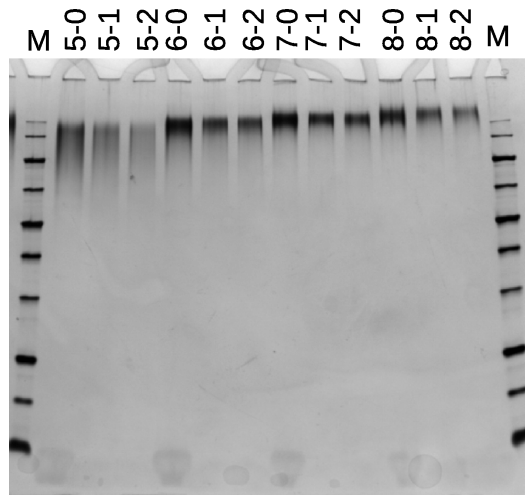
Die Proben wurden zunächst über Entsalzungssäulen (Ausschlussgrenze: 40 kDa) mit PBS gereinigt; laut Herstellerangaben werden dadurch mehr als 95 % aller 1,5 bis 2 kDa großen Moleküle entfernt. Diese gereinigten Proben wurden anschließend 3x mindestens 8 h gegen 2 l PBS dialysiert (Ausschlussgrenze: 20 kDa).

Im Anschluss wurden die Zuckerkonzentrationen in den gereinigten Proben refraktometrisch bestimmt. Dabei konnte kein messbarer Unterschied der Zuckerkonzentrationen in den gereinigten Fraktionen mit den KK-Oligomeren gegenüber reinem PBS festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Da die anderen Reagenzien im Vergleich zur Saccharose in den Fraktionen in relativ niedrigen Konzentrationen vorlagen, wird davon ausgegangen, dass auch diese Reagenzien durch die Reinigung ausreichend verdünnt wurden, um die Ergebnisse von Analyse-Methoden (wie zum Beispiel dem BCA-Assay) nicht zu beeinflussen.

Des Weiteren wurde die Anwesenheit der Oligomere in den Lösungen vor und nach den beiden Reinigungsschritten mittels SDS-PAGE und anschließender Sil-

berfärbung überprüft. Ein Foto des Gels mit den Fraktionen 5-8 jeweils vor der Reinigung, nach der Reinigung durch Entsalzungssäule und nach Dialyse ist in Abbildung 4.15 gezeigt. Wie hier zu sehen ist, werden die Banden aller Fraktionen

Abbildung 4.15: SDS-PAGE mit KK-Oligomeren aus den Fraktionen 5-8 vor und nach der Reinigung. Die Zahl vor dem Bindestrich gibt die Fraktion an, die Zahl hinter dem Bindestrich die Anzahl an Reinigungsschritten: 0) keine Reinigung der Fraktionen, 1) Fraktionen nach Aufreinigung durch Entsalzungssäulen, 2) Fraktionen nach Reinigung durch Entsalzungssäulen und Dialyse. M: Proteinmarker. Von allen Proben sind gleiche Volumina aufgetragen.



mit jedem Reinigungsschritt schwächer, die Laufweiten bleiben jedoch identisch. Bei den nicht gereinigten Fraktionen sind zusätzlich zu den Banden der Oligomere schwache Banden am unteren Ende des Gels – hervorgerufen durch A β -Monomere – zu erkennen. Bereits nach dem ersten Reinigungsschritt durch Entsalzungssäulen sind durch diese Methode keine Monomere mehr nachweisbar.

Da von jeder Probe zwar dieselben Volumina aufgetragen wurden, die Reinigungsschritte aber zu einer Verdünnung der Proben geführt haben, lassen die schwächeren Banden der Proben nach der Reinigung nicht darauf schließen, dass während der Reinigungsschritte ein großer Teil der KK-Oligomere verloren wurde. Da Silberfärbung zudem nicht zur quantitativen Bestimmung von Proteinkonzentrationen geeignet ist und ein BCA-Assay zur Ermittlung der Proteinkonzentration vor der Entfernung des NHS aus den Proben nicht möglich ist, lässt sich hier keine Aussage über die Ausbeute der Oligomere nach der Reinigung treffen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die KK-Oligomere nach der Reinigung in derselben Größe wie vorher vorliegen. Durch die Reinigung wurden Monomere, Saccharose und andere Reagenzien aus der Lösung entfernt.

4.3.2.5 Lagerungsbeständigkeit der KK-Oligomere

Die Lagerungsmöglichkeiten der KK-Oligomere wurden untersucht. Dafür wurden Aliquots der nicht gereinigten Fraktion 6 drei Wochen unter verschiedenen Bedingungen gelagert:

- bei 4°C
- bei -20°C mit einem, 3 bzw. 5 Einfrier-Auftau-Zyklen
- bei 4°C mit 0,05 % Natrium-Azid

Nach der dreiwöchigen Lagerung wurden die Proben mittels SDS-PAGE untersucht, die Proteinbanden wurden durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.16 gezeigt.

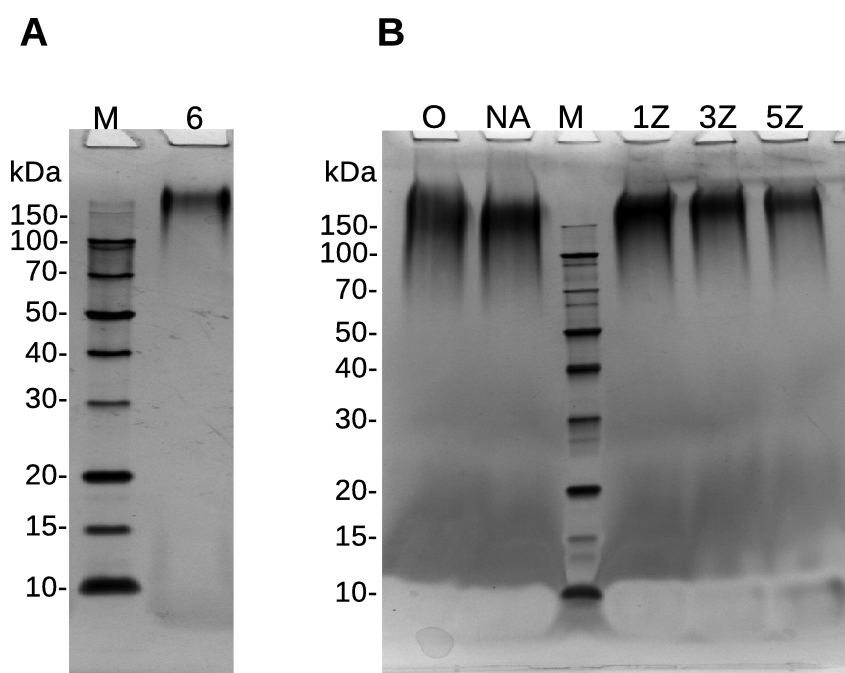


Abbildung 4.16: Experiment zur Lagerung von KK-Oligomeren. A zeigt die Fraktion 6 einen Tag nach der Produktion der Oligomere. B zeigt dieselbe Fraktion, die aliquotiert und 3 Wochen unter verschiedenen Bedingungen gelagert wurde. O: Lagerung bei 4°C; NA: nach Zusatz von 0,05 % Natrium-Azid Lagerung bei 4°C; 1Z, 3Z und 5Z: Lagerung bei -20°C mit einem, 3 oder 5 Einfrier-Auftau-Zyklen. Links neben den Gelen sind auf Höhe der Markerproteine (in Spalte M) deren jeweilige Größe in kDa angegeben.

Die linke Seite der Abbildung (A) zeigt die Fraktion 6 einen Tag nach der Herstellung der KK-Oligomere. Hier ist eine Bande am oberen Gel-Ende zu erkennen,

die den KK-Oligomeren entspricht, sowie eine nur sehr schwache Bande, die weiter gelaufen ist als das Markerprotein mit 10 kDa und A β -Monomeren entspricht. Auf der rechten Seite der Abbildung (B) ist ein Foto von dem Gel zu sehen, auf dem dieselbe Fraktion 6 aufgetragen wurde, nachdem sie unter den bereits genannten Bedingungen gelagert wurde. Es sind jeweils dieselben Volumina aufgetragen. Nach der Lagerung in Natrium-Azid (NA) bei 4 °C und einmaligem Einfrieren bei -20 °C (1Z) sind keine Unterschiede der Laufweiten gegenüber der unbehandelten bei 4 °C gelagerten Fraktion (O) zu erkennen. Vergleicht man jedoch die Proteinbanden nach einem (1Z), 3 (3Z) oder 5 (5Z) Einfrier-Auftau-Zyklen, so erkennt man, dass die Proteinbanden der KK-Oligomere weniger intensiv gefärbt sind, je öfter die Fraktion eingefroren und wieder aufgetaut wurde, die Konzentration der Oligomere scheint hier also mit zunehmender Anzahl Einfrier-Auftau-Zyklen abzunehmen. Unter keiner der getesteten Bedingungen sind kleinere Abbauprodukte der KK-Oligomere zu erkennen.

Die Fraktion, die ohne Zusatz bei 4 °C gelagert wurde, war also nach drei Wochen offenbar unverändert. Da Saccharose-Lösung jedoch als Nährmedium für viele Mikroorganismen dient und bekannt ist, dass spätestens nach vier Wochen mit bloßem Auge sichtbare Pilze in den Fraktionen wachsen, soll diese Art der Lagerung nicht genutzt werden. Die Zugabe von Natrium-Azid verhindert das Wachstum von Mikroorganismen. Weder die Zugabe von 0,05 % Natrium-Azid noch einmaliges Einfrieren der KK-Oligomere scheinen die Größe und Konzentration der Oligomere deutlich zu beeinflussen.

Da nicht bekannt ist, ob der Zusatz von Natrium-Azid in manchen Assays zur Charakterisierung der KK-Oligomere störend sein kann, sollen die stabilen Oligomere bevorzugt in Aliquots eingefroren werden.

4.3.3 Charakterisierung der KK-Oligomere

4.3.3.1 Größe und Morphologie

Um die Größe und Morphologie der KK-Oligomere zu bestimmen, wurden sie mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) analysiert.

In der TEM werden sehr dünne Proben mit Hilfe von Elektronenstrahlen abgebildet. Wenn Elektronen die Probe durchstrahlen, ändern sie ihre Bewegungsrichtung. Anhand der Elektronen, die ihre Bewegungsrichtung nicht ändern, entsteht ein Bild,

das vergrößert und detektiert werden kann.

Da biologische Proben Elektronen meist nur schwach streuen, können diese Proben zur Steigerung des Kontrasts mit Schwermetallen, zum Beispiel mit Uranylacetat, gefärbt werden. Das Uranylacetat legt sich dabei um die Partikel – die Partikel selbst erscheinen deshalb hell, die uranylacetatreiche Umgebung dunkel.

Die aufgereinigten Fraktionen 5 bis 8 wurden auf Kupfernetze aufgebracht und mit Uranylacetat (2 % w/v in Wasser) gefärbt. In Abbildung 4.17 sind TEM-Aufnahmen dieser Fraktionen nach der Färbung mit Uranylacetat gezeigt. Hier sind deutliche Unterschiede der KK-Oligomere aus den verschiedenen Fraktionen zu erkennen:

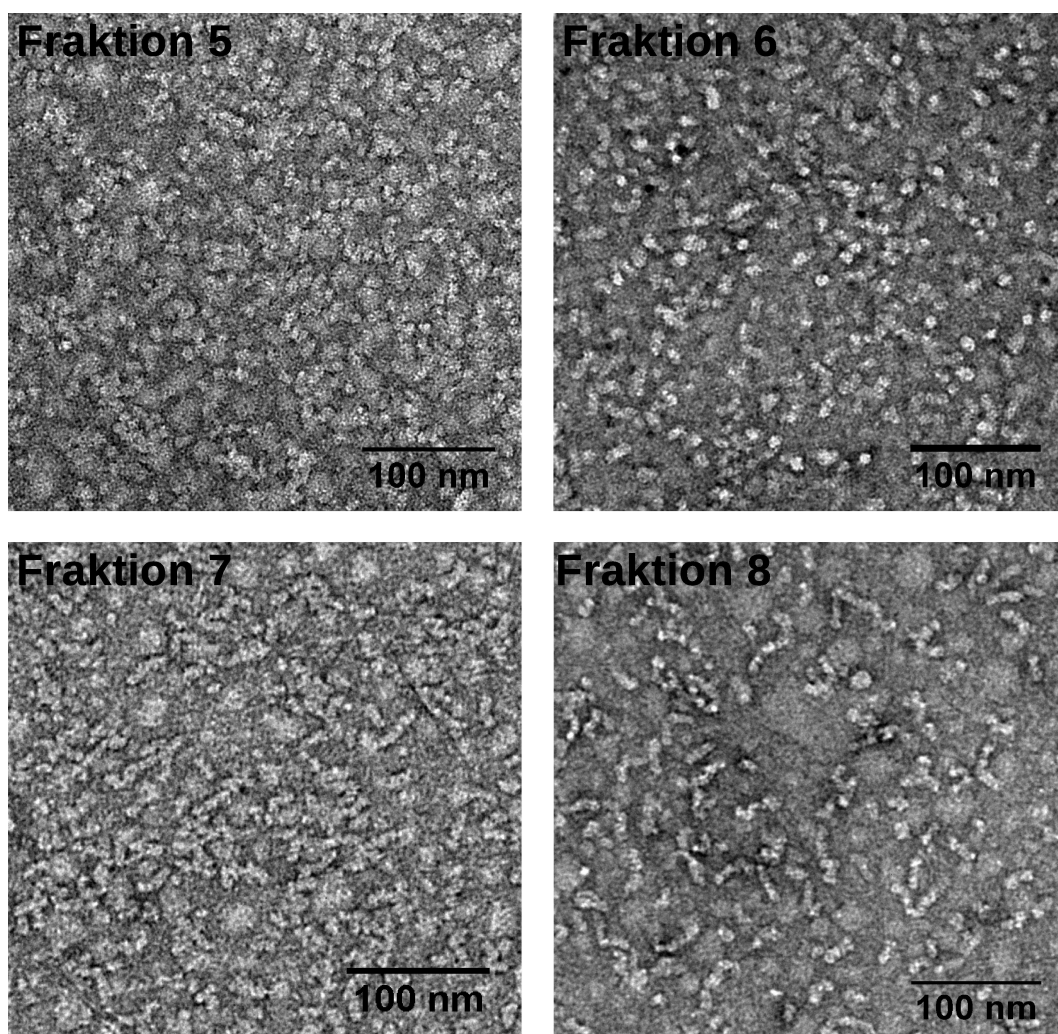


Abbildung 4.17: TEM-Aufnahmen der Fraktionen 5 bis 8 nach Färbung mit Uranylacetat.

Die TEM-Aufnahmen der Fraktionen 5 und 6 zeigen überwiegend globuläre Strukturen, die in Fraktion 6 aufgrund eines deutlicheren Kontrasts zwischen Probe und Hintergrund besser zu erkennen sind. In Fraktion 5 scheinen die Partikel kleiner zu sein als in Fraktion 6. In beiden Fraktionen scheinen die quervernetzten A β -Moleküle in einer globulären, oligomeren Form vorzuliegen.

Die TEM-Aufnahmen der Fraktionen 7 und 8 hingegen zeigen überwiegend längliche Strukturen und nur wenige runde Strukturen. Teilweise scheint es, als wären die länglichen Strukturen eine Aneinanderreihung von kugelförmigen Strukturen. Für die Beobachtung von länglichen Strukturen gibt es zwei mögliche Erklärungen: Entweder die A β -Moleküle in diesen Fraktionen sind globuläre Oligomere, wie sie auch in Fraktion 6 vorkommen, die in einer bestimmten, länglichen Anordnung kovalent oder nicht-kovalent aneinander binden. Oder die quervernetzten A β -Moleküle liegen hier überwiegend in einer proto-fibrillären oder fibrillären Form vor. In der Veröffentlichung von Serpell (2000) sind ähnlich geformte A β -Moleküle aus A β_{1-42} in einer EM-Aufnahme gezeigt, die als „fibrilläre Aggregate“ bezeichnet werden, im Gegensatz zu A β -Fibrillen, die deutlich länger sind. Diese Moleküle, wie sie in den Fraktionen 7 und 8 zu sehen sind, scheinen also auch ohne stabilisierende Behandlung zu entstehen.

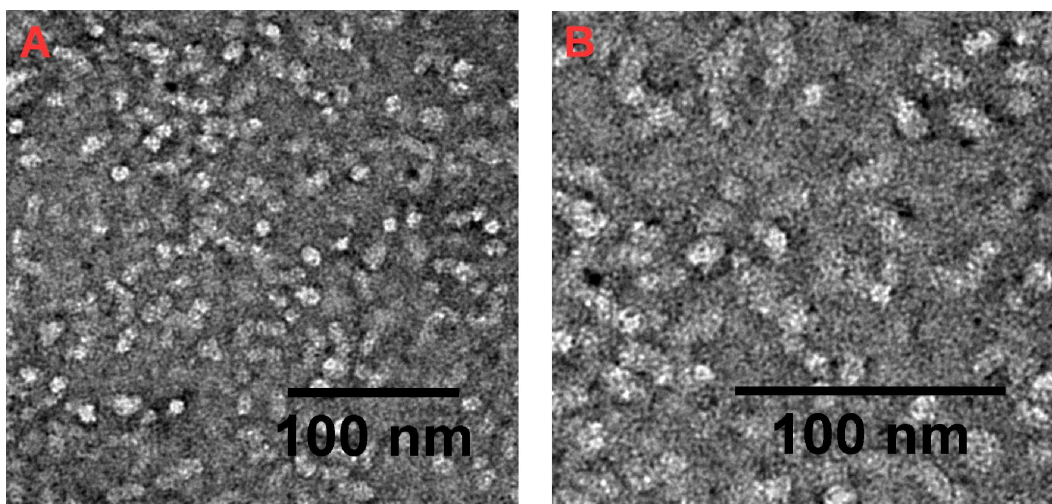


Abbildung 4.18: TEM-Aufnahme der Fraktion 6 nach Färbung mit Uranylacetat in 2 verschiedenen Vergrößerungen. A: Vergrößerung von 31,5k, B: Vergrößerung von 60k.

Kontrast und die Bildschärfe sind auf keinem der Bilder ausreichend, um eine automatische Partikelerkennung und Größenanalyse mittels ImageJ durchzuführen.

Bei den meisten Bildern ist auch eine manuelle Analyse der Partikelgrößen nicht sinnvoll, da häufig die Grenzen zwischen den Partikeln bzw. zwischen Partikel und Hintergrund nicht eindeutig zu erkennen sind. Die Bilder mit den KK-Oligomeren aus Fraktion 6 (s. auch Abb. 4.18) zeigen jedoch ausreichenden Kontrast, um einzelne Oligomere „manuell“ mit Hilfe der ImageJ-Software zu vermessen. Es wurden die Durchmesser von 25 gut erkennbaren Oligomeren bestimmt. Im Mittel maßen die Oligomere 9,6 nm im Durchmesser mit einer Standardabweichung von 1,1 nm. Der größte gemessene Durchmesser lag bei 11,2 nm, der kleinste betrug 7,2 nm.

Wenn eine durchschnittliche Dichte von Proteinen ($1,41 \text{ g/cm}^3$; Fischer et al., 2004) sowie eine Kugelform der Oligomere angenommen wird, entspricht ein Durchmesser von 9,6 nm einem Molekulargewicht von etwa 396 kDa. Nach dieser Berechnung würde ein KK-Oligomer der Fraktion 6 aus etwa 87 (bzw. unter Einbeziehung der Standardabweichungen aus 61-120) $A\beta_{1-42}$ -Peptiden bestehen.

4.3.3.2 Sedimentationsexperimente zur Bestimmung des Molekulargewichts

Im letzten Abschnitt wurde die Größe der KK-Oligomere aus Fraktion 6 mittels TEM-Aufnahmen ermittelt und unter Annahme einer für Proteine durchschnittlichen Dichte das ungefähre Molekulargewicht dieser Oligomere berechnet. In diesem Abschnitt wird beschrieben, wie das Molekulargewicht der kugelförmigen Oligomere aus den Fraktionen 5 und 6 mithilfe einer weiteren Methode näherungsweise ermittelt wurde.

Dafür wurden Proteine mit bekannten Molekulargewichten in einer DGZ aufgetrennt. Anhand der Sedimentation dieser Proteine im Vergleich zur Sedimentation der KK-Oligomere konnte anschließend anhand des Sedimentationskoeffizienten das Molekulargewicht der Oligomere näherungsweise bestimmt werden.

Die eingesetzten Proteine, ihr jeweiliges Molekulargewicht und die Aufteilung des Molekulargewichts in Untereinheiten (bei Proteinen, die aus mehreren Untereinheiten bestehen) sind in Tabelle 4.1 aufgeführt. Jedes dieser Proteine wurde mit einer Konzentration von etwa 1 mg/ml in PBS gelöst; je 10 μl dieser Proteinlösungen wurden als Probe in insgesamt 200 μl auf den Dichtegradienten geschichtet.

Die Bedingungen der DGZ und die Beschaffenheit des Gradienten waren denen zur Produktion von KK-Oligomeren identisch, davon abgesehen, dass dem Gradienten hier kein EDC und NHS zugefügt wurde.

Tabelle 4.1: In der DGZ eingesetzte Proteine und deren Molekulargewicht. Alle Proteine stammen aus Kits zur Kalibrierung von Gelfiltrations-Säulen („Gel Filtration Calibration Kit HMW/LMW“ von GE-Healthcare) und dienen als globuläre Protein-Standards.

Protein	Molekulargewicht (kDa)	Aufteilung des Molekulargewichts (im Falle mehrerer Untereinheiten)
Aprotinin	6,5	
Ribonuklease A	13,7	
Ovalbumin	44	
Conalbumin	75	
Aldolase	160	4x 40 kDa
Catalase	240	4x 60 kDa
Ferritin	440	24x 19-21 kDa

Im Anschluss an die DGZ mit den in Tabelle 4.1 aufgeführten Proteinen wurde (wie bei der Produktion von KK-Oligomeren) der Gradient von oben nach unten in 13 Fraktionen aufgeteilt und eine SDS-PAGE mit den denaturierten Proben jeder Fraktion durchgeführt.

Proteine, die aus mehreren Untereinheiten bestehen, liegen nach der Denaturierung für die SDS-PAGE in den einzelnen Untereinheiten vor, die jeweils entsprechend ihres Molekulargewichts im Gel migrieren.

Die Proteinbanden wurden mittels Silberfärbung sichtbar gemacht. Ein Foto des Gels ist in Abbildung 4.19 gezeigt.

Wie hier zu sehen ist, variiert die Bandenintensität der verschiedenen Proteine deutlich, was auf unterschiedlich hohe Konzentrationen der Proteine hindeutet. Wichtig für diesen Versuch war jedoch nicht, identische Konzentrationen der Proteine einzusetzen, sondern die Proteine zu identifizieren, deren größter Anteil in den Fraktionen 5 und 6 vorliegt.

Für Fraktion 6 ist eindeutig zu erkennen, dass Catalase – die aus vier Untereinheiten mit je 60 kDa besteht – hier die intensivste Bande hervorbringt. In der Fraktion 5 ist die Zuordnung nicht ganz eindeutig, da die Banden des Proteins Ovalbumin (44 kDa) nicht von den Banden des Proteins Aldolase (bestehend aus vier Untereinheiten mit je 40 kDa) unterschieden werden können. Es ist jedoch deutlich zu erkennen, dass Conalbumin mit einem Molekulargewicht von 75 kDa die intensivsten Banden in den Spuren mit den Fraktionen 3 und 4 hervorbringt und die intensivste Bande der Catalase (mit 240 kDa) in der Spur mit Fraktion 6 vorkommt. Deshalb kann begründet angenommen werden, dass die Aldolase, deren Molekulargewicht

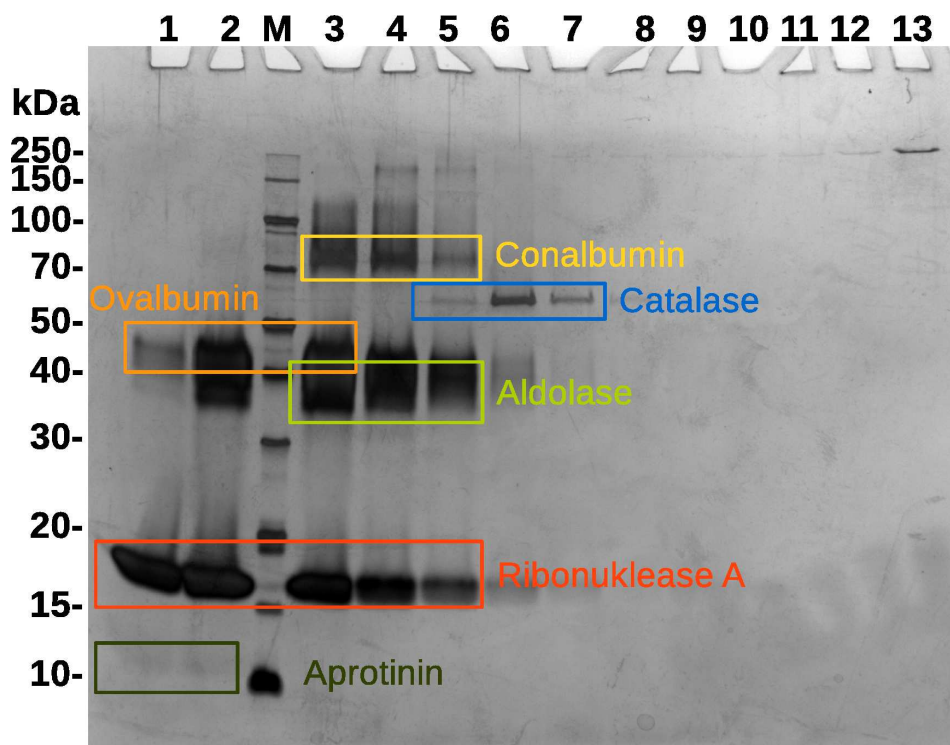


Abbildung 4.19: SDS-PAGE mit den Fraktionen 1-13 nach der DGZ mit Proteinen bekannter Molekulargewichte. Über dem Gel sind die Fraktionen angegeben, die in den entsprechenden Spuren des Gels aufgetragen wurden. M: Markerproteine. Die Molekulargewichte der jeweiligen Banden der Markerproteine sind links neben dem Gel notiert. Die Banden der Proteine, die in der DGZ als Proben eingesetzt wurden, sind farbig umrandet und in derselben Farbe mit dem Namen des Proteins beschriftet.

mit 160 kDa zwischen den Molekulargewichten der anderen beiden Proteine liegt, in den Fraktionen 4 und 5 die intensivsten Banden zeigt.

Für die annähernd kugelförmigen KK-Oligomere aus den Fraktionen 5 und 6 (s. Abschnitt 4.3.3.1) soll im Folgenden das Molekulargewicht abgeschätzt werden. Die Herleitung erfolgt zunächst beispielhaft für die Oligomere der Fraktion 6.

Da Catalase nach der DGZ in Fraktion 6 die intensivste Bande zeigt, ist bereits bekannt, dass Catalase ähnlich schnell sedimentiert wie die Oligomere aus Fraktion 6. Der Sedimentationskoeffizient dieser Moleküle, die nach der DGZ in denselben Fraktionen vorkommen, muss also ähnlich sein.

Der Sedimentationskoeffizient s berechnet sich folgendermaßen:

$$s = \frac{M(1-\bar{v}\rho)}{f_s}$$

M = Molekulargewicht
 \bar{v} = partiell-spezifisches Volumen des gelösten Stoffes
 ρ = Dichte des Lösemittels
 f_s = Reibungskoeffizient der Sedimentation

Umgestellt nach dem Molekulargewicht ergibt sich:

$$M = \frac{s \cdot f_s}{1 - \bar{v}\rho}$$

Das Molekulargewicht ist also abhängig von dem Sedimentationskoeffizienten s , von der Dichte des Lösungsmittels ρ , von dem partiell-spezifischen Volumen des gelösten Stoffes \bar{v} sowie dem Reibungskoeffizienten der Sedimentation f_s .

Da die Dichtegradien der Zentrifugation mit den Oligomeren und den Proteinen bekannter Größe identisch waren, war auch die Dichte des Lösungsmittels (ρ) in beiden DGZ identisch. Wenn als Näherung auch derselbe Sedimentationskoeffizient für Catalase und die Oligomere aus der Fraktion 6 angenommen wird, unterscheidet sich das Molekulargewicht nach der oben gezeigten Formel nur aufgrund des partiell-spezifischen Volumens und des Reibungskoeffizienten der beiden Moleküle.

Das partiell-spezifische Volumen eines Proteins ist invers zur Dichte des Proteins, die nach Fischer et al. (2004) für Proteine mit einem Molekulargewicht von über 30 kDa unabhängig von deren Beschaffenheit und Molekulargewicht im Durchschnitt als $1,41 \text{ g/cm}^3$ angenommen werden kann.

Der Reibungskoeffizient der Sedimentation ist von der Größe und der Form des Proteins abhängig. Die Bilder der TEM-Aufnahmen mit den Oligomeren aus den Fraktionen 5 und 6 (s. Abb. 4.17) zeigen, dass die Oligomere annähernd kugelförmig sind, und auch die verwendeten Proteine des Kalibrierungs-Kits können vereinfacht als globulär angenommen werden („globulärer Protein-Standard“, Herstellerangaben). Da bereits von derselben Dichte der Oligomere aus Fraktion 6 und von Catalase ausgegangen wird, ist bei ähnlicher Form der beiden Proteine auch der Reibungskoeffizient als ähnlich anzunehmen und somit der Unterschied für eine näherungsweise Bestimmung des Molekulargewichts der Oligomere vernachlässigbar.

Da also alle Parameter, von denen das Molekulargewicht in der oben dargestellten Gleichung abhängt, für Catalase und stabile Oligomere aus der Fraktion 6 als sehr ähnlich angenommen werden können, entspricht das Molekulargewicht von Catalase in etwa dem der Oligomere aus Fraktion 6. Eine ähnliche Überlegung lässt sich auch auf die KK-Oligomere aus Fraktion 5 und das Protein Aldolase übertragen.

Demnach haben die Oligomere aus Fraktion 6 etwa ein Molekulargewicht von 240 kDa, diese Masse entspricht ungefähr dem Gewicht von 53 A β ₁₋₄₂-Peptiden. Ein Vergleich der Oligomere aus Fraktion 5 mit dem Protein Aldolase würde ein Molekulargewicht von etwa 160 kDa für diese Oligomere ergeben, was etwa 35 Peptiden entspricht.

Die auf S. 71 beschriebenen Ergebnisse der SDS-PAGE mit den KK-Oligomeren, zeigen, dass die Fraktion 6 im Gel etwa so weit läuft wie das Markerprotein mit dem Molekulargewicht von 250 kDa, die Fraktion 5 etwa so weit wie das Markerprotein mit 150 kDa. Die Charakterisierungen mittels DGZ und SDS-PAGE deuten also auf ähnliche Molekulargewichte der KK-Oligomere aus den Fraktionen 5 und 6.

Die Bestimmung des Molekulargewichts anhand der in den TEM-Aufnahmen ermittelten Größe und einer Dichte der Oligomere, die als durchschnittliche Dichte von Proteinen angenommen wurde, hat ein Molekulargewicht von etwa 396 kDa ergeben, was etwa 87 A β -Peptiden entspricht. In Anbetracht der vielen getroffenen Annahmen, um das Molekulargewicht mit den verschiedenen Methoden näherungsweise zu bestimmen, ist eine solche Abweichung zu erwarten. Unter Einbeziehung der Ergebnisse anhand der TEM-Aufnahmen kann davon ausgegangen werden, dass ein KK-Oligomer der Fraktion 6 aus durchschnittlich etwa 53-87 A β -Peptiden besteht.

Durch eine Veränderung des Gradienten oder einer zweiten DGZ nach der Produktion der stabilen Oligomere wäre es sicherlich möglich, die Auftrennung der Oligomere nach ihren Größen zu optimieren, um eine geringere Streuung des Größenbereichs zu erhalten. Dies sollte durch zukünftige Experimente untersucht werden.

Nach einer Optimierung des Dichtegradienten oder einer zusätzlichen Größenauftrennung im Anschluss an die Produktion der KK-Oligomere können eventuell auch KK-Oligomere hergestellt bzw. isoliert werden, die kleiner sind als die bisherige Fraktion 5 mit einem Molekulargewicht um 160 kDa. Das würde sFIDA-Experimente zur Bestimmung der minimalen Größe von im sFIDA detektierbaren A β -Oligomeren ermöglichen.

4.3.3.3 Analyse mittels sFIDA

Vor der Analyse der KK-Oligomere (Fraktion 6, nach Aufreinigung) im sFIDA wurde die Proteinkonzentration der Probe mittels BCA-Assay bestimmt. Zur Erstellung einer Standard-Kurve wurden BSA-Lösungen eingesetzt. Es ist bekannt, dass die A β -Konzentration bei Verwendung von BSA zur Erstellung der Standard-Kurve um 40-50 % unterschätzt wird (Jan et al., 2010). Die Tatsache, dass das A β in unserem Assay quervernetzt vorliegt, könnte zu weiteren Ungenauigkeiten führen. Dennoch liefert das Ergebnis des BCA-Assays einen Hinweis, in welcher Größenordnung die Konzentration des A β liegt.

Die Konzentration des A β wurde auf 20,4 $\mu\text{g/ml}$ bestimmt. Das entspricht einer Konzentration von etwa 4,5 μM A β -Peptiden bzw. bei etwa 53 Monomeren (anhand des Sedimentationsexperiments in Abschnitt 4.3.3.2 ermittelt) pro Oligomer einer Oligomer-Konzentration von ca. 85 nM. Im Folgenden genannte Konzentrationen beziehen sich sowohl bei den KK-Oligomeren als auch bei den CB-Oligomeren auf die Oligomer-Konzentrationen.

Die KK-Oligomere wurden unverdünnt sowie in sukzessiven 10-fach-Verdünnungen bis zu einer Konzentration von 8,5 fM als Probe in den sFIDA eingesetzt. Um die sFIDA-Ergebnisse vergleichen zu können, wurden auch CB-Oligomere in Konzentrationen zwischen 100 pM und 10 fM aufgetragen; hierbei handelt es sich um den Konzentrationsbereich, in dem nach der Protokolloptimierung in Abschnitt 4.2.3 die sFIDA readouts mit den eingesetzten Konzentrationen von CB-Oligomeren korrelierten. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abbildung 4.20 gezeigt.

Die readouts der CB-Oligomere korrelieren hier nur für 100 und 10 pM mit der eingesetzten Probenkonzentration, die readouts aller geringeren Konzentrationen zeigen keinen Zusammenhang mit der Probenkonzentration.

Die readouts der KK-Oligomere zeigen zwischen 8,5 pM und 8,5 nM eine gute Korrelation mit der eingesetzten Konzentration. Der readout von 8,5 nM beträgt annähernd eine Million, hier zeigen also beinahe alle Pixel eine Intensität oberhalb des Schwellenwertes. Daher ist eine Steigerung des readouts von 8,5 nM auf 85 nM nicht möglich. Für Konzentrationen geringer als 8,5 pM können die readouts nicht mehr voneinander und von den readouts der Negativkontrolle (PBS) unterschieden werden.

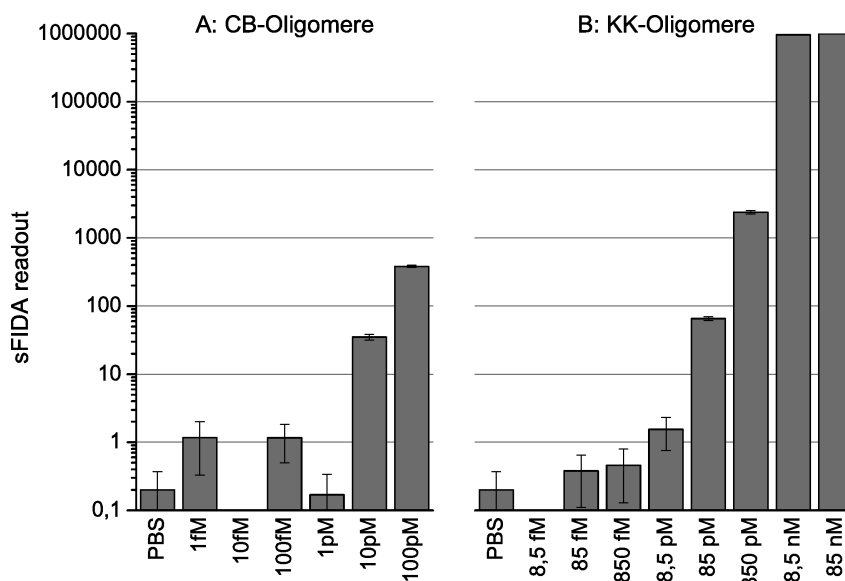


Abbildung 4.20: Vergleich der sFIDA readouts von CB- (A) und KK-Oligomeren (B). Gezeigt werden jeweils die Mittelwerte und Standardfehler über alle in die Analyse einbezogenen Bilder aus zwei Wells nach Messungen mit je 36 Bildern pro Well. Protokollversion 2 (Abweichungen: die Detektionsantikörper waren mit 3 % BSA versetzt und wurden vor der Verwendung mit 100.000 g (1 h, 4 °C) zentrifugiert; alle Waschschrirte wurden automatisch mit einem Mikroplatten-Washer durchgeführt), ZAT-Platte, verwendete Detektionsantikörper: 6E10-Atto488 und IC16-Alexa Fluor633. Schwellenwerte: 8000/8000.

Verglichen mit anderen sFIDA-Experimenten, in denen ebenfalls CB-Oligomere als Proben eingesetzt wurden, sind die sFIDA readouts in dem hier beschriebenen Versuch für hohe Probenkonzentrationen sehr niedrig und die Sensitivität des Assays deutlich geringer. Nach der Protokolloptimierung (Abschnitt 4.2) beispielsweise lag der readout für 188 pM CB-Oligomere über 100.000 (s. S. 56, Ergebnisse ohne Blocking), in diesem Versuch liegt er für 100 pM nur bei 380.

Beim Vergleich der Ergebnisse beider Oligomer-Arten muss bedacht werden, dass die KK-Oligomere etwa um einen Faktor 2-4 weniger Peptide pro Oligomer enthalten als die CB-Oligomere, und dass es sich bei der Konzentrationsangabe nur um eine recht grobe Schätzung handelt. Die readouts von CB- gegenüber KK-Oligomeren zeigen jedoch für ähnlich hohe Konzentrationen beider Oligomer-Arten ähnliche Größenordnungen und auch das Detektionslimit ist mit 10 pM für CB-Oligomere und 8,5 pM für KK-Oligomere annähernd identisch. Es ist also unwahrscheinlich, dass das insgesamt geringe Signal dadurch verursacht wurde, dass die CB-Oligomere nicht mehr intakt waren, denn auch die KK-Oligomere zeigten nicht so hohe readouts, wie es anhand der eingesetzten Konzentration und frühe-

ren sFIDA-Experimenten mit CB-Oligomeren zu erwarten wäre. Statt dessen liegt die Vermutung nahe, dass die sFIDA-Oberfläche nicht so vorlag, wie es in früheren Versuchen der Fall war.

Eine Wiederholung dieses Versuchs zeigte bei der Datenerhebung mit dem TIRF-Mikroskop eine sehr inhomogene und Artefakt-behaftete Oberfläche, was auf Probleme in der Oberflächenbeschichtung hindeutet. Eine Auswertung dieser Bilddaten würde nicht zu verwertbaren Ergebnissen führen und wurde deshalb nicht durchgeführt.

Leider ließ es der zeitliche Rahmen dieser Arbeit nicht mehr zu, den hier beschriebenen Problemen auf den Grund zu gehen und anschließend weitere sFIDA-Experimente mit den KK-Oligomeren durchzuführen.

Aus den Ergebnissen dieses Versuches lässt sich trotz aller Probleme schlussfolgern, dass die KK-Oligomere aus der Fraktion 6 mindestens ebenso sensitiv im sFIDA detektiert werden können wie die CB-Oligomere. Demnach sind trotz der Quervernetzung der A β -Peptide innerhalb eines Oligomers die Bindestellen für die hier verwendeten Antikörper zugänglich.

Die Verwendung der KK-Oligomere aus Fraktion 6 als Standardmolekül oder zur Protokolloptimierung in zukünftigen sFIDA-Experimenten scheint also möglich zu sein. Wahrscheinlich lässt sich diese Erkenntnis auch auf KK-Oligomere aus den anderen Fraktionen übertragen, was Untersuchungen zur Detektion von unterschiedlich großen Oligomeren im sFIDA ermöglichen würde.

4.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Ziel dieses Teils der Arbeit war es, stabilisierte A β -Oligomere eines möglichst definierten Größenbereichs herzustellen und zu charakterisieren. Ebenso wie die CB-Oligomere können solche stabilisierten A β -Oligomere als Standardmoleküle und zur Protokolloptimierung im sFIDA eingesetzt werden, haben aber gegenüber den CB-Oligomeren den Vorteil, dass uns umfassende Informationen über deren Herstellungsart und Eigenschaften bekannt sind.

Stabilisierte Oligomere aus A β_{1-42} wurden hergestellt, indem A β zunächst in PBS vorinkubiert wurde. Die während der Inkubation entstandenen Oligomere wurden über eine DGZ in 13 Fraktionen aufgetrennt und während der Wanderung

durch den Dichtegradienten durch EDC und NHS quervernetzt. Diese Quervernetzung der Oligomere wurde unter denaturierenden Bedingungen in einer SDS-PAGE überprüft. Dabei zeigte sich, dass die Fraktionen 5-8 deutlich im Gel erkennbare, quervernetzte Oligomere enthalten. Diese quervernetzten A β -Oligomere wurden als KK-Oligomere bezeichnet und im weiteren Verlauf der Arbeit charakterisiert.

Zur Untersuchung von Größe und Morphologie der KK-Oligomere aus den Fraktionen 5-8 wurden TEM-Messungen durchgeführt. Die resultierenden Bilder zeigten für die Fraktionen 5 und 6 kugelförmige Moleküle, für die Fraktionen 7 und 8 eher längliche Moleküle. Die Oligomere der Fraktion 5 sind kleiner als die der Fraktion 6 und die länglichen Oligomere aus Fraktion 7 kleiner als die aus Fraktion 8. Aufgrund des geringen Kontrasts und der geringen Auflösung der TEM-Bilder konnten nur die durchschnittlichen Größen der Oligomere aus Fraktion 6 bestimmt werden. Für diese Oligomere wurde ein Durchmesser von $9,6 \pm 1,1$ nm ermittelt, was unter Annahme von kugelförmigen Oligomeren und einer Dichte von $1,41 \text{ g/cm}^3$ einem Molekulargewicht von 396 kDa (unter Einbeziehung der Standardabweichung 278-543 kDa) bzw. 87 (61-120) A β -Peptiden pro Oligomer entspricht.

Um für die kugelförmigen Oligomere aus den Fraktionen 5 und 6 mit Hilfe einer weiteren Methode näherungsweise das Molekulargewicht zu bestimmen, wurde eine DGZ mit Proteinen bekannter Größe durchgeführt. Abgesehen davon, dass der Gradient für diese Zentrifugation kein EDC und NHS enthielt, waren alle Bedingungen denen zur Produktion der quervernetzten KK-Oligomere identisch. Nach der DGZ ließ sich in Fraktion 5 das Protein Aldolase nachweisen, in Fraktion 6 das Protein Catalase. Es wurden einige vereinfachende, aber begründete Annahmen getroffen, dass der Sedimentationskoeffizient, das partielle spezifische Volumen und der Reibungskoeffizient von Aldolase und den Oligomeren aus Fraktion 5 einerseits und Catalase und den Oligomeren der Fraktion 6 andererseits sehr ähnlich sind. Demnach entspricht das Molekulargewicht von den Oligomeren aus Fraktion 5 ungefähr dem der Aldolase, also 160 kDa, und das Molekulargewicht der Oligomere aus Fraktion 6 ungefähr dem von Catalase (240 kDa, entspricht etwa 53 A β -Peptiden). Diese Molekulargewichte entsprechen auch den Ergebnissen der SDS-PAGEs, wenn man davon ausgeht, dass die quervernetzten Oligomere und

Markerproteine mit etwa gleichen Molekulargewichten während der Elektrophorese gleiches Laufverhalten zeigen.

Mit den verschiedenen Methoden ergaben sich also unterschiedliche Molekulargewichte für die KK-Oligomere aus Fraktion 6, was in Anbetracht der Annahmen und Näherung zur Ermittlung des Molekulargewichts zu erwarten war. Dennoch ist das Fazit, dass die näherungsweise aus etwa 53-87 A β -Peptiden bestehenden Oligomere kleiner sind als die verwendeten CB-Oligomere.

Des Weiteren wurden die KK-Oligomere der Fraktion 6 und CB-Oligomere in verschiedenen Konzentrationen als Proben im sFIDA eingesetzt. Sowohl die Höhe der readouts als auch die Sensitivität des Assays war für beide Oligomer-Arten ähnlich, jedoch deutlich geringer als in früheren sFIDA-Experimenten mit CB-Oligomeren. Die Ursachen hierfür sind derzeit noch nicht bekannt.

Dennoch zeigte dieser Versuch, dass die KK-Oligomere mit ähnlicher Nachweisgrenze im sFIDA detektiert werden wie die CB-Oligomere; die Bindestellen für die im sFIDA verwendeten N-terminal bindenden Antikörper werden demnach durch die Quervernetzung des A β nicht blockiert. Der Einsatz der KK-Oligomere aus Fraktion 6 als Standardmolekül im sFIDA ist also möglich, vermutlich gilt das ebenfalls für KK-Oligomere aus den anderen Fraktionen.

4.4 sFIDA mit humanen Liquorproben

4.4.1 Allgemeines

Im Rahmen dieser Arbeit wurden humane Liquorproben aus drei verschiedenen Quellen im sFIDA untersucht. Mit jedem dieser Probensätze wurde eine Studie durchgeführt. Ziel der Untersuchungen war herauszufinden, ob eine Unterscheidung zwischen AD- und Kontrollgruppen anhand der sFIDA readouts möglich ist.

Die Bestimmung der Schwellenwerte für Versuche mit den humanen Liquorproben erfolgte im Allgemeinen anhand von gleichzeitig gemessenen CB-Oligomeren. Die Schwellenwerte, die eine gute Auftrennung von verschiedenen Konzentrationen der CB-Oligomere zeigten und mit denen gleichzeitig möglichst geringe Oligomerkonzentrationen von der Negativkontrolle unterschieden werden konnten, wurden auch für die Berechnung der sFIDA readouts für die Liquorproben angewandt. Eine Ausnahme stellt nur die Auswertung der Proben aus Studie 3 dar, wie an entsprechender Stelle erläutert wird.

Die Patientendaten, sFIDA readouts und – soweit bekannt – Konzentrationen bestimmter A β -Isoformen sind in den Tabellen A.1 bis A.5 im Anhang aufgeführt.

In den folgenden drei Abschnitten werden die sFIDA-Ergebnisse mit den Liquorproben aus je einer Quelle beschrieben. Die Diskussion und Interpretation der Ergebnisse erfolgt im Abschnitt 4.4.5 ab Seite 95.

4.4.2 Studie 1

Die in diesem Abschnitt untersuchten Liquorproben der Firma Biochemed wurden käuflich erworben. Über diese Proben ist weder bekannt, wie sie entnommen wurden und wie AD diagnostiziert bzw. bei den Kontrollspendern ausgeschlossen wurde, noch liegen weitere Informationen vor.

Bei den hier beschriebenen Ergebnissen handelt es sich um die readouts des sFIDA-Protokolls ohne Blocking, die bereits in Abbildung 4.9 (Abschnitt 4.2.3) dargestellt und dort mit den Ergebnissen des Protokolls mit Blocking aus demselben Experiment verglichen wurden. Da Blocking die readouts im sFIDA mit Liquorproben verringerte, sollen hier nur die Ergebnisse behandelt werden, die durch das Protokoll ohne Blocking erzielt wurden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.21 als

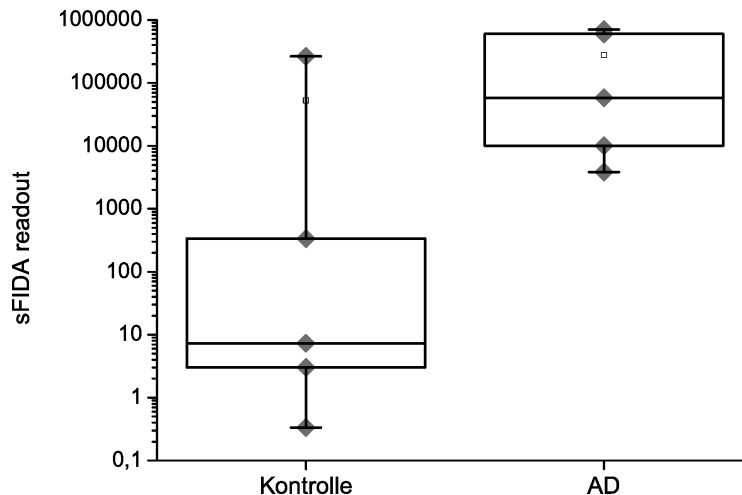


Abbildung 4.21: Studie 1: sFIDA Analyse von Liquorproben von je fünf AD- und Kontroll-Spendern (s. Tabelle A.1 im Anhang). Aufgetragen wurden je 15 µl kommerziell erworbene Proben der Firma Biochemed. Die Boxen beschreiben den Bereich zwischen 25. und 75. Perzentile, die Whiskers den Bereich zwischen 5. und 95. Perzentile. Die Daten der einzelnen Proben (Mittelwert einer Dreifachbestimmung mit 25 Bildern je Well) sind als graue Rauten dargestellt. Protokollversion 2 (Abweichungen: Schritt 1 (s. Tab. 3.9) wie in Protokollversion 1, Konzentration von CM-Dextran in Schritt 4: 20 mg/ml), ZAT-Platten, verwendete Detektionsantikörper: 6E10-Atto488 und IC16-Atto647N. Schwellenwerte (Kanal 0/Kanal 1): 6000/6000.

Boxplot dargestellt.

Hier ist erkennbar, dass die sFIDA readouts von 4 der 5 Kontroll-Proben sehr niedrig sind, sie liegen zwischen 0,3 und 350. Die Kontroll-Probe „neg316“ (s. Tabelle A.1) mit dem readout von 263.000 dagegen liegt eher im Bereich der AD-Proben, deren readouts zwischen etwa 4000 und 600.000 liegen. Die Analyse der Daten durch den Kruskal-Wallis-ANOVA ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den sFIDA readouts der AD- und Kontrollgruppe ($p=0,047$; bei Berechnung ohne neg316: $p=0,014$).

Da kaum weitere Informationen zu den Proben und Patientendaten vorliegen, konnten weitere Analysen, wie zum Beispiel Korrelationen des sFIDA readouts mit dem Alter oder den erreichten MMSE-Punktzahlen der Patienten, nicht durchgeführt werden.

4.4.3 Studie 2

Im Rahmen einer Kooperation mit Prof. Lewczuk (Universität Erlangen) standen uns umfangreich charakterisierte Liquorproben zur Verfügung. 5 Kontrollproben

und 4 AD-Proben aus diesem Probensatz wurden im Rahmen dieser Arbeit im sFIDA untersucht. Auch bei den hier gezeigten Ergebnissen handelt es sich um die readouts des sFIDA-Protokolls ohne Blocking, die bereits im Abschnitt 4.2.3 in Abbildung 4.8 dargestellt und dort mit den Ergebnissen des Protokolls mit Blocking aus demselben Experiment verglichen wurden. Da Blocking die readouts des sFIDA mit Liquorproben verringerte, sollen hier nur die Ergebnisse behandelt werden, die durch das Protokoll ohne Blocking erzielt wurden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.22 als Boxplot dargestellt.

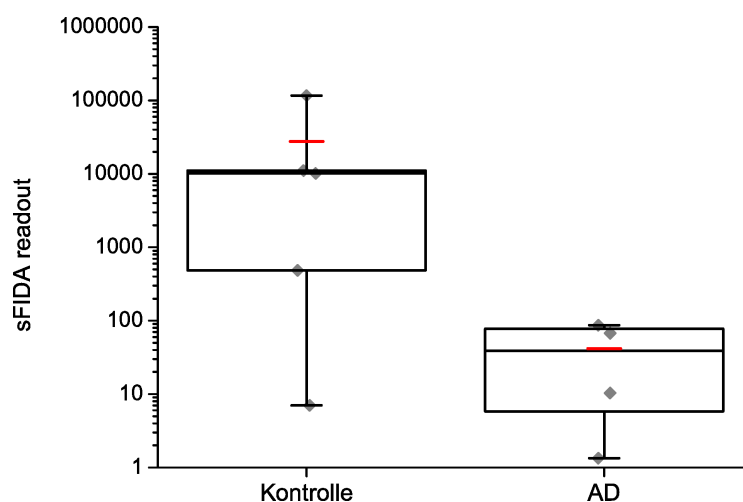


Abbildung 4.22: Studie 2: sFIDA-Analyse von Liquorproben von 5 Kontrollspendern und 4 Spendern mit wahrscheinlicher AD. Aufgetragen wurden je 15 µl der in Tabelle A.5 aufgeführten und von Prof. Lewczuk (Erlangen) zur Verfügung gestellten Proben. Die Boxen beschreiben den Bereich zwischen 25. und 75. Perzentile, die Whiskers den Bereich zwischen 5. und 95. Perzentile. Die Daten der einzelnen Proben (Mittelwert einer Dreifachbestimmung mit 25 Bildern je Well) sind als graue Rauten dargestellt. Der rote Strich beschreibt den Mittelwert. Protokollversion 2 (Abweichungen: Schritt 1 (s. Tab. 3.9) wie in Protokollversion 1, Konzentration von CM-Dextran in Schritt 4: 20 mg/ml), ZAT-Platten, verwendete Detektionsantikörper: 6E10-Atto488 und IC16-Atto647N. Schwellenwerte (Kanal 0/Kanal 1): 6000/6000.

Hier zeigt sich der Trend, dass die readouts der Kontrollproben über denen der AD-Proben liegen. Mit Ausnahme der Probe „ID-042“ (s. Tabelle A.5) liegen die readouts der Kontrollproben zwischen 480 und 120.000, die der AD-Proben zwischen 0 und 1,3. Der readout der Kontrollprobe ID-042 beträgt 7 und liegt damit eher in der Größenordnung der readouts von den AD-Proben dieses Probensatzes.

Eine signifikante Unterscheidung der beiden Gruppen mittels Kruskal-Wallis-ANOVA könnte nur festgestellt werden, wenn man das Ergebnis der Probe ID-042 nicht in die Analyse einbeziehen würde. Bei einem derart geringen Stichprobenum-

fang wie in dieser Studie ist es jedoch unzulässig, einzelne Werte als Ausreißer zu definieren und somit deren Ausschluss aus der Analyse zu rechtfertigen.

Weitere Untersuchungen (nicht gezeigt) ergaben ebenfalls keine signifikanten Korrelationen des sFIDA readouts mit den bekannten A β -Konzentrationen (vgl. Tabelle A.5).

4.4.4 Studie 3

Im Rahmen einer Kooperation standen uns 60 umfangreich charakterisierte humane Liquorproben für Untersuchungen im sFIDA zur Verfügung. 20 dieser Proben waren von Kontroll-Spendern, 20 von Patienten mit milder AD und 20 von Patienten mit moderater AD. Patienten mit milder AD zeigten geringere kognitive Defizite (höhere MMSE-Punktzahlen) als die Patienten mit moderater AD. Neben Alter, Geschlecht und MMSE-Punktzahlen der Patienten sind für diese Proben auch die Konzentrationen verschiedener A β -Isoformen im Liquor bekannt.

Die Proben wurden in Doppelbestimmung gemessen. Im Unterschied zu den anderen beschriebenen Versuchen wurde die Doppelbestimmung auf zwei verschiedenen Glasplatten durchgeführt, jede Probe wurde also in je einem Well auf beiden Platten aufgetragen. Die Platten wurden zwar parallel und möglichst gleich behandelt, sie können jedoch schon alleine aus Zeitgründen nie absolut identisch behandelt werden. Insbesondere die Messung am Mikroskop ist hier limitierend: Um eine möglichst gute Vergleichbarkeit der Messungen zu erhalten, sollten beide Platten am selben TIRF-Mikroskop gemessen werden. Dies ist zwar möglich, jedoch nicht innerhalb eines Tages. Deshalb wurden die Platten nur bis unmittelbar vor der Messung am Mikroskop parallel behandelt. Anschließend wurde Platte 2 in Puffer bei 4°C gelagert, während Platte 1 mikroskopiert wurde. Nachdem alle Proben auf Platte 1 mikroskopiert waren, wurde die Platte 2 auf Raumtemperatur gebracht, der Puffer durch Wasser ersetzt und dann ebenfalls gemessen. Diese zeitliche Verzögerung kann zu Unterschieden z.B. in der Helligkeit der Laser am TIRF führen, weshalb in diesem Experiment verschiedene Schwellenwerte zur Abgrenzung des Hintergrundsignals vom spezifischen Signal für die beiden Platten zugelassen wurden. Bei der Wahl der Schwellenwerte wurde darauf geachtet, dass die readouts der beiden Platten möglichst ähnlich waren.

In diesem Versuch wurden nicht die Schwellenwerte verwendet, wie sie für die gleichzeitig gemessenen CB-Oligomere ermittelt wurden, da diese Schwellenwerte

(Kanal 0: 8000, Kanal 1: 6500 für beide Platten) zu sehr niedrigen readouts zwischen 0 und 200 für alle Liquorproben führten womit eine signifikante Unterscheidung der verschiedenen Gruppen anhand der sFIDA readouts nicht möglich war (Daten nicht gezeigt). Stattdessen wurden deutlich geringere Schwellenwerte gewählt (Kanal 0: 2500, Kanal 1: 2500 für Platte 1; Kanal 0: 2000, Kanal 1: 2000 für Platte 2).

Abbildung 4.23 zeigt die Ergebnisse in Form eines Boxplots. Die grauen Rauten zeigen die durchschnittlichen readouts der einzelnen Proben und die roten Striche die Mittelwerte aller Proben aus der jeweiligen Gruppe. Die readouts aller drei Gruppen überlappen über einen weiten Bereich, tendenziell wurden für die Kontrollproben höhere sFIDA readouts als für die Proben aus den beiden AD-Gruppen ermittelt.

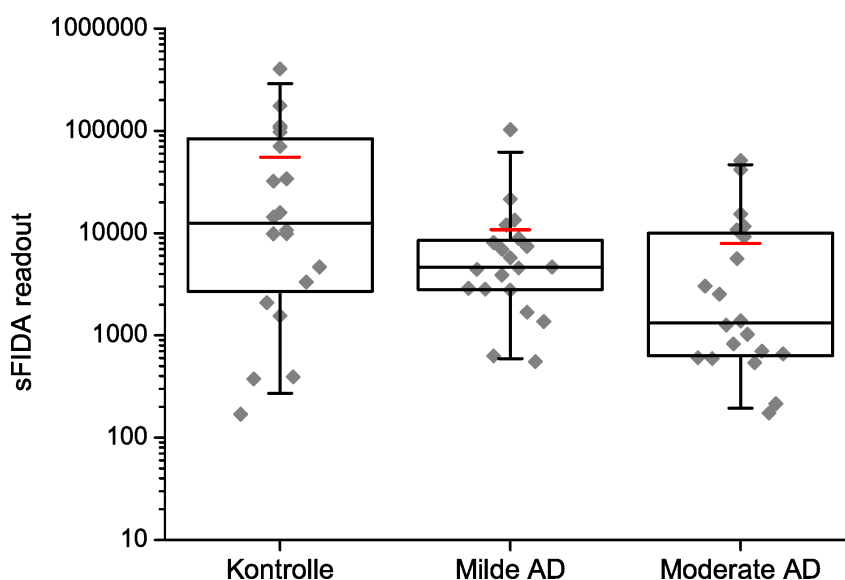


Abbildung 4.23: Studie 3: sFIDA Analyse von Liquorproben von 20 Kontrollspendern und je 20 Spendern mit milder und moderater AD. Aufgetragen wurden je 15 μ l der in den Tabellen A.2, A.3 und A.4 aufgeführten Proben. Die Box beschreibt den Bereich zwischen 25. und 75. Perzentile, die Whiskers den Bereich zwischen 5. und 95. Perzentile. Die Daten der einzelnen Proben (Mittelwert einer Dreifachbestimmung mit 36 Bildern je Well) sind als graue Rauten dargestellt. Der rote Strich beschreibt den Mittelwert. Protokollversion 2, ZAT-Platten, verwendete Detektionsantikörper: 6E10-Atto488 und IC16-Alexa Fluor633 (Stocklösungen gelagert in PBS mit 3 % BSA), abzentrifugiert mit 100.000 g bei 4 °C, 1 h. Schwellenwerte (Kanal 0/Kanal 1) Platte 1: 2500/2500, Platte 2: 2000/2000.

Ein signifikanter Unterschied konnte nur zwischen den readouts der Kontrollgruppe und der Gruppe mit moderater AD festgestellt werden. Die readouts aller Gruppen überlappen jedoch deutlich. Weitere Analysen (nicht gezeigt) ergaben

keine Korrelation der sFIDA readouts mit dem Alter der Patienten oder der Konzentration verschiedener A β -Isoformen im Liquor. Es konnte jedoch eine geringe Korrelation der sFIDA readouts mit der MMSE-Punktzahl nachgewiesen werden, wie in Abbildung 4.24 gezeigt. Je höher der sFIDA readout, desto höher ist auch die vom Liquor-Spender erzielte Punktzahl im MMSE, desto geringer also die kognitiven Defizite dieser Person. Dies ist konsistent mit der Beobachtung, dass bei diesem Probensatz die Proben der Kontrollgruppe im Mittelwert höhere readouts aufweisen als die Proben der AD-Patienten.

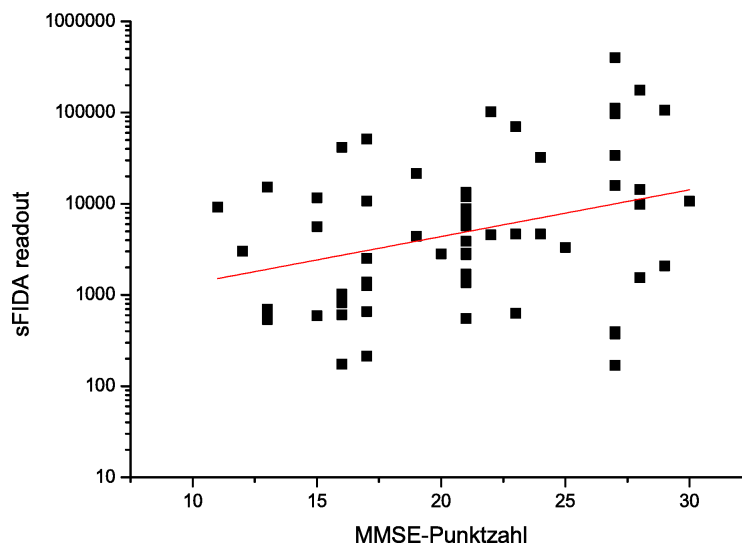


Abbildung 4.24: Korrelation von sFIDA readouts und den im MMSE-Test erreichten Punktzahlen der Liquor-Spender. Es handelt sich um dieselben Messdaten wie auch in 4.23 dargestellt. In rot: lineare Anpassung der Daten. Spearman Korrelation = 0,319; Signifikanz = 0,013.

In diesem Versuch wurden Detektionsantikörper eingesetzt, deren Stocklösungen nach der Fluorochrom-Markierung mit 3 % BSA versetzt wurden. Nach Verdünnung der Detektionsantikörper auf die Endkonzentration von 1,25 $\mu\text{g/ml}$ (entspricht etwa 8,9 nM) jedes Detektions-Antikörpers entsprach die BSA-Konzentration etwa 0,0625 %, was einer molaren Konzentration von 9,5 μM entspricht. In der eingesetzten Lösung mit den Detektionsantikörpern befinden sich also etwa 500-mal mehr BSA-Moleküle als Detektionsantikörper. Wenn – wie bereits in 4.2.3 diskutiert wurde – Albumine an A β -Oligomere aus humanem Liquor binden und dadurch die Bindestellen für die Detektionsantikörper blockieren, erklärt das, wieso die readouts der Liquorproben nach Verwendung der anhand von CB-Oligomeren ermittelten Schwellenwerte so gering (zwischen 0 und 200) waren. Durch das Sen-

ken der Schwellenwerte werden die readouts zwar größer, streuen aber für die Proben innerhalb der Gruppen auch über einen weiten Bereich von bis zu über drei Zehnerpotenzen für die Kontrollgruppe. Der Grund ist wahrscheinlich, dass wegen der erzwungen niedrigen Schwellenwerte ein überwiegender Anteil der readouts aus Hintergrundsignal besteht.

Aus diesem Grund wird auf eine weitere Diskussion der Ergebnisse dieser Proben verzichtet. Für zukünftige sFIDA-Experimente mit humanen Liquorproben sollte zunächst der Einfluss von BSA in der Lösung mit den Detektionsantikörpern untersucht werden oder völlig auf die Zugabe von Albuminen verzichtet werden.

4.4.5 Zusammenfassung und Diskussion

Während die sFIDA-Ergebnisse mit den Liquorproben aus Studie 1 höhere readouts für Proben von AD-Patienten gegenüber den Proben von gesunden Kontrollpersonen ergaben, zeigten sich bei den Ergebnissen der Studie 2 genau umgekehrte Verhältnisse der sFIDA readouts: Hier sind die readouts der Kontrollproben tendenziell höher als die der Proben von AD-Patienten.

Für die Liquorproben aus Studie 1 (kommerziell von der Firma Biochemed bezogen) ist leider nicht bekannt, wie sie entnommen wurden und wie AD bei den Patienten festgestellt bzw. bei den Kontrollspendern ausgeschlossen wurde. Im Gegensatz dazu wurden die Proben für Studie 2 (aus der Kooperation mit Prof. Lewczuk) präanalytisch identisch behandelt und alle AD-Patienten zeigten eine hohe A β -Pathologie, die mittels ELISA anhand der Liquorproben ermittelt wurde.

Wie bereits bekannt ist, haben Variablen wie die chemische Umgebung und die Temperatur einen starken Einfluss auf die Oligomerisierung von A β . Deshalb können unterschiedliche Bedingungen oder Materialien bei der Liquor-Entnahme ebenso wie die Lagerungsbedingungen nach der Entnahme die Konzentration oder Größe der Oligomere in den Proben beeinflussen. Es ist allerdings anzunehmen, dass der Einfluss dieser Faktoren auf die Oligomer-Konzentration für alle Proben aus einer Quelle – von AD-Patienten wie auch von Kontrollspendern – identisch ist und daher nicht das Verhältnis der Oligomer-Konzentrationen im Liquor von AD-Patienten und Kontrollspendern umkehrt. Es gibt derzeit also keine Erklärung für die gegensätzlichen Ergebnisse, die mit den Proben aus verschiedenen Quellen erzielt wurden.

Es wurden bereits einige Studien veröffentlicht, nach denen in Liquor von Patienten mit AD mehr A β -Oligomere nachgewiesen wurden als in Liquor von Kontrollspendern (Wang-Dietrich et al., 2013; Georganopoulou et al., 2005; Hölttä et al., 2013; Savage et al., 2014; Fukumoto et al., 2010). Daneben ist jedoch auch eine Studie bekannt, in der die Konzentration von A β -Oligomeren im Liquor von AD-Patienten gegenüber einer Kontrollgruppe reduziert war (Sancesario et al., 2012). Auch hier ist nicht bekannt, wie solch unterschiedliche Ergebnisse – allerdings auch mit ganz unterschiedlichen Assays ermittelt – zustande kamen. Eine ausführlichere Diskussion der verwendeten Methoden und Ergebnisse von anderen Studien erfolgt im Abschnitt 5.

Leider ist auch der Stichprobenumfang der beiden in Studie 1 und 2 untersuchten Proben zu gering, um eindeutige Schlüsse aus den Ergebnissen ziehen zu können.

Der Umfang der untersuchten Proben aus Studie 3 war mit insgesamt 60 Liquorproben, aufgeteilt entsprechend dem medizinischen Befund der Spender in eine Kontrollgruppe und zwei Gruppen mit unterschiedlichen Stadien der AD, sehr vielversprechend. Leider waren die readouts in diesem Versuch sehr niedrig, was im Nachhinein auf die Anwesenheit von BSA in der Lösung mit den Detektionsantikörpern zurückgeführt wurde. In diesem Fall ist zu erwarten, dass bei einer Verringerung der Schwellenwerte im Wesentlichen Hintergrundsignal analysiert wird.

Dennoch zeigten die sFIDA readouts nach der Verringerung der Schwellenwerte im Kruskal-Wallis-ANOVA, einer Rangvarianzanalyse, signifikant höhere readouts der Kontrollgruppe gegenüber der Gruppe mit moderater AD. Die readouts der beiden Gruppen überlappten allerdings über mehrere Zehnerpotenzen. Möglicherweise wäre die Trennung der Gruppen weitaus deutlicher, wenn der Versuch ohne Einsatz von BSA durchgeführt worden wäre.

Um hier Gewissheit zu erlangen, muss dieser Versuch ohne Zugabe von BSA zu den Detektionsantikörpern wiederholt werden. Dies war aus zeitlichen Gründen im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

5. Vergleich der Methoden zur Detektion von A β -Oligomeren

5.1 Vorstellung der Methoden

Aufgrund der maßgeblichen pathologischen Eigenschaften sind A β -Oligomere ein vielversprechender Biomarker für die AD. Die gegenwärtig zur Detektion von A β -Oligomeren verwendeten Methoden lassen sich grob in drei Gruppen einteilen: Viele Arbeitsgruppen verwenden ELISAs zur Detektion von A β -Oligomeren – die Oligomer-Spezifität wird hierbei durch Verwendung von oligomer-spezifischen Antikörpern oder desselben Immobilisierungs- und Detektionsantikörpers erreicht. In anderen Studien wurden A β -Oligomere mittels FRET in Kombination mit Durchflusszytometrie quantifiziert und eine weitere Arbeitsgruppe veröffentlichte Ergebnisse, die sie mit dem sogenannten „bio-barcode Assay“ erzielten. Im Folgenden sollen diese Methoden erläutert, die Ergebnisse der jeweiligen Assays vorgestellt und die Vor- und Nachteile verglichen mit dem sFIDA diskutiert werden.

Georganopoulou et al. veröffentlichten 2005 erste Ergebnisse eines „bio-barcode Assays“, bei dem DNA-markierte Nanopartikel und magnetische Beads über spezifische Antikörper A β -Oligomere in Liquor binden. Nach einer magnetischen Trennung der Komplexe aus DNA-markierten Nanopartikeln, magnetischen Beads und den Oligomeren von der restlichen Probe wird die DNA vom Komplex gelöst und ihre Konzentration bestimmt. In der Veröffentlichung wurde gezeigt, dass eingesetzte synthetische A β -Oligomere über einen Konzentrationsbereich von ca. 100 aM-500 fM (Konzentration bezogen auf Monomere) mit dem Assay-Ergebnis korrelieren und dass bei einer Studie mit insgesamt 30 humanen Liquorproben die Proben von AD-Patienten einen deutlich höheren Assay-readout zeigten als Proben

von Kontroll-Spendern.

Der größte Anteil der Veröffentlichungen über die Detektion von A β -Oligomeren in Liquor beschreibt Ergebnisse, die durch ELISAs in verschiedenen Varianten und mit unterschiedlichen Immobilisierungs- und Detektionsantikörpern erzielt wurden. Manche dieser Studien detektierten im Liquor von AD-Patienten höhere Oligomerkonzentrationen als im Liquor von Kontrollspendern (Hölttä et al., 2013; Savage et al., 2014; Fukumoto et al., 2010; Herskovits et al., 2013), andere Autoren konnten keine A β -Oligomere in Liquor nachweisen (Yang et al., 2013) oder es konnte kein Unterschied zwischen den Oligomerkonzentrationen im Liquor von AD-Patienten gegenüber Kontrollspendern festgestellt werden (Bruggink et al., 2013).

Santos et al. beschrieben 2007 eine Methode zur Detektion von A β -Oligomeren und Fibrillen mittels Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) und Durchflusszytometrie. Bei dieser Methode wird die Probe mit zwei verschiedenen, an unterschiedliche Fluorochrome gekoppelten Antikörpern inkubiert. Die Fluorochrome sind so gewählt, dass eins der Fluorochrome – das Donor-Fluorochrom – nach seiner Anregung die Energie auf das zweite Fluorochrom – das Akzeptor-Fluorochrom – übertragen kann, wenn die beiden Fluorochrome nicht weiter als 10 nm voneinander entfernt sind. Oligomere, die mit beiden Fluorochromen über A β -spezifische Antikörper markiert sind, sollten mittels Durchflusszytometrie durch die Emission des Akzeptor-Fluorochroms detektiert werden, wenn ausschließlich das Donor-Fluorochrom angeregt wird. Obwohl die beiden verwendeten Antikörper unterschiedliche Epitope von A β binden, können Monomere nicht detektiert werden, weil das resultierende FRET-Signal zu schwach ist.

2012 wurden mit dieser Methode 1:1 in Puffer verdünnte Liquorproben von 14 AD-Patienten und 12 dementen, nicht an AD leidenden Kontroll-Spendern verglichen (Santos et al., 2012). Bei diesen Messungen konnte zwar eine erhöhte Anzahl von A β -Oligomeren im Liquor von AD-Patienten gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Sancesario et al. (2012) nutzten dieselbe Methode und untersuchten damit sowohl verdünnte als auch unverdünnte Liquorproben von Kontrollspendern und Patienten mit AD. Für unverdünnte Liquorproben von AD-Patienten demonstrierten sie weniger FRET-Ereignisse gegenüber den Liquorproben von Kontrollspendern. Bei einer 1:1 Verdün-

nung mit demselben Puffer wie von Santos et al. verwendet waren die Verhältnisse jedoch umgekehrt. Die Autoren diskutieren, dass durch die Zugabe von Puffer (der Detergenzien enthält) die im Liquor von AD-Patienten nach Fukumoto et al. (2010) vermehrt enthaltenen Oligomer-Spezies mit hohem Molekulargewicht in mehrere kleinere Oligomere zerfallen, und sich das Verhältnis der Oligomer-Konzentrationen von AD-Patienten gegenüber Kontrollspendern deshalb umkehrt.

5.2 Allgemeines

Die teils widersprüchlichen Ergebnisse der oben genannten Studien resultieren möglicherweise aus unterschiedlichen Methoden, durch die verschiedene Oligomer-Spezies detektiert werden.

Neben der jeweils angewandten Methode können jedoch auch weitere Faktoren, wie zum Beispiel das bei der Probenentnahme verwendete Material, die Vorbehandlung der Proben oder in den Assays verwendete Blocking-Reagenzien, Einfluss auf die Ergebnisse haben.

So besteht bei ELISA-basierten Methoden beispielsweise die Gefahr, dass über sogenannte heterophile Antikörper, die Immunoglobuline anderer Spezies erkennen und in humanem Liquor und Plasma vorkommen, die Immobilisierungs- und Detektionsantikörper (wenn beide aus derselben Wirtsspezies stammen) verbunden werden (Sehlin et al., 2010). Bruggink et al. (2013) zeigten, dass solche heterophilen Antikörper zu falsch-positiven Ergebnissen führen können, während entsprechende Untersuchungen in anderen ELISA-Studien keinen Einfluss von heterophilen Antikörpern auf die Ergebnisse feststellen konnten (Hölttä et al., 2013; Savage et al., 2014).

Des Weiteren wurde in manchen der ELISA-Studien BSA als Blocking-Reagenz oder als Zusatz in Puffern verwendet. Wie bereits in Abschnitt 4.2.3 diskutiert wurde, besteht der Verdacht, dass die Epitope von N-terminal an A β -bindenden Detektionsantikörpern durch Albumine besetzt werden können und vorhandene A β -Oligomere in Anwesenheit von Albuminen oder nach Blocking durch albuminhaltige Lösungen nur noch zu einem geringen Anteil detektiert werden können.

In den Studien von Bruggink et al., Hölttä et al. und Herskovits et al. wurde BSA

verwendet, während in den Studien von Fukumoto et al. und Savage et al. auf die Verwendung von BSA verzichtet wurde.

Während Bruggink et al. keine signifikanten Unterschiede in den gemessenen Oligomer-Konzentrationen in Liquor von AD- und Kontrollspendern nachweisen konnten, zeigten die anderen beiden Studien, in denen BSA verwendet wurde, signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen mit $p=0,03$ (Herskovits et al., 2013) und p -Werten zwischen $<0,01$ und $<0,0001$ (Liquorproben aus 3 verschiedenen Quellen; Hölttä et al., 2013).

Die beiden Studien, in denen kein BSA verwendet wurde, erreichten für die Unterscheidung der Liquorproben von AD-Patienten und Kontrollspendern Signifikanzwerte von $p<0,0001$ (Fukumoto et al., 2010) bzw. zwischen $p<0,01$ und $p<0,0001$ mit Liquorproben aus 3 verschiedenen Kohorten (Savage et al., 2014).

Tendenziell kann man also für die beschriebenen ELISAs ohne den Einsatz von BSA geringfügig höhere Signifikanz-Werte für die Unterscheidung der Liquorproben aus AD- und Kontrollspendern feststellen. Dieser Zusammenhang ist jedoch nicht eindeutig und die mit verschiedenen ELISAs erreichten unterschiedlichen Signifikanzniveaus können ebenso gut an anderen Faktoren liegen, wie zum Beispiel den verwendeten Antikörpern, den Bedingungen bei der Probenentnahme, die Probenvorbehandlung oder weiteren Eigenschaften des ELISAs.

Die teilweise erheblich unterschiedlichen Signifikanzniveaus derselben Studie mit Liquorproben aus unterschiedlichen Quellen legen den Schluss nahe, dass vor allem die Probenentnahme eine wichtige Rolle spielt.

5.3 Minimale Größe detektierbarer Oligomere

Die aus ELISAs und dem bio-barcode Assay resultierenden Ergebnisse geben zwar über die Gesamtmenge an A β -Oligomeren Aufschluss, können jedoch keine Informationen über die Größe, Form und Zusammensetzung der Oligomere generieren. Dafür kann jedoch das detektierte Signal amplifiziert werden, was bei der Detektion von sehr geringen Oligomer-Konzentrationen einen deutlichen Vorteil haben kann.

Im sFIDA und der von Santos et al. entwickelten durchflusszytometrischen Methode hingegen können einzelne Oligomere detektiert werden. Für beide Methoden ist leider nicht bekannt, welche minimale Größe die Oligomere für eine effiziente

Detektion aufweisen müssen.

Bei der durchflusszytometrischen Methode werden zwei Fluorochrom-markierte Antikörper verwendet, die an verschiedene Epitope des A β binden. Theoretisch kann ein FRET-Signal also bereits durch ein Monomer entstehen. Die Autoren schreiben jedoch, dass das resultierende FRET-Signal eines Monomers zu schwach ist, um detektiert zu werden. Es wurde nicht beschrieben, aus wie vielen Peptiden ein Oligomer bestehen muss, um ein detektierbares FRET-Signal zu generieren.

Alle im sFIDA verwendeten Antikörper erkennen dieselbe Region des A β . Damit ein A β -Oligomer auf der Oberfläche über Antikörper immobilisiert und durch die beiden unterschiedlichen Fluorochrom-markierten Detektionsantikörper gebunden werden kann, müssen die Oligomere also mindestens aus drei Peptiden bestehen – beziehungsweise aus sechs Peptiden, wenn man davon ausgeht, dass beide Bindestellen der Antikörper dasselbe A β -Oligomer binden. Es ist jedoch nicht bekannt, ob die resultierende Signalintensität in diesem Fall ausreichen würde, um 3-6mere vom Hintergrundsignal unterscheiden zu können. Des Weiteren wird nur ein Teil der 3-6mere tatsächlich durch zwei verschiedene Detektionsantikörper gebunden. Bei der Bindung von nur wenigen Detektionsantikörpern an ein Oligomer ist es auch möglich, dass einer der beiden Detektionsantikörper mehrmals bindet und deshalb kein kolocalisiertes Signal entsteht, anhand dessen das entsprechende Oligomer detektiert werden könnte.

5.4 Nachweisgrenzen

Auch die Nachweisgrenze der verschiedenen Methoden ist ein wichtiges Charakteristikum von Assays, mit denen Moleküle in sehr geringen Konzentrationen detektiert werden sollen. Im Fall der Detektion von A β -Oligomeren ergibt sich jedoch die Problematik, dass das Signal aller Methoden nicht nur von der Konzentration der Oligomere in der zu untersuchenden Flüssigkeit abhängt, sondern auch von deren Größe.

In vielen Studien wurden Nachweisgrenzen ermittelt (vgl. Tabelle 5.1 auf Seite 103). Hierfür wurden meist Oligomere aus synthetischen A β -Molekülen hergestellt und in verschiedenen Verdünnungen als Probe in den Assay eingesetzt. Die Nachweisgrenze wird meist in Peptid-Konzentrationen ausgedrückt, die zur Herstellung

der Oligomere eingesetzt wurden. Da jedoch nicht bekannt ist, welche Oligomer-Spezies zu welchen Anteilen in Körperflüssigkeiten – zum Beispiel in Liquor – vorkommen, ist die so definierte Nachweisgrenze möglicherweise ohne Aussagekraft für die Detektion von in Liquor vorkommenden Oligomeren. Auch der Vergleich der Nachweisgrenzen verschiedener Assays ist nicht möglich, wenn zur Bestimmung der Nachweisgrenzen möglicherweise unterschiedlich große Oligomer-Spezies verwendet wurden.

Die in den Veröffentlichungen genannten Nachweisgrenzen sind in Tabelle 5.1 auf Seite 103 zusammengestellt.

5.5 Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass ein aussagefähiger Vergleich der mit verschiedenen Methoden zur Detektion von A β -Molekülen erzielten Ergebnisse kaum möglich ist, da unter Umständen verschiedene Oligomer-Spezies detektiert wurden und auch schon Unterschiede bei der Entnahme oder Vorbehandlung der Proben die Ergebnisse beeinflusst haben können.

Assays, die eine möglichst große Bandbreite an verschiedenen Oligomer-Größen detektieren und diese Größen auch unterscheiden können, sind grundsätzlich am besten geeignet. Mit Hilfe solcher Methoden könnte in Zukunft untersucht werden, ob bestimmte Oligomer-Spezies in Liquor oder anderen Körperflüssigkeiten existieren, anhand derer AD-Patienten von Patienten mit anderen Demenzen und anderen Kontrollpersonen unterschieden werden können. Sowohl der sFIDA als auch die von Santos et al. beschriebene durchflusszytometrische Methode könnten hierfür eingesetzt werden. Dafür müsste jedoch zunächst ermittelt werden, welche Oligomer-Spezies durch die jeweilige Methode detektiert werden können und ob sich Oligomere verschiedener Größen unterscheiden lassen. Eventuell müssen weitere Optimierungen der Methoden vorgenommen werden, um die Detektion kleiner Oligomere effizienter zu gestalten.

Doch nicht nur die Untersuchung unterschiedlich großer Oligomer-Spezies, sondern auch die Bestimmung der Zusammensetzung der Oligomere aus bestimmten A β -Isoformen und die Ko-Aggregation von A β mit anderen Proteinen könnte

Tabelle 5.1: Nachweisgrenzen und für deren Bestimmung verwendete A β -Spezies in den verschiedenen Assays zur Detektion von A β -Oligomeren.

Referenz	Methode	Angegebene Nachweisgrenze	Proben- volumen (μ l)	Spezies zur Bestimmung der Nachweisgrenze
Bruggink et al. (2012)	ELISA	2,2 ng/l (A β ₁₋₄₂) entspricht 480 fM monomerem A β ₁₋₄₂	100	Oligomere aus A β ₁₋₄₂
Hölttä et al. (2013)	ELISA	200 fg/ml (Dimer aus A β ₁₋₁₁ + Cystein) entspricht 127 fM monomerem A β ₁₋₁₁	100	Dimere aus A β ₁₋₁₁ mit einem Cystein am C-Terminus)
Savage et al. (2014)	ELISA	0,09 pg/ml (A β ₁₋₄₂) entspricht 20 fM monomerem A β ₁₋₄₂	100	Oligomere aus A β ₁₋₄₂
Fukumoto et al. (2010)	ELISA	10 pM oligomeres A β ₁₋₄₂ , ausgedrückt in Monomer-Konzentration	100	Oligomere aus A β ₁₋₄₂
Herskovits et al. (2013)	ELISA	nicht angegeben	75	
Georganopoulou et al. 2005	bio-barcode Assay	100 aM oligomeres A β ₁₋₄₂ , ausgedrückt in Monomer-Konzentration	10	Oligomere aus A β ₁₋₄₂
Santos et al. (2012) und Sancesario et al. (2012)	Durchflusszytometrie und FRET	Fibrillen-Präparation aus 10 pM A β ₁₋₄₂	200 bzw. 300	Fibrillen-Präparation aus A β ₁₋₄₂
vorliegende Arbeit	sFIDA	18,8 fM CB-Oligomere, entspricht 3,8 pM Monomer-Konzentration	15	CB-Oligomere aus A β ₁₋₄₂ (etwa 200 Peptide pro Oligomer)

Unterschiede zwischen A β -Oligomeren aus Körperflüssigkeiten von AD-Patienten und Kontrollspendern aufzeigen. Auch für solche Experimente ist grundsätzlich sowohl der sFIDA als auch die durchflusszytometrische Methode geeignet, da hier die Möglichkeit besteht, weitere Fluorochrom-markierte Antikörper gegen bestimmte A β -Isoformen oder andere Proteine zu verwenden und eine Auswertung auf der Ebene von einzelnen Oligomeren vorzunehmen.

A. Anhang

A.0.1 Liquorproben und Patientendaten

Tabelle A.1: Probenbezeichnungen, Patientendaten und sFIDA readouts aller in dieser Arbeit verwendeten Liquorproben aus Studie 1. Die Proben wurden kommerziell von der Firma Biochemed bezogen. Abkürzungen: AD=Alzheimersche Demenz; n.b.=nicht bekannt.

Bezeichnung	Gruppe	Lot-Nr.	Geschlecht	Alter (Jahre)	sFIDA readout
pos0367	AD	0108-105-003667	n.b.	n.b.	9993
pos4352	AD	0105-105-04352	n.b.	n.b.	3821
pos 4367	AD	0105-105-04367	n.b.	n.b.	706848
pos365	AD	0108-105-00365	n.b.	n.b.	57766
pos378	AD	0108-105-00378	n.b.	n.b.	602054
neg218	Kontrolle	BC 120521-8	männlich	89	7,3
neg277	Kontrolle	BC 120727-7	weiblich	78	334,6
neg786	Kontrolle	BCSR 41786	weiblich	76	3
neg275	Kontrolle	BC 120727-5	weiblich	84	0,3
neg316	Kontrolle	BC 1205316	männlich	87	263304

Tabelle A.2: Probenbezeichnungen, Patientendaten und sFIDA readouts der Liquorproben von Kontrollspendern aus Studie 3

Pat.-Nr	MMSE Punktzahl	Alter (Jahre)	Geschlecht	A β (pg/ml)				Plex	sFIDA readouts		
				A β ^(x-38)	A β ^(x-40)	A β ^(x-42)	A β ⁽¹⁻⁴²⁾		Platte 1	Platte 2	MW
1869	28	59,8	w	3133,86	7099,83	899,19	1236	1274	1826	1550	
2092	29	64,4	m	2027,88	4950,53	386,46	676	345	3839	2092	
2434	27	59,9	m	3455,39	7362,14	978,16	980	45	742	394	
2509	28	58,6	m	2149,55	4731,35	395,63	559	8967	10728	9847	
2650	30	59,0	w	3613,61	7998,06	917,88	879	6456	14925	10690	
2672	27	58,1	m	2959,70	6633,93	840,47	786	35878	31966	33922	
2711	27	60,3	w	1679,01	4253,51	496,66	983	548886	254162	401524	
2857	27	59,3	w	4102,42	8533,04	906,22	854	107874	86801	97338	
2922	27	56,0	m	2178,00	5398,00	609,00	868	96	654	375	
2942	28	57,7	m	3040,00	6231,00	868,00	1080	56299	296194	176247	
2952	28	58,4	m	1594,00	4307,00	519,00	882	19321	339	9830	
2985	23	62,7	m	2444,00	5262,00	641,00	932	47298	93336	70317	
3113	27	63,3	w	2847,00	6455,00	293,00	400	75851	147067	111459	
3583	25	58,1	m	3144,00	7968,00	1042,00	1376	3576	3067	3321	
3590	27	64,9	m	2665,00	6314,00	553,00	888	165	173	169	
3599	29	63,0	w	2874,00	6630,00	788,00	1306	1838	211131	106485	
3619	28	59,3	w	1750,00	4157,00	509,00	955	16178	12605	14391	
4102	24	63,0	m	3278,00	7519,00	813,00	1043	30289	34220	32254	
4143	27	56,3	m	3298,00	7136,00	925,00	1305	18004	13699	15852	
4208	24	61,3	m	4615,00	8285,00	493,00	661	8054	1246	4650	

Tabelle A.3: Probenbezeichnungen, Patientendaten und sFIDA readouts der Liquorproben von Spendern mit milder AD aus Studie 3

Pat.- Nr	MMSE Punktzahl	Alter (Jahre)	Ge- schlecht	$A\beta_{(x-38)}$ (pg/ml)	$A\beta_{(x-40)}$ (pg/ml)	$A\beta_{(x-42)}$ (pg/ml)	$A\beta_{(1-42)}$ (pg/ml)	sFIDA readouts		
								Platte 1	Platte 2	MW
1896	21	64,3	m	3115,18	7208,78	503,24	768	539	5020	2780
2184	21	62,0	w	2857,79	6232,81	278,20	545	6190	5271	5730
2226	21	64,5	m	2550,34	5816,20	245,28	334	3029	4726	3878
2295	22	63,5	m	1327,37	3660,46	223,18	353	7920	1222	4571
2569	21	55,2	w	2310,58	5387,54	319,28	443	7934	5958	6946
2607	23	58,3	m	3391,73	6873,88	400,58	582	749	512	630
2622	21	62,3	m	2537,17	6059,02	361,37	394	6281	11390	8835
2788	21	59,0	m	2629,16	5999,44	297,19	477	1856	1523	1689
2807	20	65,5	m	3270,82	6741,85	331,26	453	5290	382	2836
2872	21	64,4	w	4189,00	8509,00	461,00	506	1577	14654	8116
3097	21	56,0	w	2324,00	5403,00	282,00	437	642	466	554
3574	21	59,9	w	2799,00	6116,00	348,00	612	11519	3346	7433
3660	21	62,4	w	1808,00	4097,00	281,00	648	25767	991	13379
3891	19	59,6	w	3335,00	7315,00	396,00	611	38109	4890	21499
4186	19	61,6	m	2455,00	5779,00	379,00	588	4696	4107	4401
4240	22	62,4	m	2262,00	4671,00	249,00	451	81058	123597	102328
4258	21	57,8	m	2146,00	5079,00	337,00	523	1652	22232	11942
4303	21	62,3	m	3303,00	6843,00	378,00	569	2638	101	1369
4320	21	58,3	m	3646,00	7395,00	282,00	451	5528	261	2895
4345	23	57,6	w	2163,00	4908,00	295,00	493	9209	100	4654

Tabelle A.4: Probenbezeichnungen, Patientendaten und sFIDA readouts der Liquorproben von Spendern mit moderater AD aus Studie 3

Pat.-Nr	MMSE Punktzahl	Alter (Jahre)	Geschlecht	A β (pg/ml)				Plex	sFIDA readouts		
				A β ^(x-38)	A β ^(x-40)	A β ^(x-42)	A β ⁽¹⁻⁴²⁾		Platte 1	Platte 2	MW
1721	17	62,4	m	2243,29	5636,01	381,72	456	1028	1736	1382	
1984	11	60,9	w	1355,49	3698,90	263,84	388	439	17939	9189	
2172	16	58,6	m	1653,91	4582,11	349,58	596	1123	529	826	
2234	16	60,1	m	3422,21	7618,92	347,46	423	756	1292	1024	
2293	15	65,4	w	1084,53	3016,85	180,58	257	-	11641	11641	
2326	17	55,8	m	2610,78	6198,14	307,46	393	689	1839	1264	
2523	13	63,0	m	1640,26	3841,28	214,77	319	576	500	538	
2524	17	62,4	w	1628,29	3968,67	210,09	296	1040	3995	2518	
2531	13	55,42	w	2069,79	4664,28	256,36	339	308	1094	701	
2557	15	63,1	m	1771,31	4203,43	226,27	361	792	393	593	
2570	15	62,9	w	4407,73	8378,88	328,53	360	1496	9749	5623	
2644	13	60,3	w	3347,32	7113,13	322,66	356	9560	21088	15324	
2867	16	63,5	m	1749,14	4270,56	178,83	327	130	218	174	
2876	16	55,5	w	2558,00	5577,00	365,00	449	2070	81223	41647	
3298	12	60,6	w	3016,00	6174,00	371,00	532	2149	3894	3021	
3324	17	58,6	m	1940,00	4026,00	300,00	557	160	267	214	
3339	16	56,7	w	3169,00	7620,00	389,00	470	168	1044	606	
4029	17	56,4	m	1952,00	4290,00	316,00	554	93612	9164	51388	
4137	17	65,4	m	1562,00	3945,00	306,00	552	61	1260	660	
4272	17	60,7	w	2554,00	5695,00	402,00	596	7481	14023	10752	

Tabelle A.5: Probenbezeichnungen, Patientendaten und sFIDA readouts der Liquorproben aus Studie 2. Diese Proben stammen aus einer Kooperation mit Prof. Lewczuk (Erlangen). Abkürzungen: AD=Alzheimersche Demenz; LKS=leichte kognitive Störungen

Spender Nummer	klin. Diagnose	$A\beta_{1-40}$ (IBL)	$A\beta_{1-40}/A\beta_{1-42}$ (IBL/Innx)	$A\beta_{1-42}$ (Innx)	sFIDA readout	$A\beta_{1-40} + A\beta_{1-42}$
ID-040	nicht dement	19719	0,049	957	116522	20676
ID-042	nicht dement	18279	0,104	1900	7	20179
ID-049	nicht dement	8757	0,18	1580	11119.67	10337
ID-076	nicht dement	18831	0,077	1451	10111.33	20282
ID-009	nicht dement	n.b.	n.b.	1108	4.843.333	1108
ID-105	AD	22353	0,026	588	6.766.667	22941
ID-234	AD	15104	0,039	587	1.033.333	15691
ID-047	AD	8757	0,068	594	1.333.333	9351
ID-057	LKS	n.b.	n.b.	641	41	641
ID-087	AD	23719	0,027	632	8.666.667	24351

Literaturverzeichnis

- Aguzzi, A. (2008). Unraveling prion strains with cell biology and organic chemistry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(1):11–12.
- Alzheimer, A. (1911). Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters. *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie*, 4(1):356–385.
- Alzheimer's Association (2014). 2014 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, 10(2):e47 – e92.
- Andreasen, N., Minthon, L., Davidsson, P., Vanmechelen, E., Vanderstichele, H., Winblad, B., und Blennow, K. (2001). Evaluation of CSF-tau and CSF-A β 42 as diagnostic markers for Alzheimer disease in clinical practice. *Archives of Neurology*, 58(3):373–379.
- Arai, Y. und Nagai, T. (2013). Extensive use of FRET in biological imaging. *Microscopy*, page dft037.
- Bailey, J. A., Maloney, B., Ge, Y.-W., und Lahiri, D. K. (2011). Functional activity of the novel Alzheimer's amyloid β -peptide interacting domain (A β ID) in the APP and BACE1 promoter sequences and implications in activating apoptotic genes and in amyloidogenesis. *Gene*, 488(1):13–22.
- Ballard, C., Gauthier, S., Corbett, A., Brayne, C., Aarsland, D., und Jones, E. (2011). Alzheimer's disease. *Lancet*, 377(9770):1019–1031.
- Barcelo, A. A. R., Gonzalez-Velasquez, F. J., und Moss, M. A. (2009). Soluble aggregates of the amyloid- β peptide are trapped by serum albumin to enhance amyloid- β activation of endothelial cells. *Journal of biological engineering*, 3(1):5.
- Barrow, C. J. und Zagorski, M. G. (1991). Solution structures of beta peptide and its constituent fragments: relation to amyloid deposition. *Science*, 253(5016):179–182.
- Beach, T. G., Monsell, S. E., Phillips, L. E., und Kukull, W. (2012). Accuracy of the Clinical Diagnosis of Alzheimer Disease at National Institute on Aging Alzheimer's Disease Centers, 2005–2010. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 71(4):266.

- Benilova, I., Karran, E., und De Strooper, B. (2012). The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat Neurosci*, 15(3):349–357.
- Bieschke, J., Giese, A., Schulz-Schaeffer, W., Zerr, I., Poser, S., Eigen, M., und Kretzschmar, H. (2000). Ultrasensitive detection of pathological prion protein aggregates by dual-color scanning for intensely fluorescent targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(10):5468–5473.
- Birkmann, E., Henke, F., Weinmann, N., Dumpitak, C., Groschup, M., Funke, A., Willbold, D., und Riesner, D. (2007). Counting of single prion particles bound to a capture-antibody surface (surface-FIDA). *Vet Microbiol*, 123(4):294–304.
- Birkmann, E., Schäfer, O., Weinmann, N., Dumpitak, C., Beekes, M., Jackman, R., Thorne, L., und Riesner, D. (2006). Detection of prion particles in samples of BSE and scrapie by fluorescence correlation spectroscopy without proteinase K digestion. *Biological chemistry*, 387(1):95–102.
- Blennow, K. (2004). Cerebrospinal fluid protein biomarkers for Alzheimer's disease. *NeuroRx*, 1(2):213–225.
- Blennow, K., Hampel, H., Weiner, M., und Zetterberg, H. (2010). Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*, 6(3):131–144.
- Bohrmann, B., Tjernberg, L., Kuner, P., Poli, S., Levet-Trafit, B., Näslund, J., Richards, G., Huber, W., Döbeli, H., und Nordstedt, C. (1999). Endogenous proteins controlling amyloid β -peptide polymerization possible implications for β -amyloid formation in the central nervous system and in peripheral tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 274(23):15990–15995.
- Britschgi, M., Olin, C., Johns, H., Takeda-Uchimura, Y., LeMieux, M., Rufibach, K., Rajadas, J., Zhang, H., Tomooka, B., Robinson, W., et al. (2009). Neuroprotective natural antibodies to assemblies of amyloidogenic peptides decrease with normal aging and advancing Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(29):12145–12150.
- Bruggink, K. A., Jongbloed, W., Biemans, E. A. L. M., Veerhuis, R., Claassen, J. A. H. R., Kuiperij, H. B., und Verbeek, M. M. (2013). Amyloid- β oligomer detection by ELISA in cerebrospinal fluid and brain tissue. *Anal Biochem*, 433(2):112–120.
- Bruggink, K. A., Müller, M., Kuiperij, H. B., und Verbeek, M. M. (2012). Methods for analysis of amyloid- β aggregates. *J Alzheimers Dis*, 28(4):735–758.
- Cleary, J. P., Walsh, D. M., Hofmeister, J. J., Shankar, G. M., Kuskowski, M. A., Selkoe, D. J., und Ashe, K. H. (2004). Natural oligomers of the amyloid- β protein specifically disrupt cognitive function. *Nature neuroscience*, 8(1):79–84.
- de la Monte, S. M. (1989). Quantitation of cerebral atrophy in preclinical and end-stage alzheimer's disease. *Annals of neurology*, 25(5):450–459.

- Defelice, F. G. und Ferreira, S. T. (2002). Physiopathological modulators of amyloid aggregation and novel pharmacological approaches in Alzheimer's disease. *An Acad Bras Cienc*, 74(2):265–284.
- Deisenhammer, F., Bartos, A., Egg, R., Gilhus, N., Giovannoni, G., Rauer, S., Sellebjerg, F., und Tmani, H. (2010). Routine cerebrospinal fluid (CSF) analysis. *European handbook of neurological management, 2nd ed. Oxford: Blackwell Publishing Ltd*, pages 5–17.
- Dickson, T. und Vickers, J. (2001). The morphological phenotype of β -amyloid plaques and associated neuritic changes in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 105(1):99–107.
- Doecke, J. D., Laws, S. M., Faux, N. G., Wilson, W., Burnham, S. C., Lam, C.-P., Mondal, A., Bedo, J., Bush, A. I., Brown, B., et al. (2012). Blood-based protein biomarkers for diagnosis of Alzheimer disease. *Archives of neurology*, 69(10):1318–1325.
- Eisele, Y. S., Bolmont, T., Heikenwalder, M., Langer, F., Jacobson, L. H., Yan, Z.-X., Roth, K., Aguzzi, A., Staufenbiel, M., Walker, L. C., und Jucker, M. (2009). Induction of cerebral β -amyloidosis: intracerebral versus systemic A β inoculation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(31):12926–12931.
- Eisele, Y. S., Obermüller, U., Heilbronner, G., Baumann, F., Kaeser, S. A., Wolburg, H., Walker, L. C., Staufenbiel, M., Heikenwalder, M., und Jucker, M. (2010). Peripherally applied A β -containing inoculates induce cerebral β -amyloidosis. *Science*, 330(6006):980–982.
- El-Agnaf, O., Mahil, D. S., Patel, B. P., und Austen, B. M. (2000). Oligomerization and toxicity of β -amyloid-42 implicated in Alzheimer's disease. *Biochemical and biophysical research communications*, 273(3):1003–1007.
- Esch, F. S., Keim, P. S., Beattie, E. C., Blacher, R. W., Culwell, A. R., Oltersdorf, T., McClure, D., und Ward, P. J. (1990). Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science*, 248(4959):1122–1124.
- Fagan, A. M., Mintun, M. A., Mach, R. H., Lee, S.-Y., Dence, C. S., Shah, A. R., LaRossa, G. N., Spinner, M. L., Klunk, W. E., Mathis, C. A., et al. (2006). Inverse relation between in vivo amyloid imaging load and cerebrospinal fluid A β 42 in humans. *Annals of neurology*, 59(3):512–519.
- Ferri, C. P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., Hall, K., Hasegawa, K., Hendrie, H., Huang, Y., Jorm, A., Mathers, C., Menezes, P. R., Rimmer, E., Sczufca, M., und Alzheimer's Disease International (2005). Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*, 366(9503):2112–2117.
- Finder, V. H. und Glockshuber, R. (2007). Amyloid- β aggregation. *Neurodegener Dis*, 4(1):13–27.
- Fischer, H., Polikarpov, I., und Craievich, A. F. (2004). Average protein density is a molecular-weight-dependent function. *Protein Science*, 13(10):2825–2828.
- Folstein, M. F., Folstein, S. E., und McHugh, P. R. (1975). "mini-mental state": a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *Journal of psychiatric research*, 12(3):189–198.

- Fox, N. C., Cousens, S., Scahill, R., Harvey, R. J., and Rossor, M. N. (2000). Using serial registered brain magnetic resonance imaging to measure disease progression in Alzheimer disease: power calculations and estimates of sample size to detect treatment effects. *Archives of Neurology*, 57(3):339–344.
- Friedrich, R. P., Tepper, K., Rönicke, R., Soom, M., Westermann, M., Reymann, K., Kaether, C., and Fändrich, M. (2010). Mechanism of amyloid plaque formation suggests an intracellular basis of $\text{A}\beta$ pathogenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(5):1942–1947.
- Frisoni, G. B., Fox, N. C., Jack, C. R., Scheltens, P., and Thompson, P. M. (2010). The clinical use of structural MRI in Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*, 6(2):67–77.
- Fukumoto, H., Tokuda, T., Kasai, T., Ishigami, N., Hidaka, H., Kondo, M., Allsop, D., and Nakagawa, M. (2010). High-molecular-weight β -amyloid oligomers are elevated in cerebrospinal fluid of Alzheimer patients. *The FASEB Journal*, 24(8):2716–2726.
- Funke, S. A., Birkmann, E., Henke, F., Görtz, P., Lange-Asschenfeldt, C., Riesner, D., and Willbold, D. (2007). Single particle detection of $\text{A}\beta$ aggregates associated with Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 364(4):902–907.
- Funke, S. A., Birkmann, E., Henke, F., Görtz, P., Lange-Asschenfeldt, C., Riesner, D., and Willbold, D. (2008). An ultrasensitive assay for diagnosis of Alzheimer's disease. *Rejuvenation Res*, 11(2):315–318.
- Funke, S. A., Wang, L., Birkmann, E., and Willbold, D. (2010). Single-particle detection system for $\text{A}\beta$ aggregates: adaptation of surface-fluorescence intensity distribution analysis to laser scanning microscopy. *Rejuvenation Res*, 13(2-3):206–209.
- Geekiyana, H., Jicha, G. A., Nelson, P. T., and Chan, C. (2012). Blood serum miRNA: non-invasive biomarkers for Alzheimer's disease. *Experimental neurology*, 235(2):491–496.
- Georganopoulou, D. G., Chang, L., Nam, J.-M., Thaxton, C. S., Mufson, E. J., Klein, W. L., and Mirkin, C. A. (2005). Nanoparticle-based detection in cerebral spinal fluid of a soluble pathogenic biomarker for Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(7):2273–2276.
- Glennner, G. G. and Wong, C. W. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and biophysical research communications*, 120(3):885–890.
- Golde, T. E., Schneider, L. S., and Koo, E. H. (2011). Anti- $\text{A}\beta$ therapeutics in Alzheimer's disease: the need for a paradigm shift. *Neuron*, 69(2):203–213.
- Goldmann, W. (2008). Prp genetics in ruminant transmissible spongiform encephalopathies. *Veterinary research*, 39(4):1–14.

- Gordon, E. (1999). Brain imaging technologies: how, what, when and why? *Australian and New Zealand journal of psychiatry*, 33(2):187–196.
- Grady, C. L., McIntosh, A. R., Beig, S., Keightley, M. L., Burian, H., und Black, S. E. (2003). Evidence from functional neuroimaging of a compensatory prefrontal network in Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience*, 23(3):986–993.
- Greicius, M. D., Srivastava, G., Reiss, A. L., und Menon, V. (2004). Default-mode network activity distinguishes Alzheimer's disease from healthy aging: evidence from functional MRI. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(13):4637–4642.
- Grön, G., Bittner, D., Schmitz, B., Wunderlich, A. P., und Riepe, M. W. (2002). Subjective memory complaints: objective neural markers in patients with Alzheimer's disease and major depressive disorder. *Annals of neurology*, 51(4):491–498.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y.-C., Quinlan, M., Wisniewski, H. M., und Binder, L. I. (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(13):4913–4917.
- Haass, C., Kaether, C., Thinakaran, G., und Sisodia, S. (2012). Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(5):a006270.
- Haass, C., Schlossmacher, M. G., Hung, A. Y., Vigo-Pelfrey, C., Mellon, A., Ostaszewski, B. L., Lieberburg, I., Koo, E. H., Schenk, D., Teplow, D. B., et al. (1992). Amyloid β -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature*, 359(6393):322–325.
- Haass, C. und Selkoe, D. J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the alzheimer's amyloid β -peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(2):101–112.
- Hempel, H., Buerger, K., Zinkowski, R., Teipel, S. J., Goernitz, A., Andreasen, N., Sjoegren, M., DeBernardis, J., Kerkman, D., Ishiguro, K., et al. (2004). Measurement of Phosphorylated Tau Epitopes in the Differential Diagnosis of Alzheimer Disease: A Comparative Cerebrospinal Fluid Study. *Archives of general psychiatry*, 61(1):95–02.
- Hempel, H., Frank, R., Broich, K., Teipel, S. J., Katz, R. G., Hardy, J., Herholz, K., Bokde, A. L. W., Jessen, F., Hoessler, Y. C., Sanhai, W. R., Zetterberg, H., Woodcock, J., und Blennow, K. (2010). Biomarkers for Alzheimer's disease: academic, industry and regulatory perspectives. *Nat Rev Drug Discov*, 9(7):560–574.
- Hansson, O., Zetterberg, H., Buchhave, P., Londos, E., Blennow, K., und Minthon, L. (2006). Association between CSF biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a follow-up study. *Lancet Neurol*, 5(3):228–234.
- Hardy, J. und Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297(5580):353–356.

- Hardy, J. A. und Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*.
- Harigaya, Y., Saido, T. C., Eckman, C. B., Prada, C.-M., Shoji, M., und Younkin, S. G. (2000). Amyloid β protein starting pyroglutamate at position 3 is a major component of the amyloid deposits in the Alzheimer's disease brain. *Biochemical and biophysical research communications*, 276(2):422–427.
- Harper, J. D., Lieber, C. M., und Lansbury Jr, P. T. (1997). Atomic force microscopic imaging of seeded fibril formation and fibril branching by the Alzheimer's disease amyloid- β protein. *Chemistry & biology*, 4(12):951–959.
- Hartmann, T., Bieger, S. C., Brühl, B., Tienari, P. J., Ida, N., Allsop, D., Roberts, G. W., Masters, C. L., Dotti, C. G., Unsicker, K., et al. (1997). Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A β 40/42 amyloid peptides. *Nature medicine*, 3(9):1016–1020.
- Helzner, E., Scarmeas, N., Cosentino, S., Tang, M., Schupf, N., und Stern, Y. (2008). Survival in Alzheimer disease: A multiethnic, population-based study of incident cases. *Neurology*, 71(19):1489–1495.
- Herskovits, A. Z., Locascio, J. J., Peskind, E. R., Li, G., und Hyman, B. T. (2013). A Luminex assay detects amyloid β oligomers in Alzheimer's disease cerebrospinal fluid. *PloS one*, 8(7):e67898.
- Hölttä, M., Hansson, O., Andreasson, U., Hertze, J., Minthon, L., Nägga, K., Andreasen, N., Zetterberg, H., und Blennow, K. (2013). Evaluating amyloid- β oligomers in cerebrospinal fluid as a biomarker for Alzheimer's disease. *PloS one*, 8(6):e66381.
- Hoyer, S. (2000). Brain glucose and energy metabolism abnormalities in sporadic Alzheimer disease. Causes and consequences: an update. *Experimental gerontology*, 35(9):1363–1372.
- Humpel, C. (2011). Identifying and validating biomarkers for Alzheimer's disease. *Trends in biotechnology*, 29(1):26–32.
- Igbavboa, U., Sun, G. Y., Weisman, G. A., He, Y., und Wood, W. (2009). Amyloid β -protein stimulates trafficking of cholesterol and caveolin-1 from the plasma membrane to the Golgi complex in mouse primary astrocytes. *Neuroscience*, 162(2):328–338.
- Jack, Jr, C. R., Knopman, D. S., Jagust, W. J., Petersen, R. C., Weiner, M. W., Aisen, P. S., Shaw, L. M., Vemuri, P., Wiste, H. J., Weigand, S. D., Lesnick, T. G., Pankratz, V. S., Donohue, M. C., und Trojanowski, J. Q. (2013). Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers. *Lancet Neurol*, 12(2):207–216.
- Jan, A., Hartley, D. M., und Lashuel, H. A. (2010). Preparation and characterization of toxic A β aggregates for structural and functional studies in Alzheimer's disease research. *Nat Protoc*, 5(6):1186–1209.

- Jarrett, J. T., Berger, E. P., und Lansbury Jr, P. T. (1993). The carboxy terminus of the β amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry*, 32(18):4693–4697.
- Johnson, K. A., Fox, N. C., Sperling, R. A., und Klunk, W. E. (2012). Brain imaging in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(4):a006213.
- Kanai, M., Matsubara, E., Isoe, K., Urakami, K., Nakashima, K., Arai, H., Sasaki, H., Abe, K., Iwatsubo, T., Kosaka, T., et al. (1998). Longitudinal study of cerebrospinal fluid levels of tau, A β 1-40, and A β 1-42 (43) in Alzheimer's disease: a study in Japan. *Annals of neurology*, 44(1):17–26.
- Kang, J., Lemaire, H.-G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K.-H., Multhaup, G., Beyreuther, K., und Müller-Hill, B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*, 325:733 – 736.
- Kask, P., Palo, K., Ullmann, D., und Gall, K. (1999). Fluorescence-intensity distribution analysis and its application in biomolecular detection technology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(24):13756–13761.
- Kastner, B., Fischer, N., Golas, M. M., Sander, B., Dube, P., Boehringer, D., Hartmuth, K., Deckert, J., Hauer, F., Wolf, E., Uchtenhagen, H., Urlaub, H., Herzog, F., Peters, J. M., Poerschke, D., Lüthmann, R., und Stark, H. (2008). GraFix: sample preparation for single-particle electron cryomicroscopy. *Nat Methods*, 5(1):53–55.
- Katz, M. J., Lipton, R. B., Hall, C. B., Zimmerman, M. E., Sanders, A. E., Verghese, J., Dickson, D. W., und Derby, C. A. (2012). Age and sex specific prevalence and incidence of mild cognitive impairment, dementia and Alzheimer's dementia in blacks and whites: A report from the Einstein Aging Study. *Alzheimer disease and associated disorders*, 26(4):335.
- King, M. E., Kan, H.-M., Baas, P. W., Erisir, A., Glabe, C. G., und Bloom, G. S. (2006). Tau-dependent microtubule disassembly initiated by prefibrillar β -amyloid. *The Journal of cell biology*, 175(4):541–546.
- Kivipelto, M., Helkala, E.-L., Laakso, M. P., Hänninen, T., Hallikainen, M., Alhainen, K., Soininen, H., Tuomilehto, J., und Nissinen, A. (2001). Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. *Bmj*, 322(7300):1447–1451.
- Klunk, W. E., Engler, H., Nordberg, A., Wang, Y., Blomqvist, G., Holt, D. P., Bergström, M., Savitcheva, I., Huang, G.-F., Estrada, S., et al. (2004). Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Annals of neurology*, 55(3):306–319.
- Kril, J. J., Hodges, J., und Halliday, G. (2004). Relationship between hippocampal volume and CA1 neuron loss in brains of humans with and without Alzheimer's disease. *Neuroscience letters*, 361(1):9–12.

- Lang, F., Schmidt, R. F., und Thews, G. (2005). *Physiologie des Menschen : mit Pathophysiologie ; mit 78 Tabellen ; neue Approbationsordnung*. Springer Medizin, Heidelberg.
- Lansdall, C. J. (2014). An effective treatment for alzheimer's disease must consider both amyloid and tau. *Bioscience Horizons*, 7:hzu002.
- Larson, E. B., Shadlen, M.-F., Wang, L., McCormick, W. C., Bowen, J. D., Teri, L., und Kukull, W. A. (2004). Survival after initial diagnosis of Alzheimer disease. *Annals of internal medicine*, 140(7):501–509.
- Lesné, S., Koh, M. T., Kotilinek, L., Kaye, R., Glabe, C. G., Yang, A., Gallagher, M., und Ashe, K. H. (2006). A specific amyloid- β protein assembly in the brain impairs memory. *Nature*, 440(7082):352–357.
- Lewczuk, P., Beck, G., Esselmann, H., Bruckmoser, R., Zimmermann, R., Fiszer, M., Bibl, M., Maller, J. M., Kornhuber, J., und Wiltfang, J. (2006). Effect of sample collection tubes on cerebrospinal fluid concentrations of tau proteins and amyloid *upbeta* peptides. *Clin Chem*, 52(2):332–334.
- Lindsay, J., Laurin, D., Verreault, R., Hébert, R., Helliwell, B., Hill, G. B., und McDowell, I. (2002). Risk factors for Alzheimer's disease: a prospective analysis from the Canadian Study of Health and Aging. *American Journal of Epidemiology*, 156(5):445–453.
- Lue, L.-F., Kuo, Y.-M., Roher, A. E., Brachova, L., Shen, Y., Sue, L., Beach, T., Kurth, J. H., Rydel, R. E., und Rogers, J. (1999). Soluble amyloid β peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *The American journal of pathology*, 155(3):853–862.
- Maddalena, A., Papassotiropoulos, A., Müller-Tillmanns, B., Jung, H. H., Hegi, T., Nitsch, R. M., und Hock, C. (2003). Biochemical diagnosis of Alzheimer disease by measuring the cerebrospinal fluid ratio of phosphorylated tau protein to β -amyloid peptide₄₂. *Archives of Neurology*, 60(9):1202–1206.
- Masters, C. L., Simms, G., Weinman, N. A., Multhaup, G., McDonald, B. L., und Beyreuther, K. (1985). Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(12):4245–4249.
- McKhann, G. M., Knopman, D. S., Chertkow, H., Hyman, B. T., Jack Jr, C. R., Kawas, C. H., Klunk, W. E., Koroshetz, W. J., Manly, J. J., Mayeux, R., et al. (2011). The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 7(3):263–269.
- McLean, C. A., Cherny, R. A., Fraser, F. W., Fuller, S. J., Smith, M. J., Vbeyreuther, K., Bush, A. I., und Masters, C. L. (1999). Soluble pool of A β amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Annals of neurology*, 46(6):860–866.

- Milojevic, J., Esposito, V., Das, R., und Melacini, G. (2007). Understanding the molecular basis for the inhibition of the Alzheimer's A β -peptide oligomerization by human serum albumin using saturation transfer difference and off-resonance relaxation NMR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 129(14):4282–4290.
- Milojevic, J. und Melacini, G. (2011). Stoichiometry and Affinity of the Human Serum Albumin-Alzheimer's A β Peptide Interactions. *Biophysical journal*, 100(1):183–192.
- Milojevic, J., Raditsis, A., und Melacini, G. (2009). Human Serum Albumin Inhibits A β Fibrillization through a "Monomer-Competitor" Mechanism. *Biophysical journal*, 97(9):2585–2594.
- Minoshima, S., Frey, K. A., Koeppe, R. A., Foster, N. L., und Kuhl, D. E. (1995). A diagnostic approach in Alzheimer's disease using three-dimensional stereotactic surface projections of fluorine-18-FDG PET. *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine*, 36(7):1238–1248.
- Moore, B. D., Rangachari, V., Tay, W. M., Milkovic, N. M., und Rosenberry, T. L. (2009). Biophysical analyses of synthetic amyloid- β (1-42) aggregates before and after covalent cross-linking. Implications for deducing the structure of endogenous amyloid- β oligomers. *Biochemistry*, 48(49):11796–11806.
- Mosconi, L., Mistur, R., Switalski, R., Tsui, W. H., Glodzik, L., Li, Y., Pirraglia, E., De Santi, S., Reisberg, B., Wisniewski, T., et al. (2009). FDG-PET changes in brain glucose metabolism from normal cognition to pathologically verified Alzheimer's disease. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 36(5):811–822.
- Mucke, L. (2009). Neuroscience: Alzheimer's disease. *Nature*, 461(7266):895–897.
- Murphy, M. P. und LeVine, III, H. (2010). Alzheimer's Disease and the Amyloid- β Peptide. *Journal of Alzheimer's Disease*, 19(1):311–323.
- Nussbaum, J. M., Schilling, S., Cynis, H., Silva, A., Swanson, E., Wangsanut, T., Tayler, K., Wiltgen, B., Hatami, A., Rönicke, R., Reymann, K., Hutter-Paier, B., Alexandru, A., Jagla, W., Graubner, S., Glabe, C. G., Demuth, H.-U., und Bloom, G. S. (2012). Prion-like behaviour and tau-dependent cytotoxicity of pyroglutamylated amyloid- β . *Nature*, 485(7400):651–655.
- Ogawa, S., Lee, T.-M., Nayak, A. S., und Glynn, P. (1990). Oxygenation-sensitive contrast in magnetic resonance image of rodent brain at high magnetic fields. *Magnetic resonance in medicine*, 14(1):68–78.
- Perl, D. P. (2010). Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine*, 77(1):32–42.
- Pitschke, M., Prior, R., Haupt, M., und Riesner, D. (1998). Detection of single amyloid β -protein aggregates in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's patients by fluorescence correlation spectroscopy. *Nature medicine*, 4(7):832–834.

- Price, J. L. und Morris, J. C. (1999). Tangles and plaques in nondemented aging and "preclinical" Alzheimer's disease. *Annals of neurology*, 45(3):358–368.
- Prince, M., Bryce, R., Albanese, E., Wimo, A., Ribeiro, W., und Ferri, C. P. (2013). The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimer's & Dementia*, 9(1):63–75.
- Prusiner, S. B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 216(4542):136–144.
- Quist, A., Doudevski, I., Lin, H., Azimova, R., Ng, D., Frangione, B., Kagan, B., Ghiso, J., und Lal, R. (2005). Amyloid ion channels: a common structural link for protein-misfolding disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(30):10427–10432.
- Reck-Peterson, S. L., Derr, N. D., und Stuurman, N. (2010). Imaging single molecules using total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM). *Cold Spring Harb Protoc*, 3:2010.
- Ross, C. A. und Poirier, M. A. (2005). What is the role of protein aggregation in neurodegeneration? *Nature reviews Molecular cell biology*, 6(11):891–898.
- Rountree, S. D., Chan, W., Pavlik, V. N., Darby, E. J., und Doody, R. S. (2012). Factors that influence survival in a probable Alzheimer disease cohort. *Alzheimers Res Ther*, 4(3):16.
- Różga, M., Kłoniecki, M., Jabłonowska, A., Dadlez, M., und Bal, W. (2007). The binding constant for amyloid $\alpha\beta 40$ peptide interaction with human serum albumin. *Biochemical and biophysical research communications*, 364(3):714–718.
- Saido, T. C., Yamao-Harigaya, W., Iwatsubo, T., und Kawashima, S. (1996). Amino- and carboxyl-terminal heterogeneity of β -amyloid peptides deposited in human brain. *Neuroscience letters*, 215(3):173–176.
- Sancesario, G. M., Cencioni, M. T., Esposito, Z., Borsellino, G., Nuccetelli, M., Martorana, A., Battistini, L., Sorge, R., Spalletta, G., Ferrazzoli, D., Bernardi, G., Bernardini, S., und Sancesario, G. (2012). The load of amyloid- β oligomers is decreased in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *J Alzheimers Dis*, 31(4):865–878.
- Santos, A. N., Ewers, M., Minthon, L., Simm, A., Silber, R.-E., Blennow, K., Prvulovic, D., Hansson, O., und Hampel, H. (2012). Amyloid- β oligomers in cerebrospinal fluid are associated with cognitive decline in patients with Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 29(1):171–176.
- Santos, A. N., Torkler, S., Nowak, D., Schlittig, C., Goerdes, M., Lauber, T., Trischmann, L., Schaupp, M., Penz, M., Tiller, F.-W., und Böhm, G. (2007). Detection of amyloid- β oligomers in human cerebrospinal fluid by flow cytometry and fluorescence resonance energy transfer. *J Alzheimers Dis*, 11(1):117–125.

- Savage, M. J., Kalinina, J., Wolfe, A., Tugusheva, K., Korn, R., Cash-Mason, T., Maxwell, J. W., Hatcher, N. G., Haugabook, S. J., Wu, G., et al. (2014). A Sensitive A β Oligomer Assay Discriminates Alzheimer's and Aged Control Cerebrospinal Fluid. *The Journal of Neuroscience*, 34(8):2884–2897.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., und Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*, 9(7):676–682.
- Sehlin, D., Söllvander, S., Paulie, S., Brundin, R., Ingelsson, M., Lannfelt, L., Pettersson, F. E., und Englund, H. (2010). Interference from heterophilic antibodies in amyloid- β oligomer ELISAs. *Journal of Alzheimer's Disease*, 21(4):1295–1301.
- Selden, S. C. und Pollard, T. (1983). Phosphorylation of microtubule-associated proteins regulates their interaction with actin filaments. *Journal of Biological Chemistry*, 258(11):7064–7071.
- Selkoe, D. J. (1998). The cell biology of β -amyloid precursor protein and presenilin in alzheimer's disease. *Trends in Cell Biology*, 8(11):447 – 453.
- Serot, J., Christmann, D., Dubost, T., und Couturier, M. (1997). Cerebrospinal fluid transthyretin: aging and late onset Alzheimer's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 63(4):506–508.
- Serpell, L. C. (2000). Alzheimer's amyloid fibrils: structure and assembly. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1502(1):16–30.
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E., und Hyman, B. T. (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 1(1):a006189.
- Seubert, P., Oltsersdorf, T., Lee, M. G., Barbour, R., Blomquist, C., Davis, D. L., Bryant, K., Fritz, L. C., Galasko, D., Thal, L. J., et al. (1993). Secretion of β -amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the β -amyloid peptide. *Nature*, 361(6409):260–263.
- Seward, M. E., Swanson, E., Norambuena, A., Reimann, A., Cochran, J. N., Li, R., Roberson, E. D., und Bloom, G. S. (2013). Amyloid- β signals through tau to drive ectopic neuronal cell cycle re-entry in Alzheimer's disease. *Journal of cell science*, 126(5):1278–1286.
- Shaw, L. M., Vanderstichele, H., Knapik-Czajka, M., Clark, C. M., Aisen, P. S., Petersen, R. C., Blennow, K., Soares, H., Simon, A., Lewczuk, P., et al. (2009). Cerebrospinal fluid biomarker signature in Alzheimer's disease neuroimaging initiative subjects. *Annals of neurology*, 65(4):403–413.
- Shoji, M., Golde, T. E., Ghiso, J., Cheung, T. T., Estus, S., Shaffer, L. M., Cai, X.-D., McKay, D. M., Tintner, R., Frangione, B., et al. (1992). Production of the alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science*, 258(5079):126–129.

- Shoji, M., Matsubara, E., Kanai, M., Watanabe, M., Nakamura, T., Tomidokoro, Y., Shizuka, M., Wakabayashi, K., Igeta, Y., Ikeda, Y., Mizushima, K., Amari, M., Ishiguro, K., Kawarabayashi, T., Harigaya, Y., Okamoto, K., and Hirai, S. (1998). Combination assay of CSF tau, A beta 1-40 and A beta 1-42(43) as a biochemical marker of Alzheimer's disease. *J Neurol Sci*, 158(2):134–140.
- Soscia, S. J., Kirby, J. E., Washicosky, K. J., Tucker, S. M., Ingelsson, M., Hyman, B., Burton, M. A., Goldstein, L. E., Duong, S., Tanzi, R. E., et al. (2010). The Alzheimer's disease-associated amyloid β -protein is an antimicrobial peptide. *PloS one*, 5(3):e9505.
- Stanyon, H. F. und Viles, J. H. (2012). Human serum albumin can regulate amyloid- β peptide fiber growth in the brain interstitium. implications for alzheimer disease. *Journal of Biological Chemistry*, 287(33):28163–28168.
- Stevens, R., Elmendorf, D., Gourlay, M., Stroebel, E., und Gaafar, H. (1979). Application of fluoroimmunoassay to cerebrospinal fluid immunoglobulin G and albumin. *Journal of clinical microbiology*, 10(3):346–350.
- Stöhr, J., Watts, J. C., Mensinger, Z. L., Oehler, A., Grillo, S. K., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., und Giles, K. (2012). Purified and synthetic alzheimer's amyloid beta ($a\beta$) prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(27):11025–11030.
- Sunderland, T., Linker, G., Mirza, N., Putnam, K. T., Friedman, D. L., Kimmel, L. H., Bergeson, J., Manetti, G. J., Zimmermann, M., Tang, B., et al. (2003). Decreased β -amyloid1-42 and increased tau levels in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer disease. *Jama*, 289(16):2094–2103.
- Tapiola, T., Alafuzoff, I., Herukka, S.-K., Parkkinen, L., Hartikainen, P., Soininen, H., und Pirttilä, T. (2009). Cerebrospinal fluid β -amyloid 42 and tau proteins as biomarkers of Alzheimer-type pathologic changes in the brain. *Archives of neurology*, 66(3):382–389.
- Terry, R. D., Gonatas, N. K., und Weiss, M. (1964). Ultrastructural studies in Alzheimer's presenile dementia. *The American journal of pathology*, 44(2):269.
- Trache, A. und Meininger, G. A. (2008). Total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy. *Curr Protoc Microbiol*, Chapter 2:Unit 2A.2.1–Unit2A.2.22.
- Walsh, D. M., Lomakin, A., Benedek, G. B., Condron, M. M., und Teplow, D. B. (1997). Amyloid β -protein fibrillogenesis detection of a protofibrillar intermediate. *Journal of Biological Chemistry*, 272(35):22364–22372.
- Walsh, D. M., Tseng, B. P., Rydel, R. E., Podlisny, M. B., und Selkoe, D. J. (2000). The oligomerization of amyloid β -protein begins intracellularly in cells derived from human brain. *Biochemistry*, 39(35):10831–10839.
- Wang-Dietrich, L. (2012). *Development of Surface-FIDA Towards a Diagnostic Tool for Alzheimer's Disease*. Forschungszentrum Jülich, Zentralbibliothek, Jülich.

- Wang-Dietrich, L., Funke, S. A., Kühbach, K., Wang, K., Besmehn, A., Willbold, S., Cinar, Y., Banach, O., Birkmann, E., und Willbold, D. (2013). The amyloid- β oligomer count in cerebrospinal fluid is a biomarker for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 34(4):985–994.
- Weingarten, M. D., Lockwood, A. H., Hwo, S.-Y., und Kirschner, M. W. (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(5):1858–1862.
- Welge, V., Fiege, O., Lewczuk, P., Mollenhauer, B., Esselmann, H., Klafki, H.-W., Wolf, S., Trenkwalder, C., Otto, M., Kornhuber, J., et al. (2009). Combined CSF tau, p-tau181 and amyloid- β 38/40/42 for diagnosing Alzheimer's disease. *Journal of neural transmission*, 116(2):203–212.
- WHO (2010). ICD-10 Version:2010 <http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2010/en>.
- Wolfson, C., Wolfson, D. B., Asgharian, M., M'Lan, C. E., Østbye, T., Rockwood, K., und Hogan, D. f. (2001). A reevaluation of the duration of survival after the onset of dementia. *New England Journal of Medicine*, 344(15):1111–1116.
- Yang, T., Hong, S., O'Malley, T., Sperling, R. A., Walsh, D. M., und Selkoe, D. J. (2013). New ELISAs with high specificity for soluble oligomers of amyloid β -protein detect natural A β oligomers in human brain but not CSF. *Alzheimer's & Dementia*, 9(2):99–112.
- Zou, K., Gong, J.-S., Yanagisawa, K., und Michikawa, M. (2002). A novel function of monomeric amyloid β -protein serving as an antioxidant molecule against metal-induced oxidative damage. *The Journal of neuroscience*, 22(12):4833–4841.

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.

Die vorliegende Arbeit wurde nicht an anderen Fakultäten vorgelegt. Es wurden zuvor keine Promotionsversuche unternommen.

Jülich,

Katja Kühbach