

Optimierung des sFIDA-Verfahrens und Entwicklung
von Standardmolekülen zur Diagnostik der
Alzheimerschen Demenz

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Maren Hülsemann

aus Dinslaken

Jülich, Juni 2015

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
Koreferentin: Prof. Dr. Laura Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Juli 2015

Eidesstattliche Erklärung

Jülich, 09. Juni 2015

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, sowie Zitate kenntlich gemacht habe.

Maren Hülsemann

Zusammenfassung

Die Alzheimersche Demenz (AD) ist mit ca. 33 Millionen Betroffenen die häufigste Form der Demenz und es wird angenommen, dass sich die Anzahl der Erkrankten in den nächsten 40 Jahren verdreifacht. Ein eindeutiger Befund ist für die AD bisher erst nach dem Tod möglich. Die Entwicklung eines Verfahrens zur Frühdiagnose der AD ist sowohl für die Betroffenen, als auch zur Entwicklung von Therapeutika von hoher Relevanz. Die Etablierung geeigneter Medikamente in Kombination mit einer möglichst frühen Diagnose der AD sind die Hauptziele der aktuellen Alzheimer-Forschung.

Oligomere des Amyloid- β -Peptides (A β) werden als neurotoxische Strukturen mit einer bedeutenden Rolle in der Entstehung der AD beschrieben. A β -Oligomere gelten daher als vielversprechende Biomarker zur Frühdiagnose der AD und ihr sensitiver Nachweis in verschiedenen Körperflüssigkeiten ist Grundlage in der Entwicklung erfolgsversprechender diagnostischer Verfahren.

In der vorliegenden Arbeit wurde der sFIDA (surface-based fluorescence intensity distribution analysis) als Verfahren zur Quantifizierung von A β -Oligomeren in verschiedenen Körperflüssigkeiten verwendet. Mittels sFIDA konnte gezeigt werden, dass Liquor- und Hirnhomogenat-Proben von transgenen Mäusen einen höheren Gehalt an A β -Oligomeren im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen aufweisen.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde die Glasoberfläche des im sFIDA eingesetzten Multiwell-Chips optimiert. Neben der herkömmlichen Verwendung von Ethanolamin zur Aminierung wurde eine Silanisierung der Glasoberfläche mit (3-Aminopropyl)triethoxysilan (APTES) eingeführt. Auf dieser neuartigen Oberfläche konnten A β -Oligomere bis zu einer Detektionsgrenze von 10 fM im sFIDA nachgewiesen werden.

Eine weitere Aufgabenstellung galt der Analyse und Entwicklung von Standardmolekülen für den Einsatz im sFIDA. Kommerziell erhältliche, synthetische A β -Oligomere konnten über fünf Größenordnungen bis zu Konzentrationen zwischen 10 und 2,4 fM in PBS und Liquor im sFIDA nachgewiesen werden.

Zusätzlich wurden biofunktionalisierte Silica-Nanopartikel (SiNP) als Standardmoleküle im sFIDA etabliert. Hierbei handelt es sich um größendefinierte SiNP mit einer bekannten Anzahl kovalent gebundener A β -Peptide auf der SiNP-Oberfläche. Diese Partikel konnten verdünnt in Wasser, Liquor bzw. Blutplasma bis 10 fM im sFIDA detektiert werden. Durch ihre hohe Stabilität, definierte Größe und bekannte Anzahl an Epitopen stellen sie vielversprechende Standards zur Anwendung in Oligomer-basierten Diagnoseverfahren für die AD, aber auch für andere Proteinfehlfaltungskrankheiten dar.

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia, affecting more than 33 million people worldwide, and prevalence is expected to triple over the next 40 years. Thus far a reliable diagnosis can only be made *post mortem*. The development of a technology for the early diagnosis of Alzheimer's disease is highly important for the patient, but also for the development of therapeutics. The establishment of therapeutics combined with an early diagnostic analysis are the main goals in current Alzheimer's research.

Oligomers of the amyloid β peptide ($A\beta$) are described as highly neurotoxic with an important impact on AD development. Therefore they are promising biomarkers for the early diagnosis of AD and many diagnostic tools are based on their sensitive detection in different body fluids.

In this work the sFIDA (surface-based fluorescence distribution analysis) is used as method for the detection and quantification of $A\beta$ oligomers in different body fluids. By sFIDA it could be shown that cerebrospinal fluid (CSF) and brain homogenates of transgenic mice have a higher $A\beta$ oligomer load compared to wild-type mice.

In a further part of this work the glass surface of the sFIDA multi-well chip was optimized. In addition to the traditional amination with ethanolamine a silanization with 3-(aminopropyl)triethoxysilane was introduced. On this new surface $A\beta$ oligomers could be detected down to a concentration of 10 fM in the sFIDA.

Another task was the analysis and development of standards for the application in sFIDA. Commercially available synthetic $A\beta$ oligomers could be detected over 5 orders of magnitude down to a concentration between 10 and 2.4 fM in PBS-buffer and CSF, respectively.

Additionally bio-functionalized silica nanoparticles (SiNP) were established as standards in sFIDA. $A\beta$ -SiNP are size-defined particles with a known number of bound $A\beta$ peptides on the surface. $A\beta$ -SiNP could be detected in water, CSF and plasma down to a concentration of 10 fM in the sFIDA. Due to their defined size and known number of accessible epitopes, they represent promising standards for the application in oligomer-based diagnostic methods for AD, but also for further protein missfolding diseases.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Alzheimersche Demenz.....	1
1.1.1	Überblick	1
1.1.2	Neuropathologie.....	2
1.1.3	Amyloid- β	3
1.1.3.1	Synthese	3
1.1.3.2	Genetische Ursachen.....	5
1.1.3.3	Aggregation und neurotoxische Eigenschaften von A β	6
1.1.3.4	Amyloid-Kaskaden-Hypothese.....	7
1.2	Mausmodelle der AD	9
1.3	Diagnose.....	10
1.3.1	Bildgebende Verfahren	11
1.3.2	Biomarker	12
1.3.3	Detektion von A β -Oligomeren als Biomarker.....	15
1.3.4	Standardisierung von Detektionsmethoden	17
1.3.5	sFIDA.....	18
1.4	Oberflächenfunktionalisierungen von Glas.....	21
1.4.1	Polymerbeschichtungen zur Kontrolle unspezifischer Proteinadsorption auf Glasoberflächen	21
1.4.2	Oberflächenfunktionalisierung von Glas zur Biomolekül-Bindung.....	22
1.4.2.1	Reinigung und Aktivierung von Glasoberflächen mittels Plasma.....	22
1.4.2.2	Aminierung von Glasoberflächen.....	23
1.5	Nanopartikel.....	28
1.5.1	Nanopartikel und ihre biologische Bedeutung.....	28
1.5.2	SiNP	29
1.5.3	Synthese und Modifikation von SiNP	30

1.5.4	Biologische Anwendung von SiNP	32
2	AUFGABENSTELLUNG	37
3	MATERIAL UND METHODEN	39
3.1	Material.....	39
3.1.1	Verbrauchsmaterialien	39
3.1.2	Chemikalien und Puffer	40
3.1.3	Peptide und Antikörper	41
3.1.4	Geräte	41
3.1.5	ZAT-Platten	42
3.1.6	Software	43
3.2	Methoden	44
3.2.1	Glasfunktionalisierung.....	44
3.2.1.1	Herstellung und Behandlung der Glasplättchen	44
3.2.1.2	Glasreinigung.....	44
3.2.1.3	Aminierung von Glasoberflächen	44
3.2.2	Charakterisierung der Glasoberflächen	45
3.2.2.1	Kontaktwinkelanalyse.....	45
3.2.2.2	Röntgenphotoelektronenspektroskopie.....	46
3.2.3	sFIDA Allgemein.....	48
3.2.4	sFIDA Aufbau.....	48
3.2.4.1	Reinigung und Aktivierung der Glasoberfläche	48
3.2.4.2	Aminierung der Glasoberfläche nach dem Ethanolamin-Protokoll.....	49
3.2.4.3	Aminierung der Glasoberfläche nach dem APTES-Protokoll aus der Gasphase.....	49
3.2.4.4	Beschichtung der Glasoberfläche mit Carboxymethyldextran	49
3.2.4.5	Bindung der Fänger-Antikörper.....	50
3.2.4.6	Probenvorbereitung.....	50
3.2.4.7	Zugabe der Detektions-Antikörper	51
3.2.5	Datenerfassung im sFIDA	52
3.2.5.1	TIRF-Mikroskopie	52

3.2.5.2	LSM-Mikroskopie	53
3.2.6	Datenauswertung mittels sFIDA	54
3.2.7	Synthese und Funktionalisierung von SiNP	56
3.2.7.1	Stöber-Synthese	56
3.2.7.2	Konzentrationsbestimmung der SiNP	56
3.2.7.3	Aminierung von SiNP	57
3.2.7.4	Carboxylierung der Amin-funktionalisierten SiNP	57
3.2.7.5	Peptidvorbereitung	57
3.2.7.6	Biofunktionalisierung	58
3.2.8	Charakterisierung der SiNP	59
3.2.8.1	Transmissionselektronenmikroskopie	59
3.2.8.2	ATR-Infrarotspektroskopie	59
3.2.8.3	BCA-Assay zur Proteinbestimmung	60
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	63
4.1	Analyse von murinen Proben im sFIDA	63
4.1.1	Zielsetzung	63
4.1.2	Ergebnisse	64
4.1.2.1	Analyse von Liquor von transgenen und Wildtyp-Mäusen im sFIDA	64
4.1.2.2	Analyse verschiedener Körperflüssigkeiten von transgenen und Wildtyp-Mäusen im sFIDA	67
4.1.2.3	Analyse von Hirnhomogenaten von transgenen und Wildtyp- Mäusen im sFIDA	69
4.1.3	Diskussion	75
4.2	Oberflächenoptimierung des sFIDA	77
4.2.1	Zielsetzung	77
4.2.2	Ergebnisse	80
4.2.2.1	Reinigung der Glasoberfläche und Einführung einer primären Amingruppe aus der Flüssigphase	80
4.2.2.2	APTES-Abscheidung aus der Flüssig- und aus der Gasphase	83
4.2.2.3	Analyse der CMD-Beschichtung auf den silanisierten Glasoberflächen	87

4.2.2.4	Vergleich von unterschiedlich modifizierten Glasoberflächen im sFIDA.....	87
4.2.2.5	Analyse von A β -SiNP in Wasser, Liquor und Plasma auf verschiedenen Glasoberflächen im sFIDA	90
4.2.3	Diskussion.....	93
4.3	Entwicklung und Analyse von Standardmolekülen im sFIDA.....	97
4.3.1	Zielsetzung.....	97
4.3.2	Ergebnisse.....	98
4.3.2.1	Analyse von CB-Oligomeren.....	98
4.3.2.2	Synthese und Charakterisierung von Standardmolekülen	102
4.3.2.3	Analyse von biofunktionalisierten SiNP im sFIDA	108
4.3.3	Diskussion.....	115
5	ANHANG.....	123
5.1	Abkürzungsverzeichnis	123
5.2	Abbildungsverzeichnis.....	125
5.3	Tabellenverzeichnis	126
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	127

1 Einleitung

1.1 Alzheimersche Demenz

1.1.1 Überblick

Die Alzheimersche Demenz (AD) ist eine neurodegenerative Krankheit des Gehirns, benannt nach dem deutschen Psychiater Alois Alzheimer, der die Krankheit erstmals 1906 beschrieb. Typische Anzeichen sind ein fortschreitender Verlust des episodischen Gedächtnisses, Orientierungslosigkeit, Verhaltensveränderungen und Wortfindungsschwierigkeiten (Mucke, 2009).

Bei der AD handelt es sich um die häufigste Form von Demenz, welche ca. 60 bis 80 % der weltweit ca. 44 Millionen Demenz-Erkrankten betrifft. Unterschieden werden kann zwischen familiärer und sporadischer AD. Bei der familiären AD handelt es sich um die seltenere (weniger als 1 % aller AD-Erkrankten) und erblich-bedingte Form, deren Ausbruch schon im jungen Alter beobachtet werden kann (Bekris et al., 2010). Der Ausbruch der sporadische AD tritt meist erst ab dem 65. Lebensjahr auf und kann verschiedene Gründe haben. Als größter Risikofaktor wird ein fortgeschrittenes Alter angesehen (Alzheimer's Disease International, 2014; Alzheimer Association, 2014).

Die AD wird in 3 Phasen unterteilt:

- Die Prä-symptomatische Phase, in der die Personen zwar pathologische Veränderungen im Gehirn aufweisen, jedoch keine kognitiven Beeinträchtigungen zeigen (Price and Morris, 1999).
- In der prodromalen Phase, auch MCI (mild cognitive impairment) genannt, zeigt der Patient erste kognitive Symptome, erfüllt aber noch nicht alle Kriterien für eine spezifische Diagnose (Petersen, 2004).

- Die finale Phase der Alzheimer-Krankheit ist die Demenz. Hier kommt es zu einer schwerwiegenden Schädigung kognitiver Gehirnregionen und starken Beeinträchtigungen im Leben des Patienten.

Eine international angelegte Studie prognostizierte eine drastische Entwicklung der sporadischen AD mit ca. 81 Millionen Patienten im Jahre 2040 und einer Verdopplung der Erkrankten alle 20 Jahre (Ferri et al., 2006). Im Jahre 2010 war AD die sechst-häufigste Todesursache. Während sich die Anzahl der Todesfälle durch Herzinfarkte und Schlaganfälle zwischen den Jahren 2000 und 2010 um 16 % und 23 % verringerte, stieg die Anzahl der Todesfälle aufgrund von AD um 68 % an (Alzheimer's Association, 2014). Diese alarmierende Entwicklung hat nicht nur weitreichende Folgen für die Betroffenen und ihre Angehörigen, sondern auch für das Gesundheitssystem. Die Kosten für die institutionelle Pflege der Patienten belaufen sich alleine in Europa auf ca. \$ 55 Milliarden jährlich (Jönsson and Berr, 2005) und auf \$ 600 Milliarden weltweit (Lewczuk et al., 2015).

Auch mehr als 110 Jahre nach der ersten Beschreibung der Krankheit ist weder eine sichere Diagnose noch eine geeignete Therapieform verfügbar. Eine eindeutige Diagnose der AD kann erst nach dem Tod des Patienten anhand einer histopathologischen Untersuchung von Hirngewebe erfolgen.

1.1.2 Neuropathologie

Die Demenz ist nur das Endstadium einer Anhäufung von pathologischen Veränderungen im Gehirn, welche sich teilweise schon Jahrzehnte vor den ersten klinischen Symptomen entwickeln (Jack et al., 2013).

Bei den pathologischen Veränderungen handelt es sich um Proteinablagerungen, die im Wesentlichen aus amyloiden Plaques und neurofibrilläre Bündeln bestehen. In Hirnproben von AD-Patienten findet man häufig doppelt so viele A β -Plaques und viermal so viele neurofibrilläre Bündel, als bei Kontrollproben (Bennett et al., 2004).

Amyloide Plaques bestehen aus dem Amyloid- β -Peptid (A β), welches durch seine Aggregation zur Bildung von unlöslichen, extrazellulären Ablagerungen in bestimmten Hirnregionen aller AD-Patienten führt. Neurofibrilläre Bündel sind intraneuronale Filamente, die sich aus Aggregaten des abnormal hyperphosphorylierten Tau-Proteins zusammensetzen und in vielen neurodegenerativen Erkrankungen zu finden sind. Sowohl die amyloiden Plaques als auch die neurofibrillären Bündel sind charakteristische Merkmale, aber nicht die einzigen signifikanten Veränderungen im Gehirn von AD-Patienten. In Kombination mit zahlreichen weiteren strukturellen und funktionellen Veränderungen, wie Entzündungsreaktionen und oxidativem Stress, kommt es zum Verlust von Nervenzellen und einer Degeneration von Axonen und Synapsen. Zum Zeitpunkt des Todes wiegt das Gehirn eines Alzheimer-Patienten unter Umständen nur noch ein Drittel des Gehirns eines nicht-dementen Menschen (LaFerla et al., 2007).

1.1.3 Amyloid- β

1.1.3.1 Synthese

A β ist ein Peptid bestehend aus 36 bis 43 Aminosäuren und wird durch die Endoproteolyse des Amyloid-Vorläuferproteins (APP) gebildet. Bei APP handelt es sich um ein 695 bis 770 Aminosäuren großes Transmembranprotein, welches mittels sequenzieller Spaltung durch die Enzymkomplexe α -, β - und γ - Sekretase umgesetzt wird (LaFerla et al., 2007).

Die Prozessierung des APP kann in einen amyloiden und einen nicht-amyloiden Pfad unterteilt werden (siehe Abb. 1-1). In der vorherrschenden nicht-amyloiden Prozessierung wird APP durch Enzyme der α -Sekretase (ADAM 9, 10, 17) an Position 83 inmitten der A β -Region am C-Terminus gespalten. Dadurch entsteht eine große sekretierbare N-terminale Domäne (sAPP α) und ein 83 Aminosäuren langes C-terminales Fragment, welches nach und nach von der γ -Sekretase abgebaut wird. Die

γ -Sekretase wird als Komplex verschiedener Enzyme beschrieben, unter anderem bestehend aus Präsenilin 1 und 2 (PS1 und PS2).

Über den amyloiden Weg wird APP durch die β -Sekretase, bestehend aus dem β -site APP cleaving Enzym 1 (BACE1), prozessiert. Durch diesen alternativen Weg wird die pathologisch-relevante Prozessierung des APP in Gang gesetzt. Nach der Spaltung des APP durch die β -Sekretase wird die N-terminale Domäne (sAPP β) freigesetzt und es verbleibt ein 99 Aminosäuren langes Protein C99 in der Membran, welches im nächsten Schritt durch den γ -Sekretase-Komplex zwischen Aminosäure 38 und 43 gespalten wird, wodurch es zur Freisetzung verschiedener Isoformen des A β -Peptides kommt. Die beiden häufigsten A β -Isoformen sind A β_{1-40} und das deutlich hydrophobere A β_{1-42} , welche in einem Verhältnis von 10:1 gebildet werden. Des Weiteren existieren auch am N-Terminus verkürzte A β -Varianten, von denen das pE3A β , das mit einem Pyroglutamat an Position 3 beginnt, die Häufigste ist.

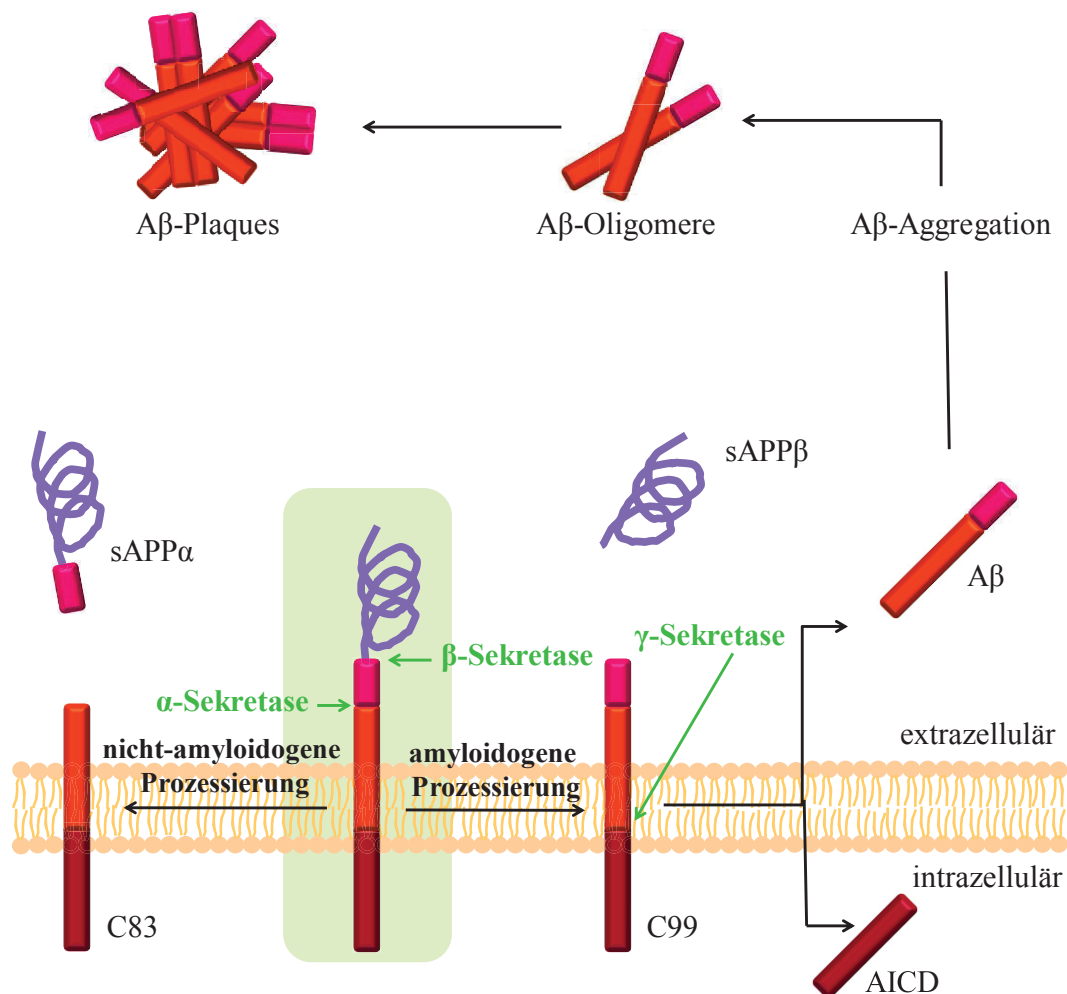


Abbildung 1-1: Nicht-amyloidogene und amyloidogene Prozessierung des APP

APP kann durch die α -, β - oder γ -Sekretase gespalten werden. Die Spaltung durch die α -Sekretase initiiert den nicht-amyloidogenen Weg und generiert sAPP α und C83 (links). Die Spaltung durch die β -Sekretase (amyloidogene Prozessierung) führt zur Bildung von C99 und sAPP β . C99 wird im nächsten Schritt zu A β und AICD (Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain) umgesetzt. Durch die Aggregation der A β -Peptide kommt es zur Bildung von löslichen Oligomere und unlöslichen Plaques (Abbildung in Anlehnung an Spies et al., (2012)).

1.1.3.2 Genetische Ursachen

A β ist ein natürlich vorkommendes Produkt des APP-Metabolismus und ist sowohl im Liquor als auch im Plasma eines jeden Menschen zu finden (Hardy and Selkoe, 2002). Durch genetische Veränderungen kann es jedoch zu einer Verschiebung des

Gleichgewichtes im APP-Metabolismus kommen, was zum Ausbruch der AD führen kann. In der familiären Form der AD konnte eine Mutation im APP-Gen auf Chromosom 21 und in den Präsenilin-Genen (PS1: Chromosom 14, PS2: Chromosom 1) festgestellt werden, wodurch sich die proteolytische Prozessierung des APP verändert, und die Menge von A β -Peptiden erhöht wird. Es kommt dabei sowohl zu einer erhöhten Gesamtmenge an A β , als auch zur Bildung der, als besonders toxisch geltenden, A β ₁₋₄₂- und pyroglutamat pE3A β -Peptide (Saido et al., 1995). Eine der gesicherten genetischen Ursache für die sporadische Form der AD ist eine Assoziation mit dem ϵ 4-Allel des Apolipoprotein-E (ApoE)-Gens (Bertram et al., 2007). Der bisher bekannte größte Risikofaktor für die sporadische AD ist jedoch das Lebensalter.

1.1.3.3 Aggregation und neurotoxische Eigenschaften von A β

A β ₁₋₄₀ und A β ₁₋₄₂ werden als lösliche Monomere gebildet, aber gerade das hydrophobere A β ₁₋₄₂ hat unter physiologischen Bedingungen eine sehr hohe Tendenz zu aggregieren und multimere Komplexe zu bilden. Diese löslichen Komplexe reichen von Strukturen mit niedrigem Molekulargewicht (Dimere und Trimere) bis hin zu höher molekularen Oligomeren. Durch weitere Aggregation kommt es zur Bildung von löslichen Protofibrillen. Protofibrillen weisen eine β -Faltblatt-reiche, stabförmige Struktur auf. Durch Anlagerung und strukturelle Konversion von A β -Monomeren an die Protofibrillen entstehen höher molekulare, unlösliche Fibrillen. Fibrillen werden als stabile Filamente beschrieben, deren weitere Aggregation zur Ablagerung von extrazellulären Plaques führt, welche charakteristisch im Gehirn von AD-Patienten nachgewiesen werden können (Finder and Glockshuber, 2007; Roychaudhuri et al., 2009). Extrazelluläre Plaques oder amyloide Aggregate bestehen aus β -Faltblatt-reichen Strukturen, welche sich entlang der Fibrillenachse ausbilden (Nelson et al., 2005).

Früher wurde angenommen, dass die unlöslichen, extrazellulären A β -Fibrillen den zytotoxischen Effekt auf die Neuronen ausüben. Zum heutigen Zeitpunkt liegt der

Fokus allerdings auf den kleineren, löslichen A β -Oligomeren, welche laut der im Folgenden beschriebenen 'Amyloid-Kaskaden-Hypothese' durch ihren toxischen Einfluss den Prozess der Neurodegeneration in Gang setzen (Hardy and Selkoe, 2002).

1.1.3.4 Amyloid-Kaskaden-Hypothese

Zur Entwicklung einer neuen Hypothese über die molekularen Ursachen der AD führte die Beobachtung, dass die Anwesenheit von Plaques und Fibrillen im Gehirn zwar ein klares Charakteristikum der AD ist, welches aber nicht zwangsläufig mit dem Ausbruch der Krankheit korreliert. Laut der mittlerweile breit akzeptierten Amyloid-Kaskaden-Hypothese ist es vielmehr die Konzentration der löslichen A β -Spezies, die mit dem Grad der kognitiven Beeinträchtigungen in Zusammenhang gebracht werden kann. Insbesondere lösliche, frei-diffundierende A β -Oligomere wirken neurotoxisch, wohingegen die großen unlöslichen Aggregate inaktive Reservoirs darstellen, mit denen die kleinen Oligomere im Gleichgewicht stehen (Hardy and Selkoe, 2002).

In einem Mausmodell, das sowohl mutantes, humanes APP und mutantes, humanes Präsenilin-1 überexprimiert (APP/PS1), als auch durch *post-mortem* Untersuchungen von jungen Down-Syndrom Patienten, welche bereits in ihrer dritten Lebensdekade AD-typische Pathologien aufweisen, konnte eine deutliche intrazelluläre A β -Akkumulation gezeigt werden, die sich mit zunehmender Plaque-Ablagerung vermindert (Bayer and Wirths, 2008; Oddo et al., 2006).

Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese

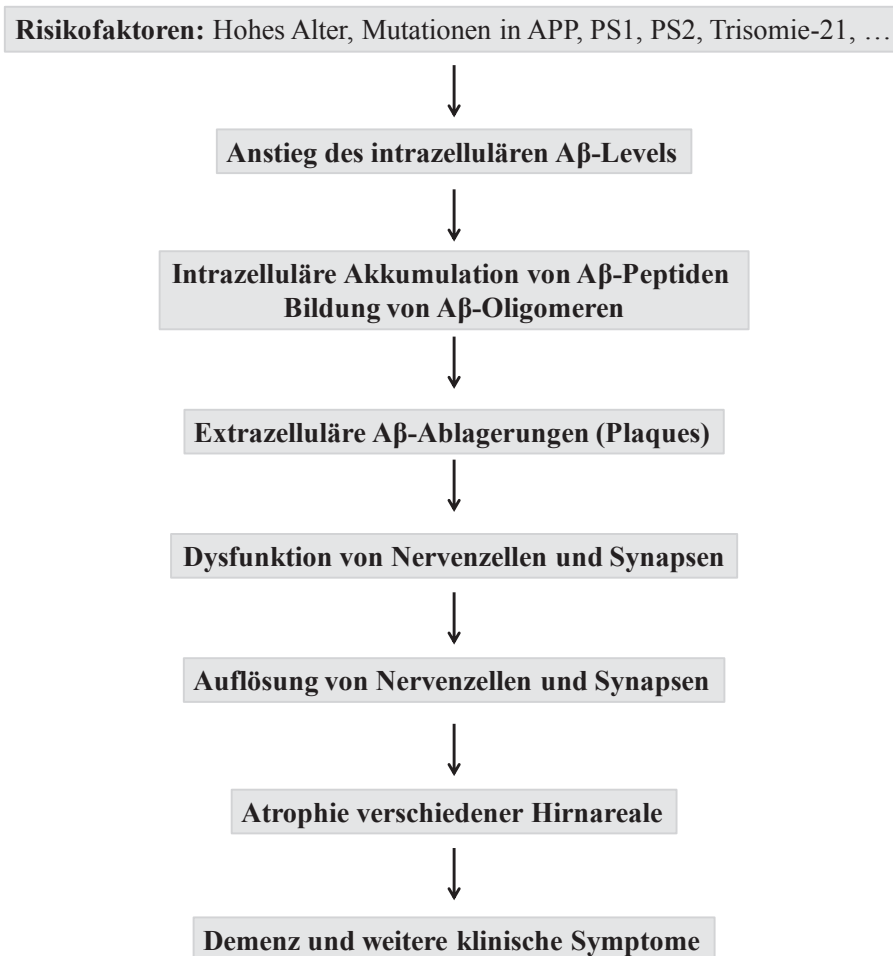


Abbildung 1-2: Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese

Ein Ungleichgewicht zwischen der Aβ-Produktion und des Aβ-Abbaus führt zum Anstieg des Aβ-Levels und zur Aggregation von Aβ-Peptiden zu oligomeren Strukturen und Plaques. Neuronale und synaptische Fehlfunktionen resultieren in der Auflösung von Neuronen und Synapsen und induzieren die Demenz und weitere klinische Symptome.

Aus der intrazellulären Akkumulation hydrophober Aβ₁₋₄₂-Peptide resultiert ein langsamer aber tödlicher Prozess, welcher weiter charakterisiert ist durch die Aggregation des löslichen tau-Proteins zu neurofibrillären Bündeln, die Ablagerung von extrazellulären, amyloiden Plaques, sowie durch Synapsenverlust und kognitive Störungen (Wirths et al., 2004).

1.2 Mausmodelle der AD

Mutationen in den drei Genen APP, PS1 und PS2 führen jeweils zu einer Veränderung des APP-Metabolismus und der Akkumulation von A β -Peptiden. Diese Mutationen wurden für die Etablierung von transgenen Mausmodellen in der AD genutzt. Eine der häufigsten APP-Mutationen ist die Swedish Mutation (APP_{SWE}). Hier kommt es durch einen doppelten Aminosäureaustausch vor der A β -Region im APP zu einer vermehrten Spaltung durch die β -Sekretase. Weitere Mutationen in der APP_{SWE}/PS1 Mauslinie führen zu Spaltungen am C-Terminus, was in einer vermehrten Bildung von A β ₁₋₄₂ anstatt von A β ₁₋₄₀ resultiert (Haass et al., 1995).

Grundlage für die Entwicklung eines weiteren Mausmodells ist die Beobachtung, dass N-Terminal-verändertes A β , im Speziellen das bereits erwähnte pE3A β (pyroglutamat A β), im Gehirn akumulierte. Glutamat wird am angeschnittenen N-Terminus des A β -Peptides durch das Enzym Glutaminylzyklase zyklisiert, woraus pE3A β entsteht, welches deutlich stärker zur Aggregation neigt und als ein großer Bestandteil von A β -Ablagerungen im Gehirn von AD-Patienten beschrieben wird (Saido et al., 1995; Wirths et al., 2009).

Um die Toxizität der pE3A β -Spezies zu untersuchen etablierten Alexandru et al. (2011) ein Mausmodell, genannt TBA2.1, in welchem N-terminal trunkiertes A β mit einem Austausch von Glutamat gegen Glutamin an Position 3 exprimiert wurde. In den TBA2.1 Mäusen kommt es zur Bildung von intrazellulären Co-Aggregaten mit anderen A β -Spezies, wodurch die Gesamtkonzentration an A β in der Zelle ansteigt und zum Verlust von Neuronen führt. Es bilden sich Ablagerungen von größeren A β -Einheiten im extrazellulären Raum, wie sie auch in APP/PS1dE9-Mäusen beobachtet werden können (Bayer and Wirths, 2008).

1.3 Diagnose

Eine frühe und eindeutige Diagnose der AD ist für den Patienten und seine Angehörigen, aber insbesondere für die Entwicklung von Therapiemethoden wichtig. Bis heute existiert jedoch kein akkurater Biomarker, den man in Körperflüssigkeiten von AD-Patienten messen kann. Eine genaue Charakterisierung und Unterscheidung von anderen Formen der Demenz kann erst durch die histologische Untersuchung des Gehirns nach dem Tod des Patienten durchgeführt werden.

Für eine klinische Diagnose der AD ist es zunächst wichtig weitere Erkrankungen, wie beispielsweise Depressionen oder Vitaminmangel, die ebenfalls zu kognitiven Einschränkungen führen, auszuschließen. Des Weiteren ist eine genaue Dokumentation des Krankheitsverlaufes hilfreich, um den Grad der Erkrankung einzuordnen. Anhand einer klinischen Diagnose kann ein AD-Patient von einem nicht-dementen Patienten mit einer Sensitivität und Spezifität von mehr als 80 % unterschieden werden, wohingegen die Unterscheidung zwischen verschiedenen Demenzformen weniger genau möglich ist (Ballard et al., 2011).

Standardmäßig wird zunächst ein psychologischer Test durchgeführt, der anhand von Fragen und Aufgaben die kognitiven Fähigkeiten der Person überprüft (MMSE: Mini-Mental-State-Examination) und sie durch die erlangte Punktzahl in verschiedene Stadien, wie ‚kognitiv beeinträchtigt‘ oder ‚dement‘ einordnet.

Zur Abgrenzung von anderen Formen der Demenz und zur möglichst eindeutigen Diagnose der AD, ist die Kombination von neuropsychologischen und bildgebenden Verfahren zusammen mit der Untersuchung von Körperflüssigkeiten, wie z. B. Hirnliquor auf potenzielle Biomarker die zur Zeit vielversprechendste Herangehensweise.

1.3.1 Bildgebende Verfahren

Pathologische Prozesse auf molekularer und zellulärer Ebene führen zu makroskopischen Effekten, die durch bildgebende Verfahren detektiert werden können. Bei den, in der AD-Diagnostik angewendeten, bildgebenden Verfahren handelt es sich im Wesentlichen um Magnetresonanztomographie (MRT) und Positronen-Emissions-Tomographie (PET).

Mit Hilfe verschiedener Formen der MRT können Gewebestrukturen im Gehirn dargestellt werden, wodurch charakteristische Atrophien verschiedener Hirnregionen sichtbar werden und bestimmten Demenzformen zugeordnet werden können (Scheltens et al., 2002). In der MRT wird die Form, Größe und Intaktheit der grauen und weißen Substanz im Gehirn untersucht. Die Topographie des Substanzverlustes korreliert mit den kognitiven Defiziten der Patienten. Der Grad der Atrophie im Hippocampus kann beispielsweise der Einordnung in den MCI-Zustand (mild cognitive impairment) dienen. So ist das Volumen des Hippocampus bei MCI-Patienten um 10 bis 15 %, und bei Patienten mit moderater AD um 30 bis 40 % reduziert (Adlard et al., 2014). Diese strukturellen Charakteristika sind sensitive Marker für den Fortschritt der Neurodegeneration (Frisoni et al., 2010).

Die PET detektiert die Verteilung einer radioaktiven Substanz im Gehirn und wird zur Aufklärung neurochemischer Prozesse in der AD eingesetzt. PET wird ebenfalls genutzt, um die AD-charakteristischen amyloiden Plaques im Gehirn zu visualisieren, indem diese mit Amyloid- β -selektiven, radioaktiven Markern versehen werden (z. B. ^{11}C -PiB, Florbetaben oder Flutemetamol), wobei das A β -Level mittlerweile auch durch weitaus günstigere biochemische Verfahren im Liquor gemessen werden kann (siehe *1.3.3 Detektion von A β -Oligomeren als Biomarker*).

Mit Hilfe des ^{18}F -Fluorodeoxyglucose PET (FDG-PET) wurde herausgefunden, dass es in der AD zu einer Abnahme des Glucose-Metabolismus, und zu einer Verringerung der synaptischen Aktivität kommt. Mit Hilfe von FDG-PET Aufnahmen soll eine frühe Diagnose der AD und die Abgrenzung von der

frontotemporalen Demenz ermöglicht werden. Es kann jedoch zu einer hohen Variabilität des Metabolismus durch Faktoren wie den natürlichen Alterungsprozess oder lokale Entzündungen kommen (Shipley et al., 2013).

Zusammenfassend stellt die PET ein relativ teures, und durch die Verwendung von radioaktivem Material gesundheitlich nicht unbedenkliches Verfahren dar, während MRT-Aufnahmen gesundheitlich unbedenklich sind und flexibel wiederholt werden können (Pich et al., 2014).

1.3.2 Biomarker

Fasst man verschiedene Definitionen eines Biomarkers zusammen, so handelt es sich dabei um einen messbaren Indikator für einen biologisch normalen oder pathogenen Prozess, der in Körperflüssigkeiten oder Geweben nachgewiesen werden kann (Blennow et al., 2015).

Die Kombination von $A\beta_{1-42}$, total tau (t-tau) und phosphoryliertem tau (p-tau) Konzentrationen in der Gehirn- und Rückenmarksflüssigkeit (Liquor cerebrospinalis), kurz Liquor, sind als sehr gut charakterisierte Biomarker in der AD etabliert und erhöhen die Sensitivität und Spezifität der Diagnose. Liquor steht in direktem Kontakt mit dem extrazellulären Raum des Gehirns und stellt daher ein sehr geeignetes Medium zur Detektion biochemischer Veränderungen im Gehirn dar.

Zum jetzigen Zeitpunkt existieren prinzipiell zwei Amyloid-Biomarker in der AD. $A\beta_{1-42}$ -Plaques, die durch PET-Aufnahmen im Gehirn nachgewiesen werden (siehe 1.3.1) und $A\beta$ -Peptide, deren Konzentration im Liquor mittels Immundetektion via ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) gemessen wird.

Verschiedene Studien haben eine Korrelation zwischen einer erhöhten $A\beta_{1-42}$ -Plaque Konzentration im Gehirn (gemessen durch ^{11}C -PIB PET) und einer Verringerung der Konzentration von $A\beta_{1-42}$ im Liquor gezeigt. Durch die Aggregation der $A\beta_{1-42}$ -Peptide und ihrer Ablagerung im Gehirn können weniger $A\beta_{1-42}$ -Peptide in den

Liquor diffundieren (Fagan et al., 2006). AD-Patienten zeigen eine, bis zu 50 % niedrigere $A\beta_{1-42}$ -Konzentration im Vergleich zu gleichalten, gesunden Probanden.

$A\beta_{1-40}$ ist die häufigste Isoform des $A\beta$ -Peptides im Liquor, zeigt jedoch keine Konzentrationsveränderungen in der AD. Wohingegen das Verhältnis von $A\beta_{1-42}$ zu $A\beta_{1-40}$ mit dem Fortschritt der Krankheit abnimmt und ebenfalls als Biomarker eingesetzt wird (Mehta et al., 2000).

Im Liquor von AD-Patienten konnte bereits häufig eine erhöhte Konzentration von t-tau im Vergleich zu Kontrollprobanden festgestellt werden. Anhand der t-tau-Konzentration können Aussagen über die neuronale und axonale Degeneration getroffen werden und sie stellt ein allgemeines Charakteristikum neurodegenerativer Erkrankungen dar (Blennow, 2004). Die Konzentration von p-tau hingegen steht im Zusammenhang mit der Bildung neurofibrillärer Bündel im Gehirn und der Atrophie im Hippocampus. Verschiedene Studien haben eine eindeutige Korrelation zwischen der Konzentration an t-tau und p-tau in AD-Patienten, gesunden Kontrollspendern und anderweitig neurodegenerativ Erkrankten gezeigt. Hier ist eine erhöhte Konzentration an p-tau ein Alleinstellungsmerkmal der AD und kann dazu genutzt werden, die AD von anderen Formen der Demenz abzugrenzen (Blennow et al., 2010; Hampel et al., 2004).

Die Entnahme von Liquor-Proben mittels der Lumbalpunktion ist ein sehr invasiver und aufwendiger Prozess, wodurch die häufige Entnahme zu verschiedenen Zeitpunkten einer Therapie oder zur Überprüfung des Krankheitsfortschritts schwierig ist. Verschiedene Ansätze beschreiben daher die alternative Messung von Biomarkern in Blut oder Urinproben, welche eine Kosten- und Zeit sparende Alternative darstellen könnten. Die größte Hürde in der Entwicklung eines Blut-basierten Biomarkers ist die Blut-Hirn-Schranke. Sie schützt das Gehirn vor potentiell gefährlichen Substanzen aus dem Blut und verhindert das Durchdringen größerer Proteine, was wiederum auch den Austritt dieser aus dem Gehirn inhibiert. Es kommt jedoch zu einer täglichen Aufnahme von Liquor im Blut, was einen

Austausch von Peptiden ermöglicht, wenn auch in einer geringen Konzentration (Marcello et al., 2009).

Es wurde gezeigt, dass $A\beta_{1-42}$ im Blut durch seinen hydrophoben Charakter an eine Vielzahl von Proteinen bindet und es zu einer Maskierung seiner Epitope kommen kann, weshalb dessen Immundetektion im Blut mit Vorsicht interpretiert werden sollte (Henriksen et al., 2013; Mehta et al., 2000).

Bisher existieren nur wenige Berichte über AD-Biomarker im Urin. Die $A\beta$ -Konzentration im Urin korreliert mit dem zirkulierenden $A\beta$ im Blut. Durch die Filtration in der Niere kommt es jedoch vermutlich zu einer deutlich geringeren Konzentration von $A\beta$ im Urin im Vergleich zum Blutplasma (Ghiso et al., 1997). In einer von Takata et al. (2008) vorgestellten Messung konnte durch Fällung und Immundetektion von $A\beta$ aus Urin von AD-Patienten und Kontrollprobanden, mittels Western Blot eine Korrelation zwischen dem $A\beta$ -Level und dem Status der Krankheit festgestellt werden. Zunächst steigt das $A\beta$ -Level im Urin mit Verlauf der Krankheit an, bis es beim Übergang zur fortgeschrittenen AD wieder sinkt. Die überproduzierten $A\beta$ -Peptide scheinen somit bis zu einem bestimmten Grad über Plasma und Urin abtransportiert zu werden. Sind die gebildeten Oligomere jedoch zu groß dafür, sinkt das $A\beta$ -Level wieder und der Abtransport des überschüssigen $A\beta$ ist inhibiert.

Ein bereits weitgehend untersuchter Biomarker im Urin ist das Neural Thread Protein (NTP), welches nach Reinigung über einen monoklonalen Antikörper im ELISA-Format detektiert wird. NTB ist ein Phosphoprotein, dessen 15 bis 18 kDa Spezies in Neuronen während der Zellproliferation und Differenzierung exprimiert wird. Die 21 kDa und 38 bis 42 kDa Spezies hingegen werden während der Neurodegeneration im Gehirn von AD-Patienten überexprimiert und akkumulieren (de la Monte et al., 1997). Eine veröffentlichte Studie belegt die Detektion von NTB in 91 % der Patienten mit wahrscheinlicher AD und 49 % mit MCI, während unter den Probanden ohne AD 91 % ein normales NTB-Level zeigten (Goodman, 2008). Es

bleibt jedoch unklar, in wie fern mittels dieser so genannten *AlzheimerAlert*-Methode zwischen verschiedenen Formen von Demenz unterscheiden werden kann. Die Unterscheidung von AD-Patienten und Patienten mit Parkinson'scher Demenz konnte bereits anhand ihrer NTB-Konzentration im Morgenurin gezeigt werden (Youn, 2011).

Die zurzeit untersuchten AD-Biomarker treten zu einem großen Teil auch in anderen Formen von Demenz oder in kognitiv normalen Personen gleichen Alters auf, was eine Abgrenzung der AD allein durch die Biomarker-Detektion schwierig macht. Dennoch wird durch die Kombination der drei Hauptbiomarker p-tau, t-tau und A β ₁₋₄₂ eine Sensitivität und Spezifität von 81 bis 90 % für die AD Diagnose erreicht (Bombois et al., 2013).

In der nahen Zukunft sollen bildgebende Verfahren, durch die Visualisierung von strukturellen Veränderungen im Gehirn und die biochemische Analyse der Konzentration verschiedener Biomarker in Körperflüssigkeiten für die optimale Diagnose und Verfolgung von Therapieverläufen in der AD sorgen.

1.3.3 Detektion von A β -Oligomeren als Biomarker

A β -Oligomeren wird mittlerweile die zentrale Rolle in der Pathogenese der AD zugesprochen. Zur ihrer spezifischen Detektion aus Liquor wurden verschiedene Ansätze veröffentlicht, die weitestgehend auf der Immundetektion der A β -Spezies basieren.

Während Standard-ELISA-Verfahren die Gesamtmenge an A β _{1-40/42}, bestehend aus Monomeren und höher molekularen Strukturen messen, kann die Detektion mittels zweier monoklonaler Anti-A β Antikörper zu einer Spezifität gegenüber oligomeren A β -Strukturen führen. Fänger- wie auch Detektions-Antikörper binden am gleichen Epitop, weshalb die zu detektierende A β -Spezies mindestens zwei zugängliche Epitope bereitstellen muss (Xia et al., 2009).

Auch die Anwendung Oligomer-spezifischer Antikörper im ELISA wird auf ihre Spezifität hin untersucht. Hier werden monoklonale Anti-A β -Antikörper, die gegen Oligomer-spezifische Regionen der A β ₁₋₄₂-Oligomere binden, im sandwich-ELISA benutzt (Yang et al., 2015).

Weitere publizierte Verfahren zur Detektion von A β -Oligomeren sind beispielsweise die Anwendung von Durchflusszytometrie in Kombination mit Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Analyse (FRET) (Santos et al., 2007), Konformations-spezifische Oligomer-Anti-A β -Antikörper in einem Nanopartikel-Assay (Georganopoulou et al., 2005), sowie eine Reihe von ELISA Formaten, basierend auf dem 'Sandwich'-Prinzip (Bruggink et al., 2013; Herskovits et al., 2013; Hölttä et al., 2013).

Einige der ELISA-Verfahren zeigten einen erhöhten Level an A β -Oligomeren in AD Proben im Vergleich zu Kontrollproben, welcher jedoch meistens sehr gering, bzw. nicht signifikant ist. Hölttä et al. (2013) zeigten anhand von sandwich-ELISA-Messungen eine signifikant erhöhte Konzentration an A β -Oligomeren in Liquor von Patienten mit milder oder moderater AD gegenüber Kontroll-Probanden, wohingegen der Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der AD-Patientengruppe durch eine starke Überlappung nicht mehr signifikant war. Auch Yang et al. (2015) beschrieben im sandwich-ELISA mit Oligomer-spezifischem Antikörper eine Überlappung zwischen Kontroll-, MCI- und AD-Gruppe bei der Detektion von A β -Oligomeren in Liquor, wohin gegen die Messungen von t-tau, p-tau und A β ₁₋₄₂ eine klare Unterscheidung zwischen AD- und Kontrollproben ermöglichte.

Auch wenn A β -Oligomere vielversprechende Biomarker in der AD darstellen, bleibt ihre Quantifizierung eine Herausforderung, da ihre Konzentration im Liquor sehr gering im Vergleich zu der Konzentration der Monomere ist, und die bisher etablierten Messmethoden noch nicht sensitiv genug sind (Blennow et al., 2010).

1.3.4 Standardisierung von Detektionsmethoden

Zurzeit ist eine Vielzahl an Detektionsmethoden für A β -Oligomere in der Entwicklung und es ist enorm wichtig, sie miteinander vergleichen und Aussagen über ihre Inter-/Intra-Assay-Variabilität treffen zu können. Dazu bedarf es standardisierter Methoden, die beispielsweise Fragen zur 'spike-recovery', der Sensitivität, dem Detektionslimit und der Linearität von Verdünnungsreihen in den jeweiligen Assays beantworten. Voraussetzung dafür ist wiederum der Einsatz eines geeigneten und einheitlichen Standardmoleküls von stabiler und definierter Größe mit den entsprechenden A β -Epitopen zur Detektion in den Assays. Bisher werden in der Regel Oligomere oder ADDLs (A β -derived diffusible Ligands) aus synthetischem A β hergestellt. Bei ADDLs handelt es sich um 8 bis 12 nm große A β -Aggregate bestehen aus bis zu 24 Monomeren, die nach ihrer aufwendige Synthese in einem heterogenen Gemisch aus Monomeren, kleinen Oligomeren und Spezies mit einem Molekulargewicht von über 90 kDa vorliegen (Freir et al., 2011). Nach der Aggregation des monomeren A β werden die A β -Konformationen durch verschiedene Reinigungsschritte anhand ihrer Größe getrennt. Für dieses Verfahren gibt es keine einheitliche Vorgehensweise. Die Separation geschieht durch Filtration, Dialyse oder Größenausschlusschromatographie (Barghorn et al., 2005; Savage et al., 2014), wodurch es vermutlich schon zu stark unterschiedlichen Ausgangs-Oligomeren kommt, welche durch ihre voranschreitende Aggregation in wässriger Lösung zu weiteren Ungenauigkeiten führen und so den Vergleich verschiedener Messungen und die Gegenüberstellung verschiedener Verfahren verhindert.

1.3.5 sFIDA

sFIDA steht für 'surface-based fluorescence intensity distribution analysis' und beschreibt eine Methode, die der Diagnose verschiedener Proteinfehlfaltungserkrankungen anhand der sensitiven und spezifischen Quantifizierung von Proteinaggregaten und Oligomeren dient. Die Entwicklung des Verfahrens basiert auf einer von Birkmann et al. (2006) beschriebenen Methode zur Detektion von Prion-Proteinen (PrP) in Hirnhomogenaten von BSE-infizierten Rindern und Scrapie-infizierten Hamstern. Die PrP-Aggregate wurden mittels zweier unterschiedlicher Fluoreszenz-markierter Anti-PrP Antikörper markiert und mittels Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) im 2-Kanal Modus vermessen. Als spezifisches Signal wurden Ereignisse gewertet, die in beiden Kanälen detektiert werden konnten. Die Auswertung dieser Messungen wurde als 'Fluorescence-Intensity-Distribution-Analysis' bezeichnet.

Ein Jahr später veröffentlichten Birkmann et al. (2007) eine sensitivere Weiterentwicklung des Verfahrens, indem sie die PrP-Aggregate mithilfe eines PrP-spezifischen Fänger-Antikörpers auf einer Glasoberfläche immobilisierten. Dadurch wurden die Nachteile umgangen, dass die großen PrP-Aggregate nur sehr langsam diffundierten oder sogar zu Boden sanken und somit einer Detektion mittels FCS nicht mehr zugänglich waren. Nach der Markierung der PrP-Aggregate mit Hilfe der unterschiedlichen Fluoreszenz-markierten, Anti-PrP Detektions-Antikörper auf der Glasoberfläche wurden die Proben fluoreszenzspektroskopisch vermessen, indem die Oberfläche abgescannt wurde. Durch Kreuzkorrelation der beiden Kanäle konnte die Anzahl kolokalisierter Signal auf der Oberfläche bestimmt werden. Dieses Verfahren wurde 'surface-based fluorescence intensity distribution analysis', kurz sFIDA genannt.

Funke et al. (2007) veröffentlichten die sFIDA-Methode erstmals im Jahre 2007 in der Alzheimer-Diagnostik zum Nachweis von A β -Oligomeren in Liquorproben von AD-Patienten. Zur sensitiven Quantifizierung von A β -Oligomeren wurden die

verwendeten Fänger- und Detektions-Antikörper so ausgewählt, dass ihre Epitope überlappten. Dadurch konnte verhindert werden, dass Monomere, die in hohem Maße im Liquor gesunder Menschen zu finden sind, auf der Oberfläche immobilisiert und gleichzeitig detektiert werden. Oligomere hingegen bieten mehrere Epitope, durch die sie sowohl immobilisiert, als auch detektiert werden können. Mit Hilfe der sFIDA-Methode konnte eine erhöhte Anzahl kolokalisierter Signale in den Liquorproben der AD-Patienten, im Vergleich zu Kontrollproben detektiert werden.

Nach der Umstellung der sFIDA-Methode auf Laser-scanning Mikroskopie (LSM) (Funke et al., 2010) wurde 2013 die Optimierung der Oberfläche und die Analyse von Liquorproben von AD-Patienten und Kontrollspendern veröffentlicht (Wang-Dietrich et al., 2013). Es wurde beschrieben, dass die Glasoberfläche mit einer Dextran-Matrix funktionalisiert wurde, wodurch unspezifische Wechselwirkungen der Proben mit der Glasoberfläche verhindert werden sollen. Im nächsten Schritt wurde der Fänger-Antikörper kovalent an die Dextranoberfläche gebunden. Nach der Probeninkubation wurden zwei unterschiedliche Fluoreszenz-markierte anti-A β Antikörper zur Detektion der A β -Oligomere auf die Oberfläche gegeben (siehe Abb. 1-3). Bei der Vermessung am LSM wurde die Oberfläche ebenfalls in zwei Farbkanälen abgescannt. Die Auswertung der von der Oberfläche erhaltenen Bilddaten ergibt den sFIDA readout, welcher die Anzahl der kolokalisierten Pixel oberhalb des Hintergrundsignals zählt. Bei der Analyse von Liquor-Proben mit Hilfe der sFIDA-Methode konnte ein signifikanter Unterschied im sFIDA readout zwischen AD-Patienten und Kontrollproben festgestellt werden.

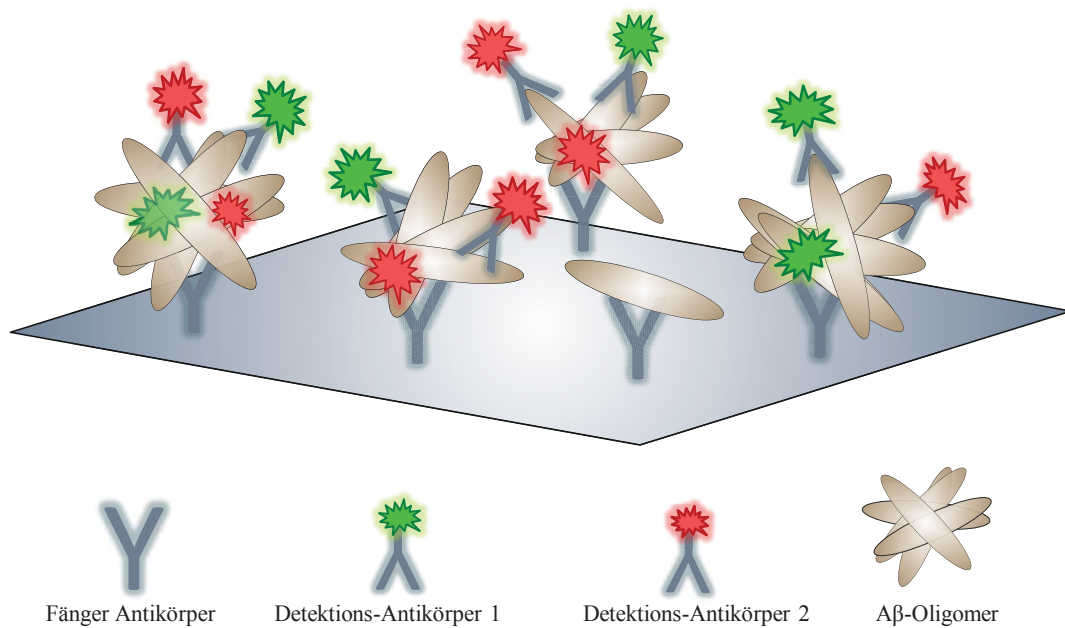


Abbildung 1-3: sFIDA Oberfläche

Kovalent an die Dextran-beschichtete Glasoberfläche gebundene Fänger-Antikörper interagieren mit den in der Probe vorhandenen A β -Oligomeren. Die Detektions-Antikörper sind mit zwei verschiedenen Fluorochromen markiert und wechselwirken ebenfalls mit den entsprechenden Epitopen auf der Oligomer-Oberfläche. Nach anschließender Zweifarb-Fluoreszenzmikroskopie zur Detektion der zwei verwendeten Fluorochrome, werden nur die kolokalisierten Pixel gewertet, deren Graustufenwert sich oberhalb eines Schwellenwertes befindet.

1.4 Oberflächenfunktionalisierungen von Glas

1.4.1 Polymerbeschichtungen zur Kontrolle unspezifischer Proteinadsorption auf Glasoberflächen

Die Interaktion von Biomolekülen und Oberflächen spielt eine große Rolle in verschiedenen analytischen Systemen, wie Immunoassays, Microarrays, Biosensoren oder Microfluid-Systemen. Auch für biomedizinische Gegenstände wie Katheter, Kontaktlinsen oder Membranen ist die genaue Kontrolle der Interaktionen zwischen Biomolekülen und der Oberfläche wichtig.

Zur Kontrolle unspezifischer Proteinadsorption an Oberflächen werden diese häufig mit Polymerbeschichtungen aus Polyethylenglykol (PEG) oder Polyethylenoxid (PEO) versehen. Durch deren Neutralität, hohe Hydrophilie und Beweglichkeit kommt es zu abstoßenden Wechselwirkungen mit den Biomolekülen. Eine weitere Gruppe von sogenannten 'low-fouling'-Beschichtungen besteht aus Polysacchariden, wie Hyaluronsäure oder Dextran. Hierbei handelt es sich um hydratisierte, flexible und natürlich vorkommende Polymere, deren Protein-abstoßende Wirkung ähnlich zu der von PEG ist. Die hohe Konzentration an Hydroxygruppen ermöglicht des Weiteren eine Funktionalisierung mit funktionellen Gruppen ohne die hydrophilen Eigenschaften des Polymers zu beeinträchtigen.

Es wird zwischen zwei Modellen unterschieden, die die Verhinderung der Proteinadsorption mittels Polymerbeschichtung erklären:

- Das Modell der sterischen Repulsion beschreibt, dass es durch die Interaktion der beschichteten Oberfläche mit Proteinen zur Kettenkompression und Desolvatation der Polymerschicht kommt, was wiederum von der Schichtdicke und dem Grad der Beschichtung abhängt. Der dadurch entstehende Entropieverlust ist nicht begünstigt, weshalb die Proteine davon abgehalten werden mit der Oberfläche zu interagieren (Jeon et al., 1991).

- Die zweite Interpretation erklärt die Proteinabstoßung durch Wechselwirkungen der Wassermoleküle an der Grenzfläche. Auf Grund der hydrophilen Eigenschaften der Polymere kommt es zu starken Wechselwirkungen mit Wasser, was zu einer Art geordneten, stabilen Wassergrenzphasenschicht führt, welche die unspezifischen Wechselwirkungen der Biomoleküle mit der Oberfläche verhindern (Harder et al., 1998).

1.4.2 Oberflächenfunktionalisierung von Glas zur Biomolekül-Bindung

Glas ist sehr temperaturbeständig, leicht zu reinigen und sehr gut in der Mikroskopie einsetzbar und stellt daher eins der am meisten verwendeten Oberflächenmaterialien in der Entwicklung von Protein-Assays, Biosensoren und Microarrays dar.

1.4.2.1 Reinigung und Aktivierung von Glasoberflächen mittels Plasma

Zur kovalenten Bindung von Polymeren oder Biomolekülen auf Glas ist der erste Schritt eine Aktivierung der Oberfläche, um das chemisch inerte Material angreifbar zu machen. Neben verschiedenen flüssig-chemischen Varianten, ist die Plasma-Behandlung ein einfaches und sehr effektives Verfahren zur Aktivierung von Glasoberflächen. Plasma wird als der vierte Aggregatzustand beschrieben. Hier wird Gasmolekülen im Vakuum Energie zugeführt, was dafür sorgt, dass sich das atomar-molekulare Teilchengemisch weiter zu Atomen, Ionen, Elektronen und Radikalen aufspaltet (Hancock, 1995). So entstehen im Wasser-Plasma beispielsweise H^+ , OH^- und $O^\bullet$ Ionen und Radikale, welche die Glasoberfläche aktivieren. Neben der Aktivierung der Glasoberfläche werden auch vorhandene, organische Unreinheiten auf der Oberfläche oxidiert und zersetzt (Krüger et al., 1999).

1.4.2.2 Aminierung von Glasoberflächen

Ein weit verbreitetes Verfahren zur Oberflächenfunktionalisierung von Glas, oder im Allgemeinen Siliziumoxid-Verbindungen, ist die Aminierung. Eine aminierte Glasoberfläche stellt eine effektive Plattform zur Reaktion mit Biomolekülen oder Polymeren zur Verfügung (Riener et al., 2003). In vielen Veröffentlichungen werden hierzu standardmäßig Aminosilan-Verbindungen eingesetzt, von denen APTES (3-Aminopropyltriethoxysilan) eins der am häufigsten Verwendeten ist (Weetall, 1993).

Die Silanisierungsreaktion von APTES wird über die Hydrolyse des Silans initiiert und endet in der Ausbildung einer kovalenten Si-O-Si-Bindung zwischen Glasoberfläche und APTES durch eine Kondensation (siehe Abb. 1-4) (Silberzan et al., 1991).

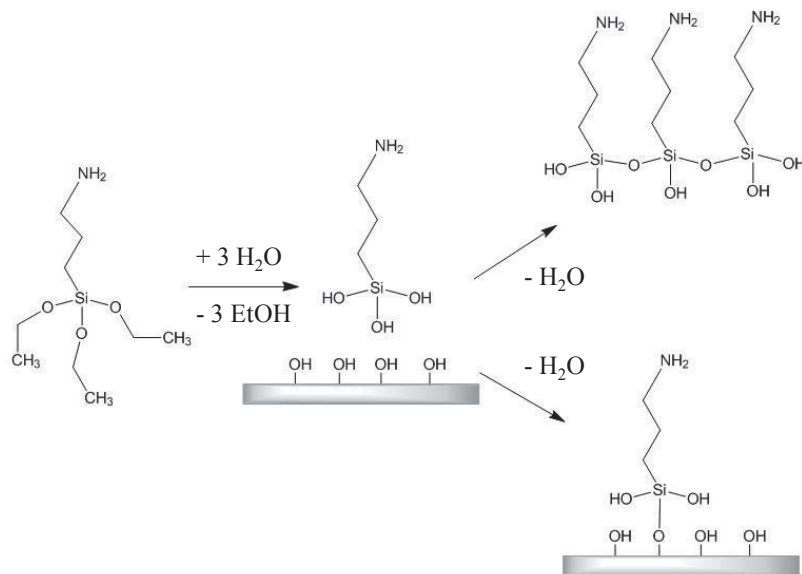


Abbildung 1-4: Reaktionsmechanismus von APTES auf Glasoberfläche

In Anwesenheit von Wasser kommt es zu einer Hydroxylierung von APTES unter Ausschluss von Ethanol. Durch eine anschließende Kondensationsreaktion, welche durch Erhitzen der Oberfläche beschleunigt werden kann, kann es zur kovalenten Bindung von APTES an die Glasoberfläche kommen. In Anwesenheit von viel Wasser in der Lösung kann es auch zu einer Polymerisation der hydroxylierten APTES-Moleküle untereinander kommen.

Die Hydrolyse kann in Lösung oder auf der Substratoberfläche stattfinden. Ist der Wasseranteil im System zu hoch, kommt es zu einer starken Polymerisation des APTES in Lösung (siehe Abbildung 1-4), während die Abwesenheit von Wasser zu einer unvollständigen APTES-Beschichtung führt. APTES kann in Lösung als Zwitterion vorliegen. Die primäre Amin-Gruppe kann mit den APTES-eigenen oder mit den Hydroxygruppen auf der Oberfläche wechselwirken und Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden. Durch Trocknen bzw. Aushärten der Probe bei Raumtemperatur oder höher Temperaturen werden die entstandenen H-Brückenbindungen gebrochen und es kommt zur gewünschten Kondensation und kovalenten Bindung von APTES auf der Oberfläche.

Über die Silan-Abscheidung wurde aus verschiedenen Flüssigkeiten, sowie aus der Gasphase berichtet (Voort and Vansant, 1996).

- Zur Silanisierung aus der Flüssigphase werden meist Lösungsmittelgemische wie Wasser/Ethanol oder Wasser/Aceton (30 % / 70 %) genutzt. Im Kontakt mit Wasser werden die Silanseitengruppen, zB. Ethoxygruppen beim APTES, hydroxyliert. Die entstandenen Silanolgruppen bilden H-Brückenbindungen zu benachbarten hydroxylierten Silanen und zu den Silanolgruppen auf der Glasoberfläche aus. Durch eine Kondensationsreaktion werden Si-O-Si Bindungen unter Ausschluss von Wasser ausgebildet, wodurch ein dreidimensionales Polymernetzwerk auf der Oberfläche gebunden wird. Die Polymerisation in Anwesenheit von Wasser ist schwierig zu kontrollieren und es entstehen unreproduzierbare und vielschichtige Polymerschichten. Das Silan ist häufig nur durch elektrostatische Wechselwirkungen auf der Oberfläche fixiert und kann erst durch Erhitzen zur kovalenten Bindung an die Oberfläche mittels Kondensation gezwungen werden. Durch Trocknen bei Raumtemperatur bindet APTES zwei Si-O-Si Bindungen aus, während Erhitzen auf bis zu 150 °C zur Bildung von drei Si-O-Si Bindungen führt.
- Bei der Abscheidung aus komplett trockenem Lösungsmittel wird die Hydrolyse verhindert und somit auch die ungewollte Polymerisation der Silan-Moleküle untereinander, jedoch kann es in diesem Fall nur durch einen Aushärtprozess zur kovalenten Bindung des Silans an die Oberfläche kommen (Weetall, 1993). Ein anderer Weg zur direkten Kondensation kann durch Katalyse mit einem Amin geschehen. Hier wird nicht einmal mehr das anschließende Aushärten benötigt, um eine Monolage des Silans kovalent an die Oberfläche zu binden.

Die Reaktion von Aminosilanen, wie APTES ist eigenkatalysiert. Durch die Ausbildung von H-Brückenbindungen zwischen dem Amin und den Silanolgruppen der Oberfläche kommt es zu einer schnellen Adsorption des Aminosilans an die Oberfläche, gefolgt von einer direkten Kondensation. Die Anwesenheit einer Base beschleunigt die Reaktion jedoch (Ebner et al., 2007; Vandenberg et al., 1991). Die Base substituiert eine Ethoxygruppe, wobei

eine penta-koordinierte Zwischenstufe bei Angriff der Hydroxygruppe gebildet wird (siehe Abb.1-5) (Kinkel and Unger, 1984) .

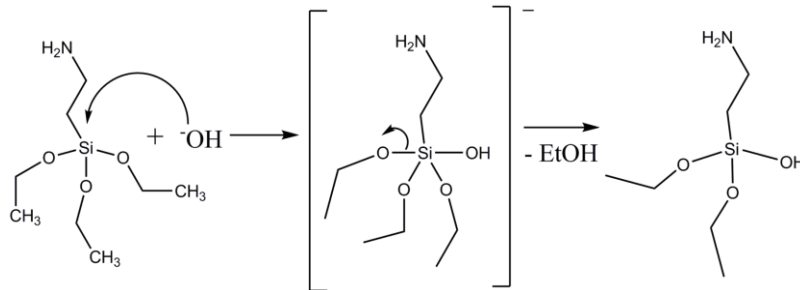


Abbildung 1-5: Basenkatalysierte Hydroxylierung von APTES

Die Base greift am elektropositiven Silan an und eine penta-koordinierte Zwischenstufe entsteht. Durch Ausschluss von Ethanol bildet sich das hydroxylierte APTES.

- Bei der Abscheidung des Silans aus der Gasphase kommt es zu ähnlichen Hydrolyse- und Kondensationseigenschaften wie aus dem trockenen organischen Lösungsmittel, allerdings kann bei der Gasphasenabscheidung tatsächlich von der Ausbildung einer Monolage ausgegangen werden (Vandenberg et al., 1991).

Eine weitere in der Literatur beschriebene Variante zur Aufbringung von primären Amingruppen auf Silica-Oberflächen ist die Veretherung mit Ethanolamin (siehe Abb. 1-6).

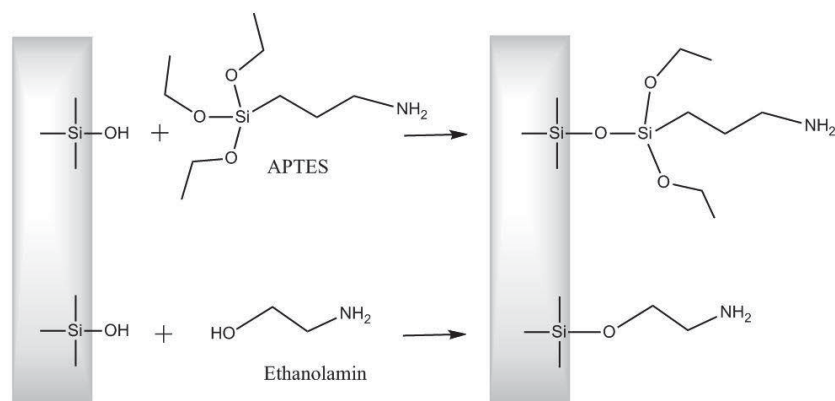


Abbildung 1-6: Schematische Darstellung der Bindung von APTES und Ethanolamin auf Glas

Bei der Reaktion von Ethanolamin auf der Glasoberfläche wird bei trockenen Reaktionsbedingungen eine Si-O-C Bindung zwischen dem C-Atome der Alkoholgruppe des Ethanolamins und der Silanolgruppe der Glasoberfläche unter Ausschluss von Wasser gebildet. Die Reaktion aus trockenem Lösungsmittel ist hier besonders wichtig, da die Hydrolyse der Silanolgruppen auf der Oberfläche eine Konkurrenzreaktion zur Veretherung darstellt (Barattin and Voyer, 2011; Ebner et al., 2007).

1.5 Nanopartikel

1.5.1 Nanopartikel und ihre biologische Bedeutung

Der Begriff Nanotechnologie (altgriechisch: nanos = Zwerg) beschreibt die Erforschung von Strukturen im Nanometerbereich. Das Hauptfeld der Nanotechnologie ist die Herstellung und Entwicklung von Nanopartikeln, welche aus verschiedenen Materialien und bis zu einer minimalen Größe von einem Nanometer synthetisiert werden können.

Durch die zunehmende Aufklärung molekularer Prozesse in verschiedenen Krankheiten, basiert auch ihre Diagnose immer mehr auf der Detektion individueller, chemischer Prozesse und Interaktionen in immer kleineren Kompartimenten, wie beispielsweise Zellen, Proteinen, Peptiden oder DNS. Diese Detektions- und Therapieziele haben Größen im Nanometerbereich und führen zu einer neuen Ära medizinischer Diagnostik und zielgerichteter Therapie basierend auf nanotechnologischen Entwicklungen (Wang et al., 2008). Ein zurzeit in der Biochemie hochinteressantes Thema ist die Forschung an biokompatiblen Nanopartikeloberflächen und ihr Einsatz in der biochemischen Analyse, als Biosensoren oder Biomarker (Qhobosheane et al., 2001).

Nanopartikel, wie Quantum Dots (QD), Metall-Nanopartikel, Polystyrol-Nanopartikel oder Silica-Nanopartikel (SiNP) bestehen aus Polymeren oder anorganischen Materialien. QD werden in vielfältiger Weise als fluoreszente Marker im 'cell imaging' oder 'cell tracking' eingesetzt. Sie zeichnen sich durch eine sehr kleine Größe zwischen 1 und 10 nm Durchmesser, eine starke Leuchtkraft (20-mal heller als die meisten organischen Fluoreszenzfarbstoffe), eine hohe Quantenausbeute und Photostabilität aus. Jedoch limitieren toxische Eigenschaften, aufgrund ihres Schwermetall-Kerns ihre *in vivo* Anwendungen. Des Weiteren sind QDs nicht wasserlöslich, so dass eine weitere Funktionalisierung ihrer Oberfläche nötig ist, um sie in biologischen Anwendungen einzusetzen. Zusätzlich tritt bei QD

das sogenannte ‚blinking‘ auf, d. h. die Partikel emittieren das Licht diskontinuierlich, was ihren Einsatz zur Einzelmolekülanalyse schwierig macht.

Polystyrol-Nanopartikel finden kaum Anwendung in biologischen Bereichen, da sie sehr hydrophob sind, was zu einem starken Aggregationsverhalten in wässrigen Lösungen führt. Des Weiteren erschwert ihre geringe Dichte von ca. $1,05 \text{ g/cm}^3$ ihre Trennung aus Flüssigkeiten.

Metall-Nanopartikel bestehen beispielsweise aus Gold, Palladium, Platin, Titan oder Rhodium. Ihre Toxizität auf den Organismus ist weiterhin fraglich und ihre biologische Anwendung bleibt ein kontroverses Forschungsfeld.

Im Allgemeinen ist die Toxizität von sämtlichen Nanopartikeln auf den menschlichen Körper noch nicht geklärt. Die Lunge wird als wahrscheinlichste Aufnahmestelle von Nanopartikeln angesehen, die Aufnahme über die Haut oder den Verdauungstrakt ist jedoch auch möglich. Es wird von drei Hauptfaktoren für die Toxizität von Nanopartikeln im Körper ausgegangen. (1) die chemische Reaktivität und intrinsische Toxizität des Nanopartikel-Materials, (2) das große Oberflächenvolumen, was den Kontakt zu Zellen ermöglicht und (3) die Morphologie der Partikel (Donaldson et al., 2004). In wässriger Lösung tendieren viele Nanopartikel aufgrund ihrer Morphologie, Hydrophobizität oder ihres Zeta Potentials zur Aggregation, ein Prozess, der nur sehr schwer zu kontrollieren ist und großen Einfluss auf den Organismus haben kann.

1.5.2 SiNP

In der Nanotechnologie nehmen SiNP, bestehen aus Siliziumoxid-Einheiten, aufgrund ihrer anpassbaren Größe (7 bis 1000 nm), ihrer geringen Toxizität, ihren spezifischen, optischen Eigenschaften, geringen Dichte ($1,85 \text{ g/cm}^3$) (Masalov et al., 2011) und hohen thermischen Stabilität eine dominierende Rolle ein. Ihre spezifische

Oberflächenbeschaffenheit zeichnet sich durch eine poröse Struktur mit einheitlicher Porengröße und einer hohen Absorptionsfähigkeit aus (Singh et al., 2014).

1.5.3 Synthese und Modifikation von SiNP

Die am häufigsten benutzte Methode zur Synthese von SiNP ist die Stöber-Synthese (Stöber et al., 1968). Die Stöber-Methode beschreibt die Hydrolyse und Kondensation von TEOS (Tetraethylorthosilicat) in Ethanol, in Anwesenheit von Wasser und Ammoniak als Katalysatoren (siehe Abbildung 1-7). Durch die Anpassung der Eduktmengen können die chemischen und physikalischen Eigenschaften der SiNP, wie ihre Größe, Porigkeit, Monodispersität und kolloidale Stabilität angepasst werden, um verschiedenen Anforderungen zu dienen.

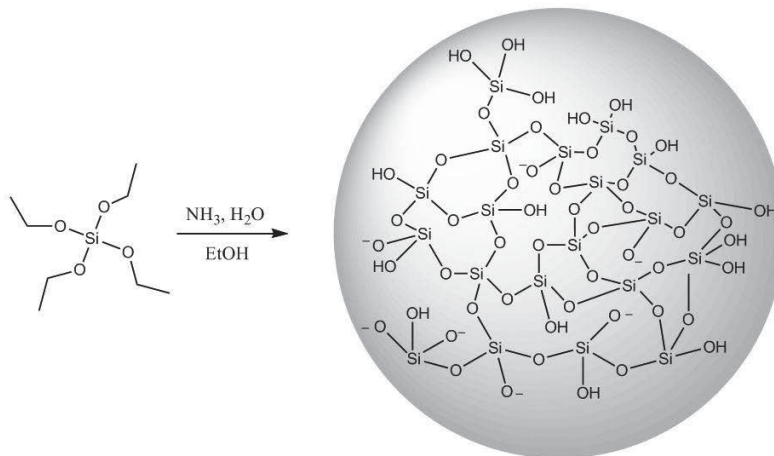


Abbildung 1-7: Schematische Darstellung des Stöber-Prozesses

Hydrolyse und Kondensation von TEOS (Tetraethylorthosilicat) in Ethanol, in Anwesenheit von Wasser und Ammoniak als Katalysatoren.

In der Literatur wird zwischen zwei Modellen unterschieden, welche die Bildung der SiNP beschreiben (Korzeniowska et al., 2013). In dem Modell der Monomer-Addition kommt es zu zwei Synthese-Schritten. Zunächst die Ausbildung des Nanopartikel-Kerns, gefolgt von dem Partikelwachstum, während dessen sich die hydrolysierten Monomere an den Kern anlagern.

Das Modell der kontrollierten Aggregation beschreibt die Bildung von Sub-Partikeln, die sich im darauffolgenden Schritt zum finalen Partikel zusammenlagern. Trotz der unkomplizierten und effizienten Reaktion, ist es sehr schwierig eine SiNP-Population mit einer Monodispersität < 4 bis 5% bei einer Größe $< 120\text{ nm}$ zu synthetisieren.

Eine alternative Vorgehensweise zur Synthese von SiNP ist die Mikroemulsions-Methode. Hier finden die Hydrolyse und Kondensation an der Grenzphase eines von einer Mizelle stabilisierten Wassertropfens in einer Ölphase statt. Zur Bildung der Mizellen können verschiedene grenzflächenaktive Stoffe (Tensiden), wie beispielsweise lineare oder verzweigte, geladene oder ungeladene Moleküle genutzt werden, welche einen signifikanten Effekt auf den Nukleations- und Wachstums-Prozess der Partikelsynthese haben. Durch die Mikroemulsions-Methode kann zwar eine höhere Monodispersität, im Größenbereich zwischen 30 und 60 nm , als durch die Stöber-Methode erreicht werden, allerdings ist durch die hohe Menge an grenzflächenaktiven Stoffen eine aufwendige Reinigung der SiNP nötig.

Mittels beider Methoden können Farbstoffmoleküle in den SiNP eingebaut werden, was sie in 'imaging'-Anwendungen nutzbar macht. Die Bindung des Farbstoffes basiert im Fall der Microemulsions-Methode lediglich auf sterischen Wechselwirkungen der wasserlöslichen polaren Farbstoffe mit dem negativ geladenen Partikel, so dass der Farbstoff mit der Zeit ausgewaschen werden kann. Bei der Stöber-Methode wird der Farbstoff vorher an ein Aminosilan gebunden und anschließend den Edukten der Kondensationsreaktion zugesetzt, was zum kovalenten Einbau der Farbstoffmoleküle in das Siliziumdioxid-Netzwerk der SiNP führt. Auf gleiche Weise können auch anderen Materialien, wie Eisenoxide zur Herstellung magnetischer SiNP, zugegeben werden.

Die Einführung funktioneller Gruppen auf der Partikeloberfläche (Amine, Thiole, Carboxygruppen) kann durch eine Silianisierung der SiNP-Oberfläche mit einem entsprechend funktionalisierten Silan realisiert werden. Auf diese Weise können die Eigenschaften des SiNP geändert werden, und er kann als Plattform für die Bindung

von Biomolekülen, wie Dextran, Antikörpern, DNS oder Peptiden dienen. Die kovalente Bindung zwischen Partikeloberfläche und Biomolekül kann durch EDC/NHS-Kopplung oder Disulfid-Kopplung geschehen.

1.5.4 Biologische Anwendung von SiNP

SiNP finden ein breites Anwendungsfeld in verschiedenen Bereichen der biologischen Forschung.

In der HPLC-Technik dienen SiNP aufgrund ihrer Netzwerkfähigkeit, Zugänglichkeit, definierten Porengröße und großen Oberfläche als Säulenmaterial der stationären Phase. In der Biosensortechnik können SiNP die Sensitivität und Reaktionszeit des Sensors durch ihre starke Porosität erhöhen, indem in kürzester Zeit eine große Menge an 'sensing'-Molekülen auf der Partikeloberfläche eingeschlossen werden kann, was für eine schnelle Reaktionszeit und ein niedriges Detektionslimit sorgt.

Speziell in der biomedizinischen Nutzung dienen SiNP als Detektionssonden, dem Enzym-Transport oder zur kontrollierten Wirkstoffabgabe und können von Zellen aufgenommen werden (Bitar et al., 2012).

Durch ihre zahlreichen Oberflächenfunktionalisierungsmöglichkeiten stellen SiNP eine häufig genutzte Plattform zur spezifischen Protein-Adsorption dar. So konnten mit Hilfe von SiNP membran-impermeable Proteine durch die Zellmembran geschleust werden. Hierzu wurde beispielsweise Cytochrom C in mesoporöse SiNP eingelagert, welche die Zellmembran passierten und das Protein anschließend im Zytoplasma freisetzen. Aktivitätstests zeigten, dass das Protein weiterhin seine Funktionen erfüllte (Slowing et al., 2007).

In einer weiteren Studie wurde die Oberfläche von Fluoreszenz-markierten SiNP mit Nickel-Komplexen (Ni^{2+} -NTA (Nitrilotriessigsäure)) funktionalisiert, so dass es zu Wechselwirkungen mit His-markierten Proteinen kommt, was ihre Aufreinigung

oder seitenspezifische Markierung mittels fluoreszenter Sonden ermöglicht. Bei Auswahl geeigneter Fluorochrome der Detektionssonden und im SiNP können FRET (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer) Signale induziert werden und somit die Bindung und Detektion des Proteins am Partikel bestätigen (Kim and Jeyakumar, 2007).

Auch in der Genetik ist Nanotechnologie ein sehr bedeutendes Forschungsfeld. Es wird an der Etablierung eines DNS-Biosensors auf Basis oberflächenfunktionalisierter SiNP gearbeitet. Eine kovalente Bindung von Oligonukleotiden an die SiNP-Oberfläche ist beispielsweise durch Disulfidbrückenbindung möglich, wobei die Partikeloberfläche mittels eines Mercaptosilans modifiziert wurde und die Oligonukleotide eine Disulfid Modifikation besitzen (Hilliard et al., 2002). Im Einsatz als DNS-Biosensor könnten komplementäre DNS- oder RNS-Sonden hybridisieren und die Fluoreszenzintensität auf den Oligonukleotid-funktionalisierten SiNP ausgelesen werden.

Durch den Einschluss von Metallen in den SiNP bekommt dieser magnetische Eigenschaften und kann durch Bindung an Proteine und Anlegen eines magnetischen Feldes der Aufreinigung der Proteine dienen. Magnetische SiNP werden beispielsweise in der DNS-Extraktion, Reinigung und Analyse eingesetzt (Bitar et al., 2012). Hier wurde gezeigt, dass Plasmid-DNS durch elektrostatische Wechselwirkungen an die SiNP-Oberfläche bindet und die Bindungsstärke vom Salzgehalt der Umgebung abhängt. Die Verwendung von magnetischen SiNP ist in der DNS-Extraktion bereits sehr etabliert. Für eine spezifischere Bindung von DNS an die Oberfläche können Amin-Funktionalisierungen auf der Oberfläche eingesetzt werden, wodurch die Adsorptionseffizienz deutlich gesteigert wird und DNS aus Blut oder Speichel mit einer hohen Effizienz und Spezifität durch Anlegen eines Magnetfeldes separiert werden kann (Kang et al., 2008).

In 'drug-delivery'-Systemen werden SiNP als Transportplattformen von Medikamenten benutzt. Die entsprechenden Wirkstoffe werden in den Partikel

eingeschlossen und die Oberfläche mit Erkennungssequenzen modifiziert, was eine zielgenaue Lokalisierung in bestimmten Zellen oder an bestimmten Rezeptoren ermöglicht (Barbé et al., 2004).

Die Aufnahme und Abgabe der Wirkstoffe hängt von ihrer Größe ab und ob die Poren der SiNP durch zugesetzte Nanopartikel geschlossen wurden. Lai et al. (2003) entwickelten ein System, in dem die Poren der SiNP nach Wirkstoffaufnahme durch CdS-Nanopartikel, welche durch Disulfidbindungen kovalent an den Poreneingängen gebunden sind, geschlossen wurden. Durch Reduktion der Disulfidbrücken wurden die Poren wieder geöffnet und der Wirkstoff an gewünschter Stelle entlassen.

Auch in 'imaging'-Anwendungen können SiNP durch ihre hohe Biokompatibilität, ihre leichte Modifizierbarkeit und ihren starken Kontrast überzeugen. So können beispielsweise Fluorochrome in den SiNP eingeschlossen werden und die äußere Hülle der Partikel kann so modifiziert werden, dass es zu einer spezifischen Markierung bestimmter Zellen oder Gewebe durch den fluoreszierenden SiNP kommt. Auch QDs können durch eine Silica-Hülle wasserlöslich und biokompatibel gemacht werden und zeigen aufgrund ihrer geringen Größe effiziente Transporteigenschaften zwischen Zellen (Bakalova et al., 2006).

In einer kürzlich von Lee et al. (2009) veröffentlichten Arbeit wurden Farbstoff dotierte SiNP mit Magnetit-Kristallen beschichtet, wodurch die Partikel einerseits durch Fluoreszenz sichtbar gemacht werden und andererseits in MRT-Aufnahmen als Kontraststoff dienen können. Die Poren der funktionalisierten SiNP wurden mit einem Krebs-Wirkstoff befüllt und ihre Aufnahme in Zellen wurde *in vitro* mittels Fluoreszenzmikroskopie und MRT-Aufnahmen bestätigt. *In vivo* konnte eine Akkumulation der Partikel am Tumor gezeigt werden und eine Anti-Tumor-Aktivität bestätigte die erfolgreiche Freisetzung des Wirkstoffes am Tumor.

Trotz vieler erfolgreicher Ergebnisse für die Anwendung von SiNP in der biomedizinischen Forschung bleiben einige Probleme bisher ungelöst. So ist noch immer ein hohes Maß an unspezifischen Bindungen der SiNP untereinander, an Glasoberflächen, oder in Form von Wechselwirkungen mit biologischem Material wie Zellen zu beobachten. Des Weiteren bleibt die Frage der Zytotoxizität ungeklärt, welche weiter erforscht werden sollte, bevor es zur intravenösen Verabreichung von SiNP in Patienten kommt (Wang et al., 2008). Es wurde gezeigt das unmodifizierte SiNP Hämolysen verursachen (Pomeroy and Filice, 1988), während modifizierte SiNP bereits erfolgreich in der Gentherapie eingesetzt wurden (Luo and Saltzman, 2006).

2 Aufgabenstellung

Die AD ist mit ca. 33 Millionen Betroffenen die häufigste Form der Demenz und es wird angenommen, dass sich die Anzahl der Erkrankten in den nächsten 40 Jahren verdreifacht. Eine genaue Diagnose der AD ist bisher erst nach dem Tod des Patienten möglich. Eine eindeutige und möglichst frühe Diagnose ist jedoch besonders für die Entwicklung geeigneter Medikamente und für eine effektive Therapie von großer Bedeutung.

Einer der vielversprechendsten Biomarker in der Diagnose der AD sind A β -Oligomere, welchen ein stark neurotoxischer Einfluss in der Krankheitsentstehung zugesprochen wird. Das sFIDA-Verfahren ermöglicht die sensitive und spezifische Quantifizierung von A β -Oligomeren.

In der vorliegenden Arbeit soll der A β -Oligomer-Gehalt in Körperflüssigkeiten und Hirnhomogenaten von transgenen und Wildtyp-Mäusen mit Hilfe des sFIDA gemessen werden und überprüft werden, ob eine Unterscheidung der beiden Gruppen anhand ihres sFIDA readouts möglich ist.

Des Weiteren soll die Glasoberfläche des im sFIDA verwendeten Multiwell-Chips optimiert werden, indem mittels verschiedener Silane eine Aminschiicht auf der Glasoberfläche immobilisiert wird. Diese Oberfläche soll auf ihre Homogenität und den Grad der Aminierung im Vergleich zur herkömmlichen Ethanolamin-Beschichtung mittels XPS und Kontaktwinkelanalysen untersucht werden. Darüber hinaus sollen die verschiedenen Oberflächenfunktionalisierungen innerhalb von sFIDA-Analysen miteinander verglichen werden. Es soll untersucht werden, mittels welcher Oberflächenfunktionalisierung ein sensitiverer Nachweis von A β -Oligomeren im sFIDA erreicht werden kann.

Das Hauptprojekt dieser Arbeit soll der Analyse und Entwicklung von Standardmolekülen für den Einsatz im sFIDA gelten. Ein passendes

Standardmolekül für die Immundetektion von A β -Oligomeren sollte die Anforderungen an eine definierte Größe, eine Langzeitstabilität ohne Dissoziation oder weitere Aggregation und die Kenntnis über die Anzahl seiner zugänglichen Epitope erfüllen und zur Validierung und Optimierung des sFIDA eingesetzt werden können.

Zunächst sollen kommerziell erhältliche, synthetische A β -Oligomere in Puffer und Liquor verdünnt werden und die Sensitivität ihrer Detektion im sFIDA überprüft werden.

Darüber hinaus sollen eigene Standardmoleküle entwickelt werden, die eine definierte Größe im Bereich nativer Oligomere und eine bekannte Anzahl an Epitopen zur Analyse im sFIDA aufweisen sollen. Nach mikroskopischen, spektroskopischen und biochemischen Analysen sollen die Standardmoleküle anhand von Verdünnungsreihen in biologischen Materialien im sFIDA quantifiziert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3-1: verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
1,5 ml Zentrifugenröhrchen für Ultrazentrifuge	Beckmann Coulter (Pasadena, USA)
15 ml Zentrifugenröhrchen	Sarsted (Nümbrecht, Deutschland)
50 ml Zentrifugenröhrchen	Sarsted (Nümbrecht, Deutschland)
Dialysemembran Spectral Por7 (MWCO 3500)	Spectrum Laboratories (Rancho Dominguez, USA)
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)	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)
Spritzen Ecoject Plus	Dispomed (Gelnhausen, Deutschland)
Spritzenfilter PVDF (0,22 µm)	Carl Roth (Karslsruhe, Deutschland)

3.1.2 Chemikalien und Puffer

Tabelle 3-2: verwendete Chemikalien und Puffer

Chemikalien und Puffer	Hersteller
(3-Aminopropyl)triethoxysilan (APTES)	Sigma- Aldrich (St. Louis,USA)
(3-Aminopropyl)dimethylethoxyilan (APMES)	ABCR GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC)	Fluka (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
Ammoniak-Lösung (30 %)	Carl Roth (Karlsruhe,Deutschland)
ATTO488 (NHS-Ester)	ATTO-TEC (Siegen, Deutschland)
ATTO647N (NHS-Ester)	ATTO-TEC (Siegen, Deutschland)
Bernsteinsäureanhydrid	Aldrich Chemistry (St. Louis,USA)
CM-Dextran sodium salt BioXtra	Sigma (St. Louis, USA)
Dimethylformamid (DMF)	AppliChem (Darmstadt,Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Dulbecco's PBS (10x)	GE-Healthcare (Chalfont St. Giles, Großbritannien)
Ethanol absolut	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Ethanolamin	Aldrich (St. Louis, USA)
Ethanolamin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Hexafluorisopropanol (HFIP)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
MES-Puffer	Sigma- Aldrich (St. Louis,USA)
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
N-Hydroxysuccinimid (NHS)	Aldrich Chemistry
PBS	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM KH ₂ PO ₄ , 10 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O (pH 7.4)
TBS	136 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 24.7 mM Tris (pH 7.4)
TBS-T	TBS + 0,05 % Tween
Tetraethylorthosilicate (TEOS)	Aldrich Chemistry (St. Louis,USA)
Triethylamin (TEA)	Sigma- Aldrich (St. Louis,USA)
Tris-Puffer	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Tween 20	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Wasser handelt es sich ausschließlich um Milli-Q-H₂O (hergestellt durch die Millipore-Anlage, Wasserwiderstand 18.2 MΩ cm). Alle Puffer, sowie das Wasser, wurden vor der Verwendung autoklaviert (20 Minuten, 1,2 bar, 121 °C).

3.1.3 Peptide und Antikörper

Tabelle 3-3: verwendete Peptide und Antikörper

Peptide/Antikörper	Hersteller
6E10	Covance (Princeton, USA)
IC16	Prof. Dr. Carsten Korth (Universität Düsseldorf, Deutschland)
Nab228	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
2MAP ((Aβ 1-11)-Lys-(Aβ 1-11)-Trp-Trp-Lys)	Jpt Peptide Technologies GmbH (Berling, Deutschland)
Abeta ₁₋₄₂	Bachem (Bubendorf, Schweiz)
CB-Oligomere	Crossbeta Biosciences (Utrecht, Niederlande)
Cys-Abeta ₁₋₄₀	Bachem (Bubendorf, Schweiz)

3.1.4 Geräte

Tabelle 3-4: verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Feinwaage AB54	Mettler-Toledo (Columbus, USA)
Lambda 25 UV/VIS Spectrometer	Perkin-Elmer Instruments (Waltham, USA)
Leica LSM-Mikroskop SP5 II	Leica Microsystems (Wetzlar, Deutschland)
Millipore-Anlage	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
pH-Meter MP 220	Mettler-Toledo (Columbus, USA)
Plasma Cleaner	2.6 l ZEPTO, diener electronics (Ebhausen, Deutschland)
Rotor TLA-55	Beckmann Coulter (Pasadena, USA)

Speedvac: Concentrator 5301	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
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)
Zentrifuge 5427 R	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
100 x Objektiv (HCX PLAPD 100x/1.47 Oil CORR TIRF)	Leica (Wetzlar, Deutschland)
63 x Objektiv (HCX PL APO 63x/1.20 W CORR CS, 0.14)	Leica (Wetzlar, Deutschland)

3.1.5 ZAT-Platten

Die in dieser Arbeit verwendeten Glasplatten für den sFIDA-Assay wurden selbst entwickelt und von der Zentralabteilung für Technologie (ZAT) des Forschungszentrums Jülich hergestellt und werden im Folgenden ZAT-Platten genannt. Hierbei handelt es sich um Vollglasplatten, deren Außenmaße den kommerziell erhältlichen Multiwellplatten entsprechen und sich daher perfekt in die vorgefertigten Rahmen der Mikroskope einpassen (siehe *Abbildung 3-1: ZAT-Platte*). Die vollständig gläserne Oberfläche lässt sich einheitlich chemisch modifizieren und eignet sich sehr gut zur Mikroskopie. Zur Herstellung werden zunächst 96 Löcher in 55 mm dicke Borosilicatglasplatten gebohrt. Diese Lochplatte wird im nächsten Schritt auf eine 0,17 mm dünne Borosilicatglasplatte geklebt, wobei das Einlaufen des Klebstoffes in die Lochinnenräume verhindert wird. Beim verwendeten Kleber handelt es sich um einen speziellen UV-Kleber, welcher durch Bestrahlung mit UV-Licht ausgehärtet wird und eine hohe chemische Resistenz besitzt. Die 96 Löcher werden im Folgenden Wells genannt, deren Bodenfläche die Basis für den sFIDA-Aufbau darstellt. Jedes Well hat einen Durchmesser von 3,5 mm, der Abstand der Well-Mittelpunkte beträgt 9 mm und die Oberfläche des Well-Bodens ist 9,6 mm² groß. Insgesamt fasst ein Well ein Volumen von 52,8 µl.

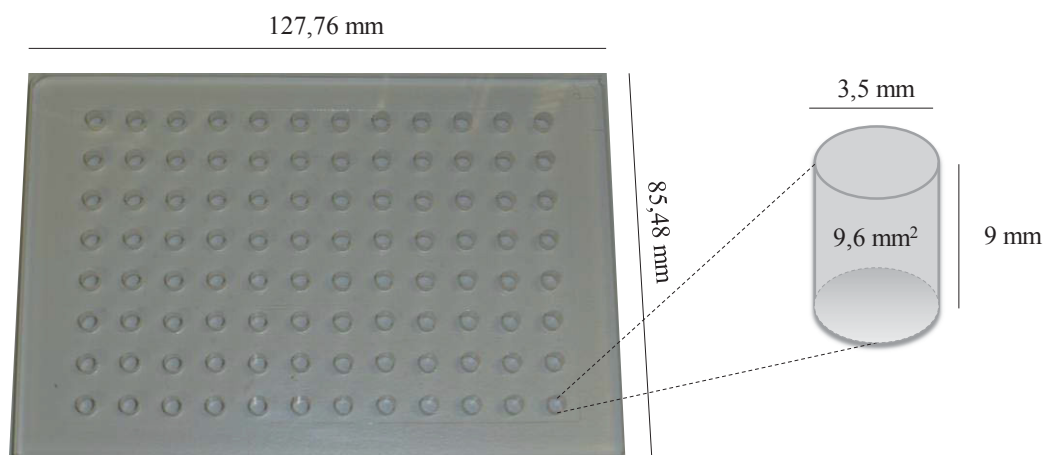


Abbildung 3-1: ZAT-Platte

3.1.6 Software

Tabelle 3-5: verwendete Software

Software	Hersteller/Entwickler
Adobe Photoshop 5 CS5	Adobe Systems (San Jose, USA)
Coral Draw	Coral Corporation (Ottawa, Kanada)
ChemDraw	Perkin Elmer (Watham, USA)
ImageJ	National Institutes of Health (Bethesda, USA)
LAS AF	Leica Microsystems (Wetzlar, Deutschland)
Microsoft Office 2010 (Word, Excel, Powerpoint)	Microsoft (Redmond, USA)
OriginPro 8.5.0	OriginLab Corporation (Northampton, USA)
sFIData	Johannes Willbold, Yvonne Herrmann

3.2 Methoden

3.2.1 Glasfunktionalisierung

3.2.1.1 Herstellung und Behandlung der Glasplättchen

Die verschiedenen Varianten der Glasfunktionalisierung wurden auf 0,17 mm dicken Glasplättchen durchgeführt, wie sie auch als Bodenplatten in den ZAT-Platten eingesetzt werden. Zur Kontaktwinkelanalyse wurden sie auf eine Größe von 5x5 cm und zur Röntgenphotoelektronenspektroskopie auf 1x1 cm zugeschnitten. Für die im Folgenden beschriebenen Behandlungen wurden die Glasplättchen mit Pinzetten transportiert und aufrecht in die jeweiligen Lösungen in die Bechergläser gestellt, um eine gleichmäßige Beschichtung beider Seiten der Glasplättchen zu gewährleisten.

3.2.1.2 Glasreinigung

Zur Reinigung wurden die Glasplättchen jeweils zehn Minuten in Toluol, Ethanol und Wasser sonifiziert, bevor sie für drei Stunden in 5 M NaOH eingelegt wurden. Im Anschluss wurden sie mehrfach mit Wasser abgespült und bei 80 °C im Trockenschrank getrocknet. Nach anschließender Plasma-Aktivierung war die Glasoberfläche zur weiteren Funktionalisierung bereit.

3.2.1.3 Aminierung von Glasoberflächen

Aminierung durch Ethanolamin

Zur Aminierung der Glasoberfläche mittels Ethanolamin wurde eine 5 M Ethanolamin-Lösung in DMSO hergestellt, in welche die gereinigten und aktivierten Glasplättchen über Nacht eingelegt wurden. Am nächsten Tag wurden die Glasplättchen mehrfach mit fließendem Wasser gewaschen und bei Raumtemperatur abgedeckt trocknen gelassen.

Aminierung durch Silanisierung aus der Flüssigphase

Die Aminierung der Glasplättchen durch Silanisierung wurde mittels APTES (3-Aminopropyl)triethoxysilan) aus Toluol und Ethanol und mittels APMES (3-Aminopropyl)dimethylethoxysilan) aus Ethanol getestet.

Dazu wurden die Glasplättchen über Nacht in jeweils 3- oder 7-prozentige Lösungen von APTES oder APMES in Ethanol oder Toluol eingelegt und am nächsten Tag mehrfach mit den jeweils verwendeten Lösungsmitteln und Wasser abgespült und anschließend für zwei Stunden bei 110 °C im Trockenschrank getrocknet.

Aminierung durch Silanisierung aus der Gasphase

Zur Silanisierung der Glasplättchen mit APTES aus der Gasphase wurden 1 ml APTES und 200 µl TEA (Triethylamin) in zwei abgetrennte Deckel von Mikroreaktionsgefäßen gegeben und auf den Boden eines Exsikkators gestellt. Die gereinigten, trockenen und aktivierten Glasplättchen wurden mit in den Exsikkator gestellt, welcher im Anschluss mit Argon geflutet und geschlossen wurde. Am nächsten Tag wurden die Glasplättchen entnommen und die aufgebrachte Silanschicht für mehrere Stunden bei 110 °C im Trockenschrank ausgehärtet.

3.2.2 Charakterisierung der Glasoberflächen

3.2.2.1 Kontaktwinkelanalyse

Der Kontaktwinkel beschreibt den Winkel, den ein Flüssigkeitstropfen zwischen sich und einem Feststoff ausbildet und hängt von den Wechselwirkungen der Flüssigkeit mit der Oberfläche ab. Anhand des Kontaktwinkels können Aussagen über die Oberflächenbeschaffenheit der Probe gemacht werden. Bei geringen Kontaktwinkeln gilt die Probe als hydrophil, bei Kontaktwinkel um 90 ° als hydrophob und bei über 90 ° als superhydrophob.

In der Kontaktwinkelanalyse wurde ein 2 µl Tropfen entionisierten Wassers auf die Glasoberfläche gegeben und eine Tropfenkonturanalyse durchgeführt. Pro Glasplättchen wurden mindestens fünf Messungen durchgeführt und der Mittelwert der auf gegenüberliegenden Seiten gemessenen Winkel bestimmt.

3.2.2.2 Röntgenphotoelektronenspektroskopie

Die Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS: *X-ray photoelectron spectroscopy*) ist eine spektroskopische Methode, welche zur Aufklärung chemischer Zusammensetzungen von Festkörperoberflächen auf atomarer Ebene genutzt werden kann. Grundlage der Methode ist der photoelektrische Effekt. Vereinfacht erklärt, werden durch die Einstrahlung von Röntgenstrahlung Elektronen aus Atomorbitalen der Oberflächenelemente angeregt und an die Oberfläche befördert, bevor sie im nächsten Schritt als sogenannte Photoelektronen mit einer charakteristischen kinetischen Energie aus dem Festkörper austreten. Durch die gemessene kinetische Energie des Photoelektrons lässt sich seine Bindungsenergie errechnen und erlaubt Aussagen aus welchem Atom und welchem Orbital das Elektron stammt.

$$E_{\text{bin}} = E_{\text{photon}} - (E_{\text{kin}} + \phi)$$

E_{bin} = Bindungsenergie

E_{photon} = Energie der Röntgenstrahlung

E_{kin} = kinetische Energie

Φ = Korrekturfaktor abhängig vom Material und Detektor

Die Energie der Röntgenstrahlung E_{photon} ist bekannt, die kinetische Energie E_{kin} des Photons wird gemessen und der Korrekturfaktor ist gegeben oder wird in den meisten Fällen als konstant angenommen. Somit lässt sich anhand der oben aufgeführten Formel die Elektron-spezifische Bindungsenergie errechnen und die atomare Zusammensetzung der Oberfläche ermitteln.

Die in dieser Arbeit diskutierten XPS-Messungen wurden von Frau Dr. Astrid Besmehn (Forschungszentrum Jülich) durchgeführt. Zur Aufnahme der Übersichtsspektren wurde mit 187,5 eV Passenergie, 0,8 eV Schrittweite in 50 ms Schritten gearbeitet. Die Röntgenquelle (Al-K α monochromatisch, 1,486 keV) wurde bei 100 W und 20 kV betrieben. Zur Quantifizierung wurden die Übersichtsspektren auf 100 at% normiert und eine Shirley-Untergrund-Korrektur durchgeführt. Es wurden drei Messpunkte (Analysebereich: 1.4 mm x 200 μ m) um das Zentrum des Glasplättchens herum ausgewählt.

3.2.3 sFIDA Allgemein

Bei dem sFIDA handelt es sich um eine Oligomer-spezifische Detektionsmethode zur Diagnose der Alzheimerschen Demenz. Das Funktionsprinzip basiert auf einer Immunodetektion von A β -Oligomeren, welche zunächst durch einen monoklonalen anti-A β -Antikörper auf einer funktionalisierten Glasoberfläche immobilisiert und durch die Bindung von zwei Fluoreszenz-markierten anti-A β -Antikörper detektiert werden. Durch die Anwendung von drei Antikörpern mit überlappenden Epitopen können theoretisch nur A β -Konformationen detektiert werden, die aus mindestens drei Monomeren bestehen. Aller Wahrscheinlichkeit nach, handelt es sich bei den detektierten Molekülen um deutlich größere A β -Spezies, da die Zugänglichkeit von mindestens drei Epitope gewährleistet sein muss, um ein Signal im sFIDA zu erhalten.

3.2.4 sFIDA Aufbau

3.2.4.1 Reinigung und Aktivierung der Glasoberfläche

Zur Reinigung der ZAT-Platten wurden diese abwechselnd dreimal mit Ethanol und dreimal mit Wasser übergossen und per Hand geschüttelt. Die in die Wells gelaufene Flüssigkeit wurde immer wieder kräftig über dem Abguss ausgeschlagen. Insgesamt wurden dazu ca. 200 ml Ethanol und 2 l Wasser verwendet. Zur weiteren Reinigung und Aktivierung der Glasoberfläche der Well-Böden wurden die Wells im nächsten Schritt mit 5 M NaOH behandelt. 45 μ l 5 M NaOH wurden hierzu in die Wells gefüllt und für drei Stunden darin belassen. Anschließend wurde die NaOH-Lösung entnommen und die Wells wurden erneut mehrfach mit insgesamt 2 l Wasser übergossen und kräftig ausgeschlagen. Nach 20-minütiger Trocknung der ZAT-Platten bei 80 °C wurden diese in den Plasma-Cleaner gegeben und mit einem Wasser-Plasma (0,3 mbar, 9,5 Power, sechs Minuten) zur Aktivierung der Glasoberfläche behandelt (siehe *1.4.2.1 Reinigung und Aktivierung von Glasoberflächen mittels Plasma*).

3.2.4.2 Aminierung der Glasoberfläche nach dem Ethanolamin-Protokoll

Zur kovalenten Bindung von primären Amingruppen auf der Glasoberfläche wurden die Wells der ZAT-Platten mit 40 µl 5 M Ethanolamin in DMSO befüllt und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Am nächsten Tag wurde die Lösung entnommen und die ZAT-Platte wurde mit Wasser übergossen und die Wells anschließend fünfmal mit je 45 µl Wasser mit der Mehrkanalpipette durchgespült.

3.2.4.3 Aminierung der Glasoberfläche nach dem APTES-Protokoll aus der Gasphase

Zur Einführung einer primären Amingruppe mittels Silanisierung wurde APTES aus der Gasphase auf der ZAT-Platte immobilisiert. Hierzu wurden 1 ml APTES und 200 µl TEA (Triethylamin) in zwei abgetrennte Deckel von Mikroreaktionsgefäßen gegeben und auf den Boden eines Exsikkators gestellt. Die gereinigte und trockene ZAT-Platte wurde, mit den Well-Öffnungen zum Boden zeigend, mit in den Exsikkator gehangen, welcher im Anschluss mit Argon geflutet und geschlossen wurde. Am nächsten Tag wurden die beiden Reaktionsgefäße mit den überschüssigen Chemikalien entnommen und der Exsikkator wurde erneut mit Argon befüllt und geschlossen. Die gebildete Silanschicht auf der ZAT-Platte wurde in der Argon-Atmosphäre unter trockenen Bedingungen für zwei Tage ausgehärtet.

3.2.4.4 Beschichtung der Glasoberfläche mit Carboxymethyldextran

Für die Beschichtung des Well-Innenraums mit Carboxymethyldextran (CMD) wurde eine Lösung von CMD in Wasser mit einer Konzentration von 20 g/l hergestellt. Die Lösung wurde anschließend mit einem Sterilfilter (0,2 µm) filtriert und zehn Minuten bei 20.000 g zentrifugiert. Es wurde mit dem Überstand weiter gearbeitet. Je 1 M Lösungen von EDC und NHS wurden in Wasser hergestellt und in der CMD-Lösung auf 200 mM EDC und 50 mM NHS verdünnt. Die CMD/EDC/NHS-Lösung wurde für 20 Minuten geschüttelt, bevor je 45 µl des

Gemisches für 1,5 Stunden in die Wells gegeben wurden. Anschließend wurden die Wells dreimal mit Wasser gespült.

3.2.4.5 Bindung der Fänger-Antikörper

Die verbliebenen Carboxygruppen des CMD, die nicht an die Glasoberfläche gebunden haben, wurden im nächsten Schritt erneut mit einem 200 mM EDC und 50 mM NHS-Gemisch in Wasser aktiviert. Dazu wurden 15 µl der Lösung für 30-60 Minuten in die Wells gegeben. Nach Entnahme des Reaktionsgemisches und zweimaligem Waschen mit Wasser wurden 15 µl einer 0,01 g/l Lösung des Fänger-Antikörpers in PBS in die Wells gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1,5 Stunden wurde die Antikörperlösung entfernt und es wurden 15 µl einer 0,1 M Ethanolaminhydrochlorid-Lösung in PBS in die Wells gefüllt. Die Lösung wurde nach 30 Minuten entnommen und die Wells wurden dreimal mit TBS-T und dreimal mit TBS gewaschen. Bis zur Probenauftragung blieben die Wells mit TBS befüllt.

3.2.4.6 Probenvorbereitung

Verdünnungen von CB-Oligomeren und Aβ-SiNP

Die in dieser Arbeit vermessenen Proben wurden alle, wie in den entsprechenden Abschnitten beschrieben, verdünnt und in dreifacher Bestimmung im sFIDA vermessen (Ausnahme Versuch in Abb. 3-1, Doppelbestimmung). Hierzu wurden 15 µl der jeweiligen Proben in drei verschiedene Wells gefüllt und im Fall von biologischem Material (Liquor, Plasma, Urin) oder in biologischem Material verdünnten Proben (Aβ-Oligomere in Liquor, Plasma) über Nacht inkubiert. Die entsprechenden Kontrollverdünnungen in Wasser oder PBS wurden bei Vergleichsmessungen ebenfalls über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben entnommen und die Wells einmal mit TBS-T und zweimal mit TBS gewaschen.

Vorbereitung von Hirnhomogenaten

Die Hirnhomogenate von APP_{SWE}/PS1dE9-Mäusen in PBS wurden von Tina Dunkelmann präpariert. Sie waren bei -80 °C eingefroren und wurden zur Verwendung im sFIDA auf Eis aufgetaut und mit PBS verdünnt.

Die Hirnhomogenate von TBA2.1 Mäusen wurden in TRIS/HCl-Puffer von Loreano Peters präpariert. Alle Präparationsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Es wurde eine Hemisphäre mit Mörser und Pistill zu einem 20-prozentigen Homogenat (w/v) in 1 M TRIS/HCl (pH 8,5) durch zehnfaches auf und ab bewegen homogenisiert. Das Homogenat wurde im Anschluss für fünf Sekunden gevortext und dreimal für fünf Sekunden sonifiziert (Branson Sonifier 250; Timer: 5 sec, Duty Cycle: 30 %, Output Control: 5). Nach Zentrifugation bei 3.000 g für 15 Minuten bei Raumtemperatur wurden aus dem Überstand Aliquots hergestellt und bei -80 °C eingefroren. Zur Vermessung im sFIDA wurden die Homogenate auf Eis aufgetaut und mit 10 mM TRIS/HCl (pH 8,5) verdünnt.

3.2.4.7 Zugabe der Detektions-Antikörper

Die beiden verwendeten Detektions-Antikörper wurden jeweils auf eine Konzentration von 1,25 mg/l in TBS verdünnt und für eine Stunde bei 100.000 g und 4 °C in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entnommen und stark durchmischt. 15 µl der Lösung wurden für zwei Stunden in die Wells gefüllt. Im Anschluss wurde die Antikörper-Lösung entnommen und die Wells zweimal mit je 45 µl TBS-T und zweimal mit TBS gewaschen. Abschließend wurden die Wells mit Wasser aufgefüllt und mit einer Plastikfolie versiegelt.

3.2.5 Datenerfassung im sFIDA

3.2.5.1 TIRF-Mikroskopie

Bei der TIRF-Mikroskopie (Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie) handelt es sich um eine spezielle Methode der Lichtmikroskopie, welche die Anregung der Proben nahe der Objektträgeroberfläche mittels eines evaneszenten Feldes ermöglicht. Zur Erzeugung des evaneszenten Feldes wird Licht in einem flachen Winkel auf eine Grenzschicht zwischen einem Medium mit einem hohen Brechungsindex (z. B. Glas) und einem Medium mit einem geringeren Brechungsindex (z. B. wässrige Lösung) eingestrahlt und es kommt zur Totalreflexion des Lichtes an der Grenzfläche. Das entstehende Lichtfeld hat eine Eindringtiefe von bis zu 200 nm und seine Intensität fällt exponentiell in die Probe hinein ab. Somit kommt es zur Anregung von Fluorochromen nahe der Objektträgeroberfläche, wodurch in der TIRF-Mikroskopie ein geringes Hintergrundsignal gewährleistet ist (Axelrod et al., 1983).

Die Datenerfassung der sFIDA-Experimente erfolgte an einem TIRF-Mikroskop. Es wurden in jedem Well 25 Bilder in einem Abstand von 200 μm voneinander mit einem inversen Ölimmersions-Objektiv mit 100-facher Vergrößerung aufgenommen. Jedes Bild hat eine Größe von 116x116 μm und die Größe der Welloberfläche beträgt 9,6 mm^2 , daher wurden insgesamt 3,5 % des Wells analysiert.

Zur Analyse der Proben im sFIDA wurden zwei verschieden Fluoreszenz-markierte Detektions-Antikörper eingesetzt. In dieser Arbeit wurden dazu die in Tabelle 2-6 aufgeführten Fluorochrome, sowie Laser und Emissionsfilter am TIRF-Mikroskop verwendet.

Die Mikroskop-Einstellungen von Laserintensität, Belichtungszeit und Gain wurden für jedes Experiment individuell angepasst, so dass die beiden aufgenommenen Kanäle eine ähnliche Helligkeit aufwiesen. Die Bilder wurden in beiden Kanälen mit

einer Graustufenauflösung von 14 Bit aufgenommen, was einem Intensitätsbereich zwischen 0 und 16383 entspricht.

Tabelle 3-6: in dieser Arbeit eingesetzten Fluorochrome mit ihren Anregungs- und Detektionswellenlängen am verwendeten TIRF-Mikroskop

Fluorochrom	Absorptions- maximum	Laser	Emmisions- maximum	Emmisionsfilter (Bandpass)
Alexa Fluor633	621 nm	633 nm	639 nm	705/72 nm
ATTO647N	644 nm		669 nm	
ATTO488	501 nm	488 nm	523 nm	525/36 nm

3.2.5.2 LSM-Mikroskopie

Die Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM) ist ebenfalls eine Variante der Lichtmikroskopie, bei der ein fokussierter Laserstrahl das Präparat Punkt für Punkt abrastert. In den meisten Fällen wird im Präparat Fluoreszenz erzeugt, und die räumliche Auflösung wird durch die Zuordnung des Fluoreszenzsignals eines bestimmten Zeitabschnittes zu einem Bildpunkt gewährleistet (Ploem, 1987). Das Fluoreszenzsignal wird mit Hilfe eines Photomultipliers detektiert. Ein Emissionsfilter und eine Pinhole sorgen dafür, dass nur Licht einer bestimmten Wellenlänge aus der Fokusebene auf den Detektor trifft und das Hintergrundsignal minimiert wird. Bei Anwendung des Photon-Counting Mode des Photomultipliers können sehr geringe Lichtintensitäten und unter Umständen einzelne Photonen nachgewiesen werden (Hamamatsu Photonics K. K., 2007).

Lediglich die in Abb. 3-1 dargestellte Messung wurde an einem LSM-Mikroskop durchgeführt. Es wurden 25 Bilder pro Well mit einer Graustufenauflösung von 8 Bit (Intensitätsbereich von 0 bis 256) mit einem inversen 63x Wasserobjektiv im Photon-Counting-Mode aufgenommen. Die Bildgröße betrug 246,8x246,8 μm was bei 25 Aufnahmen einem Scanbereich von 14,6 % des Wells entspricht. Die Mikroskop-Einstellungen von Laserintensität, Belichtungszeit und Gain wurden auch für dieses

Experiment so angepasst, dass die beiden aufgenommenen Kanäle eine ähnliche Helligkeit aufwiesen.

3.2.6 Datenauswertung mittels sFIDAta

Die Auswertung der Bilddaten erfolgte mit einer von Johannes Willbold und Yvonne Herrmann entwickelten Software, genannt sFIDAta. Im Folgenden wird das Prinzip der Auswertung erklärt, welches dem Vorgehen in sFIDAta entspricht.

Im ersten Schritt werden zunächst alle Bilder gesichtet, um nicht exakt fokussierte, oder solche mit Artefakten auszusortieren. Artefakte können beispielsweise durch mechanische Beschädigungen der Oberfläche mit der Pipettenspitze entstehen.

Im nächsten Schritt gilt es zwischen dem Hintergrund und dem eigentlichen Signal der Proben (Nutzsignal) zu unterscheiden. Als Hintergrund werden Signale bezeichnet, die durch Dunkelrauschen des Detektors oder durch Streulicht entstehen. Hinzu kommen Autofluoreszenzsignale der eingesetzten Materialien oder durch Verunreinigungen. Des Weiteren kann ein großer Teil des Hintergrundes auch durch Signale unspezifisch gebundener Sonden zustande kommen.

Das Nutzsignal im sFIDA resultiert aus der Bindung der beiden Fluoreszenzmarkierten Detektions-Antikörper an eine A β -Spezies mit passender Anzahl an Epitopen, so dass über die Detektions-Antikörper mindestens ein Fluorochrom jeder Farbe in räumlicher Nähe auf der A β -Spezies immobilisiert ist.

Um nun in jedem Kanal den Hintergrund vom Nutzsignal zu trennen, wird mit Hilfe von Histogrammen ein Schwellenwert festgelegt. Bei den Histogrammen handelt es sich um eine Auftragung der Anzahl an Pixeln (y-Wert), die eine höhere Intensität haben, als die auf der x-Achse aufgetragene Intensität (x-Wert) (siehe Abbildung 3-2). Anhand dieser Histogramme wird direkt ersichtlich, bei welchem Schwellenwert wie viele Pixel pro Probe oberhalb dessen in die Analyse einfließen

und ab welchem Intensitätswert sich die Anzahl der Pixel des Hintergrundsignals der Kontrolle von der Pixelanzahl des Nutzsignals der Proben unterscheidet.

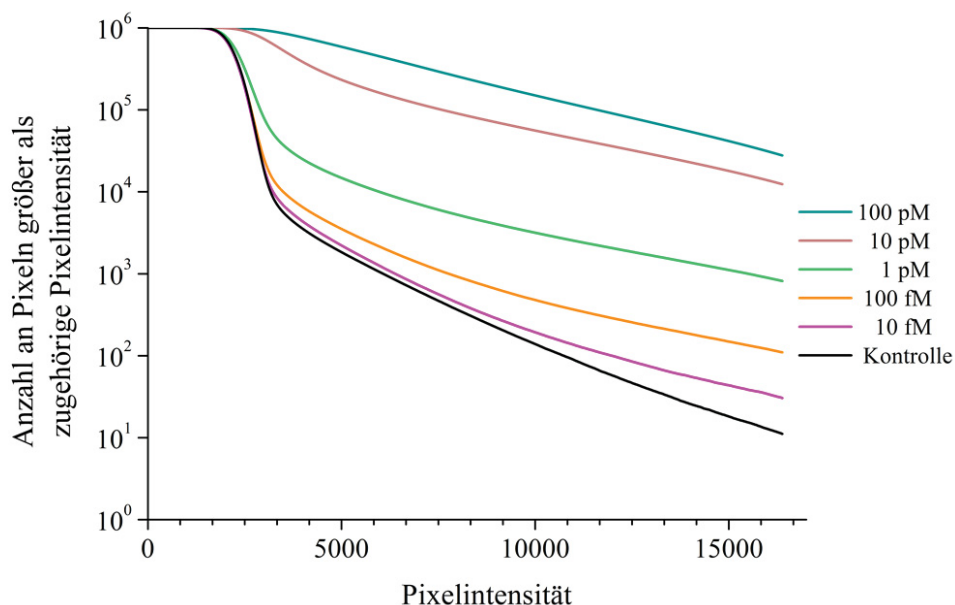


Abbildung 3-2: Histogramm von A β -SiNP in Wasser für Kanal 0

Histogramm verschiedener Konzentrationen von 24 nm großen A β -SiNP verdünnt in Wasser und Wasser als Kontrolle. Bei den Histogrammen handelt es sich um eine Auftragung der Anzahl an Pixeln (y-Wert), die eine höhere Intensität haben, als die auf der x-Achse aufgetragene Intensität (x-Wert). Anhand der Histogramme ist ersichtlich, ab welchem Intensitätswert sich die Anzahl der Pixel des Hintergrundsignals der Kontrolle von der Pixelanzahl des Nutzsignals der Proben unterscheidet. An dieser Stelle wird der Schwellenwert festgelegt.

Nach der Bestimmung des jeweiligen Schwellenwertes für die beiden unterschiedlichen Kanäle, kann im nächsten Schritt die finale Auswertung des sFIDA mittels Kolokalisations-Analyse erfolgen. Hierbei werden die Pixel gezählt, die in beiden Kanälen an gleicher Position eine Intensität über dem jeweiligen Schwellenwert aufweisen. Aus dieser Anzahl kolokalisierter Pixel pro Bild wird der Mittelwert aller Bilder aus einem Well berechnet (Well-Mittelwert).

In dieser Arbeit wird der Mittelwert der Well-Mittelwerte aus den Dreifachbestimmungen jeder Probe mit der dazugehörigen Standardabweichung berechnet, und als sFIDA readout der jeweiligen Probe bezeichnet. Der maximale

sFIDA readout liegt bei einer Million, da jedes am TIRF-Mikroskop aufgenommene Bild eine Million Pixel besitzt.

3.2.7 Synthese und Funktionalisierung von SiNP

3.2.7.1 Stöber-Synthese

Zur Herstellung der SiNP wurden 200 ml Ethanol, 2,7 ml Wasser und 4,49 ml Ammoniak-Lösung in einen 500 ml Rundkolben gegeben und stark gerührt. Nach fünf Minuten wurden 4,43 ml TEOS (Tetraethylortosilicat) hinzugegeben und die Lösung wurde für zwei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurden die entstandenen SiNP dialysiert, um die überschüssigen Reaktanden und Katalysatoren zu entfernen. Hierzu wurde das Reaktionsgemisch in Dialyseschläuche umgefüllt (MWCO: 3.500) und gegen das fünffache Volumen Ethanol für zwei Tage dialysiert. Die SiNP hatten im Durchschnitt eine Konzentration von 10 g/l und wurden in Ethanol bei 4 °C gelagert.

3.2.7.2 Konzentrationsbestimmung der SiNP

Zur gravimetrischen Konzentrationsbestimmung der SiNP wurden drei saubere und trockene 1,5 ml Mikroreaktionsgefäße an der Feinwaage gewogen und anschließend mit 1 ml der SiNP-Lösung befüllt. Lagen die SiNP in Ethanol vor, wurde das Lösungsmittel 20 Minuten an der Speedvac bei 60 °C und Zentrifugation evaporiert. Lagen die SiNP in Wasser vor, wurde das Wasser für zwei Stunden ebenfalls an der Speedvac unter Zentrifugation bei 60 °C entfernt. Nachdem die Mikroreaktionsgefäße vorsichtig aus der Speedvac entnommen wurde, da das feine weiße Pulver der SiNP leicht umherfliegt, wurden die Gefäße auf Raumtemperatur abgekühlt und erneut an der Feinwaage gewogen. Die Differenz der Gewichte wurde als Masse der SiNP angenommen und anhand der bekannten Größe, Dichte und des Molekulargewichtes konnte die Konzentration der SiNP-Lösung bestimmt werden.

3.2.7.3 Aminierung von SiNP

Amin-funktionalisierte SiNP wurden durch eine Silanisierung mit APTES erhalten. Hierzu wurde ein fünffacher Überschuss an APTES-Molekülen im Vergleich zur Anzahl potentieller Bindestellen auf dem Nanopartikel zu der SiNP-Lösung in Ethanol gegeben. Das Gemisch wurde für zehn Minuten sonifiziert und anschließend über Nacht geschüttelt. Zur Reinigung wurden die Amin-funktionalisierten SiNP anschließend bei 5.000 g für zwei Stunden zentrifugiert, der Überstand verworfen und das erhaltene SiNP-Pellet wurde in Ethanol aufgenommen. Nachdem das Pellet in Ethanol durch 15-minütiges Sonifizieren gelöst wurde, wurde die Lösung erneut zentrifugiert. Dieser Zyklus wurde dreimal durchgeführt.

3.2.7.4 Carboxylierung der Amin-funktionalisierten SiNP

Die Amin-funktionalisierten SiNP aus Schritt 3.2.7.3 wurden zur weiteren Funktionalisierung mit einer Carboxygruppe in einer 0,1 M Lösung aus Bernsteinsäureanhydrid in Dimethylformamid (DMF) gelöst und unter Argon-Atmosphäre über Nacht gerührt. Zur Entfernung der überschüssigen Chemikalien wurden die SiNP für drei bis vier Stunden bei 5.000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Im Anschluss wurde das Pellet durch 15-minütige Sonifikation in Ethanol gelöst und erneut für zwei Stunden bei 5.000 g zentrifugiert. Im nächsten Waschschrift wurde das Pellet in Wasser gewaschen. Die carboxylierten SiNP wurden abwechselnd insgesamt zweimal in Ethanol und zweimal in Wasser gewaschen.

3.2.7.5 Peptidvorbereitung

Die verwendeten 2MAP- ((A β ₁₋₁₁)-Lys-(A β ₁₋₁₁)-Trp-Trp-Lys) und A β ₁₋₄₂-Peptide lagen als Lyophilisate vor und wurden über Nacht in HFIP gelöst. Am nächsten Tag wurden die Peptid-Lösungen in Mikroreaktionsgefäße aliquotiert und das Lösungsmittel wurde im Exsikkator, je nach Lösungsmittelmenge für 30-60 Minuten, unter Vakuum evaporiert. Die Mikroreaktionsgefäße mit den erhaltenen trockenen

Peptiden wurden mit Stickstoff befüllt, luftdicht verschlossen und bei -20 °C gelagert.

3.2.7.6 Biofunktionalisierung

Zur Bindung der Biomoleküle wurden die SiNP in 10 mM MES-Puffer (pH 5,7) aufgenommen und die Carboxygruppen auf den SiNP wurden durch 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und N-Hydroxysuccinimid (NHS) in aktivierte NHS-Estergruppen überführt. EDC und NHS wurden in einem 16-fachen und 4-fachen Überschuss im Verhältnis zur Anzahl potentieller Bindestellen zu der Partikellösung gegeben und das Gemisch wurde für zehn Minuten sonifiziert. Im Anschluss wurden die SiNP zweimal gereinigt, indem sie je für eine Stunde bei 10.000 g zentrifugiert und das Pellet erneut in 10 mM MES-Puffer (pH 5,7) durch 15-minütige Zentrifugation gelöst wurde. Die Waschritte sind an dieser Stelle zeitkritisch, da der NHS-Ester nur begrenzt stabil sind.

Die Konzentration der aktivierten SiNP wurde gravimetrisch bestimmt (siehe 3.2.7.2) und die Anzahl der aktivierten NHS-Estergruppen auf der Partikeloberfläche errechnet. Die aktivierten SiNP wurden in einem 1:1 Verhältnis von der Anzahl an potentiellen aktivierten Bindestellen zum Peptid hinzugegeben. Das Gemisch wurde für 20 Minuten sonifiziert und über Nacht unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurden die biofunktionalisierten SiNP bei 5.000 g für zwei Stunden zentrifugiert und das Pellet wurde in 50-prozentigem Hexafluoroisopropanol (HFIP) durch 5-minütige Sonifikation gelöst, um nicht gebundenes Peptid von der Partikeloberfläche zu entfernen. Die biofunktionalisierten SiNP wurden erneut bei 5.000 g für eine Stunde zentrifugiert und das Pellet in Wasser gelöst. Dieser Waschschrift wurde noch einmal wiederholt, bevor die biofunktionalisierten SiNP in Wasser bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert wurden.

3.2.8 Charakterisierung der SiNP

3.2.8.1 Transmissionselektronenmikroskopie

Mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) kann die Struktur und Morphologie von Festkörpern mit hoher räumlicher Auflösung untersucht werden. Dazu wird ein Elektronenstrahl im Vakuum mit einer Beschleunigungsspannung auf die ultradünne Probe geleitet. Die Elektronen werden beim Auftreffen auf die Probe gestreut. Elastische gestreute Elektronen werden in der Brennebene der Objektivlinse fokussiert, nicht-gestreute Elektronen werden passieren gelassen. Das erhaltene Bild wird auf einen fluoreszierenden Schirm oder auf einen Sensor, wie eine CCD-Kamera, weitergeleitet. SiNP haben aufgrund ihrer amorphen Struktur und ihrer hohen Masse einen hohen Massendickenkontrast und sind leicht im TEM darzustellen.

Die Morphologie der SiNP wurde durch Aufnahmen an einem Zeiss Libra 120 Transmissionselektronenmikroskop ermittelt. Zur Vorbereitung des Probengrids wurden 5 µl der Partikellösung in Ethanol auf den Kohlenstoff-Film des Kupfergrids gegeben, für mindestens drei Stunden an Raumluft abgedeckt trocknen gelassen und bis zur Messung staubfrei gelagert.

3.2.8.2 ATR-Infrarotspektroskopie

In der Infrarotspektroskopie (IR) führt die Absorption von Infrarotstrahlung zur Schwingungsanregung von Bindungen in Molekülen, welche als Ausschläge im erhaltenen Spektrum sichtbar sind. Die dazu notwendigen Frequenzen sind charakteristisch für die jeweilige Bindung. Voraussetzung für diese Wechselwirkung ist, dass das Molekül ein veränderbares oder induzierbares Dipolmoment besitzt. Bei der ATR-IR (ATR: *attenuated total reflection*, abgeschwächte Totalreflexion) wird Strahlung in einem Lichtwellenleiter (z. B. Kristall) in Totalreflexion geführt und es bildet sich hinter der reflektierenden Grenzfläche eine evaneszente Welle aus. Die

auf den Kristall aufgebrachte Probe kann mit der evansezenten Welle wechselwirken und es wird die Wellenlängen-abhängige Absorption gemessen.

Die Analyse der einzelnen Funktionalisierungsschritte der SiNP wurde an einem Bruker Tensor 27 Infrarotspektrometer mittels abgeschwächter Totalreflexion von Dr. Nicole Lühmann (ZEA-3, Forschungszentrum Jülich) durchgeführt. Dazu wurde ein möglichst dicker Film der Nanopartikel auf einem Diamanten immobilisiert, indem in bis zu sechs Schritten je 50 µl der Partikellösung (durchschnittliche Konzentration < 1 g/l) auf den Diamanten gegeben wurden und immer wieder gewartet wurde, bis das Ethanol verdampft war. Es wurden pro Probe 128 Scans mit einer Auflösung von 4 cm⁻¹ gemessen. Der Strahlengang wurde während der Messung mit Argon gespült.

3.2.8.3 BCA-Assay zur Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration auf der Oberfläche der biofunktionalisierten SiNP wurde ein BCA-Assay mit Hilfe des Extra Sense BCA Protein Assay Kit der Firma Biovision von Luriano Peters und Christina Linnartz durchgeführt. Beim BCA-Assay handelt es sich um eine Methode zur quantitativen und photometrischen Bestimmung von Proteinen. Cu²⁺-Ionen werden in Anwesenheit von Peptidbindungen oder spezifischen Aminosäureseitenketten unter alkalischen Bedingungen zu Cu⁺-Ionen reduziert. Cu⁺-Ionen werden im nächsten Schritt mit 2,2-Bichinolin-4,4-dicarbonsäure (Bicinchoninsäure) zu einer Komplexverbindung mit violetter Farbe umgesetzt, dessen Absorption bei 562 nm bestimmt werden kann.

In der Durchführung wurden 150 µl der biofunktionalisierten SiNP mit 150 µl 6 M Urea gemischt und für 30 Minuten bei 60 °C inkubiert. 150 µl der Working-Solution des Kits wurden zugesetzt und das Gemisch wurde erneut für eine Stunde bei 60 °C geschüttelt. Nachdem die Lösung abgekühlt war, wurde die Absorption bei 562 nm am UV/VIS Spektrometer gemessen. Die Proteinkonzentration in der SiNP-Lösung

wurde durch Korrelation mit einer ebenfalls vermessenen BSA-Standardgeraden erhalten.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Analyse von murinen Proben im sFIDA

4.1.1 Zielsetzung

Da der sFIDA für die Quantifizierung von A β -Oligomeren in biologischen Proben verwendet werden soll, sollen in diesem Teil der Arbeit Proben von transgenen und Wildtyp-Mäusen im sFIDA analysiert werden. Bei den verwendeten Proben handelt es sich um Liquor, Blutplasma, Urin oder Hirnhomogenate von APP_{SWE}/PS1dE9, APP23 und TBA 2.1 Mäusen. Die Proben wurden von den Kooperationspartnern Prof. Matthias Jucker (DZNE Tuebingen) und Dr. Antje Willuweit (Forschungszentrum Jülich) zur Verfügung gestellt.

In den APP Mauslinien trägt sowohl das Amyloid Precursor Protein (APP) Gen, als auch das Präsenilin-1 (PS1) Gen eine Mutation (Borchelt et al., 1996). Durch die Expression der Genvariationen kommt es im Alter von sechs Monaten zu ersten A β -Ablagerungen im Gehirn (Jankowsky et al., 2004). In der TBA 2.1 Mauslinie wird an der dritten Aminosäure trunkiertes, menschliches A β überexprimiert, was zu einer starken Akkumulation von A β und pE3A β (Pyroglutamat Amyloid β) im Gehirn führt und einen Phänotyp mit deutlichem Verlust von Neuronen zur Folge hat (Alexandru et al., 2011).

Im Folgenden soll geklärt werden, ob es mittels sFIDA möglich ist, den Gehalt an A β -Oligomeren in den verschiedenen Körperflüssigkeiten und Hirnhomogenaten der transgenen und Wildtyp-Mäuse zu messen und sie anhand ihres sFIDA readouts voneinander zu unterscheiden.

4.1.2 Ergebnisse

4.1.2.1 Analyse von Liquor von transgenen und Wildtyp-Mäusen im sFIDA

Der Liquor von APP23-transgenen und Wildtyp-Mäusen wurde 1:10, 1:50 und 1:250 in PBS verdünnt und im sFIDA analysiert. Abbildung 4-1 zeigt den sFIDA readout für die verschiedenen Verdünnungen der transgenen und Wildtyp-Liquorproben.

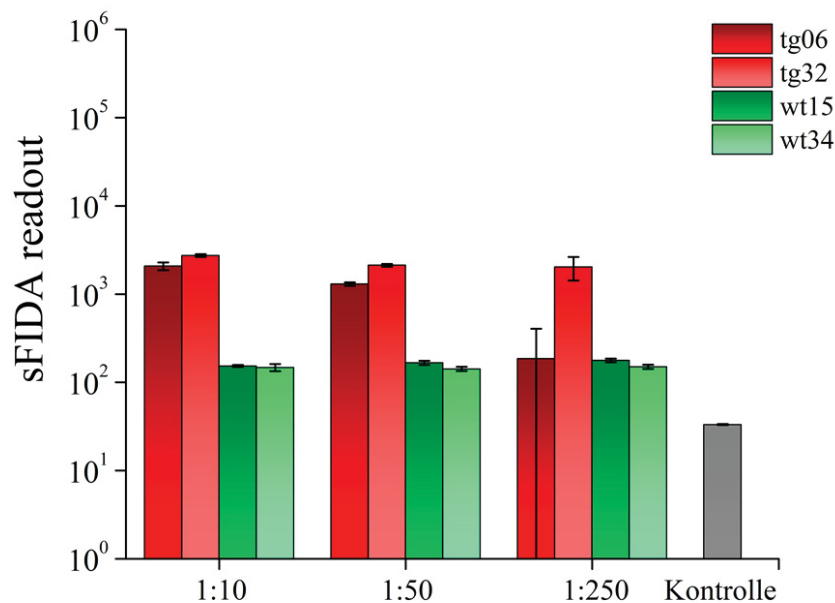


Abbildung 4-1: Analyse von Liquor-Proben von transgenen und Wildtyp-Mäusen im sFIDA

Liquor von zwei APP23 transgenen (rot) und zwei Wildtyp-Mäusen (grün) wurden 1:10, 1:50 und 1:250 in PBS verdünnt. Als Kontrolle diente PBS. Je 10 µl wurden in Doppelbestimmung in dem, mittels Ethanolamin-Protokoll vorbereiteten, sFIDA vermessen. Es wurden pro Well 5x5 Bilder in beiden Kanälen aufgenommen. Dargestellt ist der Mittelwert der Doppelbestimmung einer Probenverdünnung mit der dazugehörigen Standardabweichung. Als Detektions-Antikörper dienten je 10 µl 6E10-ATTO488 und IC16-ATTO647N. Die Messung wurde am Leica LSM SP5 II durchgeführt (Schwellenwerte (Kanal 0/Kanal 1): 100/50) (Experiment: 121108). Die Proben wurden freundlicherweise von Dr. Luis Maia aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mathias Jucker zur Verfügung gestellt.

Innerhalb jeder Verdünnung zeigte sich ein deutlich erhöhter sFIDA readout für die transgenen Proben gegenüber den Wildtyp-Proben, mit Ausnahme der 1:250 Verdünnung der Probe tg06. Während die Wildtyp-Proben alle im selben Bereich um einen sFIDA readout von 100 lagen, erreichten die transgenen Proben einen sFIDA

readout von über 1000. Als Kontrolle diente PBS. Zwischen den einzelnen Verdünnungen ließ sich kein Unterschied in der Höhe des sFIDA readouts erkennen, was dadurch bedingt sein könnte, dass es auch bei höheren Verdünnungen noch zu einer Absättigung der Bindestellen der Fänger-Antikörper auf der Oberfläche kam.

Da durch das oben beschriebene sFIDA-Experiment in Liquor von APP23-transgenen und Wildtyp-Mäusen eine Unterscheidung dieser Proben mittels sFIDA bestätigt werden konnte, wurden im darauf folgenden Experiment verblindete Proben aus der gleichen Quelle vermessen (Abbildung 4-2). Zuvor zeigte die Verdünnung der Proben bis 1:250 keinen Einfluss auf den sFIDA readout (vgl. Abbildung 4-1), daher wurden die Proben aufgrund ihres geringen Ausgangsvolumens mindestens 1:50 verdünnt. Als Kontrollen diente eine bekannte transgene Probe und eine bekannte Wildtyp-Probe, sowie PBS.

In Abbildung 4-2 sind die sFIDA readouts für zwei unabhängige sFIDA-Messungen der beschriebenen Liquorproben dargestellt. Die in Abbildung 4-2 a dargestellte sFIDA-Analyse zeigte einen insgesamt sehr hohen sFIDA readout von über 10^4 , in dem die 1:250 Verdünnung die 1:50 Verdünnung in unterschiedlich starker Ausprägung grundsätzlich überstieg. Innerhalb der verblindeten Proben ließen sich auch nach der Entblindung keine Unterschiede zwischen den Proben und kein Zusammenhang zum Alter der Tiere feststellen. Die sFIDA readouts der Wildtyp-Kontrolle überstiegen in beiden Verdünnungen die sFIDA readouts der transgenen Kontrolle. Die PBS-Kontrolle zeigte überraschenderweise den höchsten sFIDA readout. Das gleiche Phänomen war für eine weitere Analyse derselben Proben (Abbildung 4-2 b) zu beobachten. Auch hier lag der sFIDA readout der PBS-Kontrolle auf gleicher Höhe mit den Messwerten der Proben. In sechs der acht vermessenen Proben zeigte die stärkere 1:500 Verdünnung einen höheren sFIDA readout als die geringere 1:250 Verdünnung. Die transgene und Wildtyp-Kontrolle waren innerhalb beider Verdünnungen nicht voneinander zu unterscheiden.

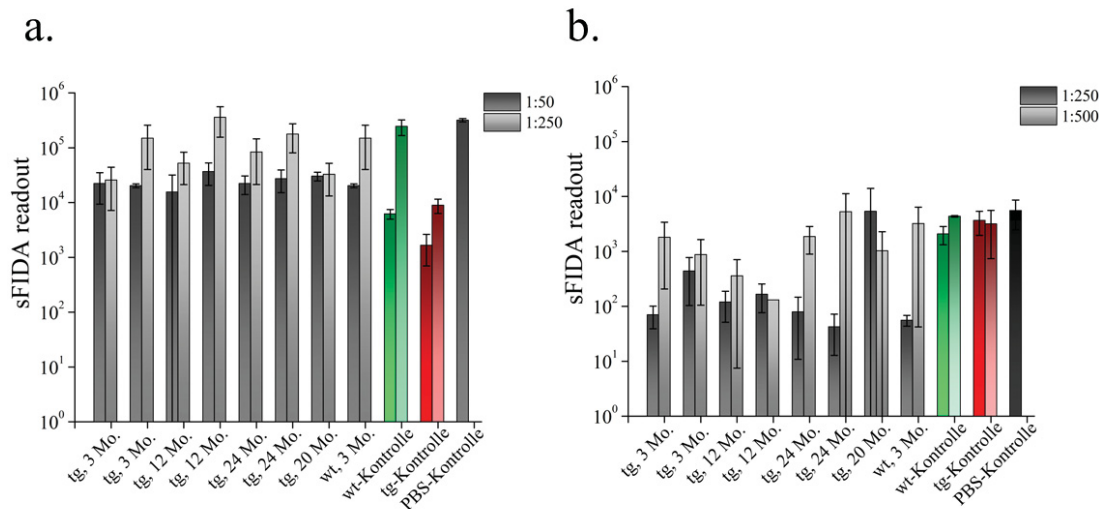


Abbildung 4-2: Analyse von Liquor-Proben von transgenen oder Wildtyp-Mäusen im sFIDA

Es wurden acht Liquor-Proben von sieben APP23 transgenen (tg) und einer Wildtyp-Maus (wt) verschiedenen Alters verblindet im sFIDA vermessen. Die Tiere waren zwischen 3 und 20 Monaten (Mo.) alt. **a.** Für die erste Messung wurden die Proben 1:50 und 1:250 in PBS verdünnt und über Nacht im sFIDA inkubiert. **b.** für die zweite Messung wurde exakt gleich verfahren wie für Messung 1, hier wurden 1:250 und 1:500 Verdünnungen der Proben analysiert. Die Proben wurden in dreifacher Bestimmung untersucht und es wurden pro Well 5x5 Bilder in beiden Kanälen aufgenommen. Dargestellt ist der Mittelwert der Dreifachbestimmung einer Probenverdünnung mit der dazugehörigen Standardabweichung. Als Detektions-Antikörper dienten 6E10-ATTO488 und IC16-ATTO647N. Das Experiment wurde auf einer Ethanolamin-Oberfläche durchgeführt. Die Messung wurden am Leica TIRF Mikroskop durchgeführt (Schwellenwerte: Messung 1: 3000/3000 (Experiment: 130515); Messung 2: 2000/3000 (Experiment: 130621)). Die Proben wurden freundlicherweise von Dr. Luis Maia aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mathias Jucker zur Verfügung gestellt.

Bei einer steigenden Probenverdünnung war entweder eine Abnahme des sFIDA readouts, oder, wie in Abbildung 4-1 gezeigt, keine Veränderung zu erwarten. Die beschriebene Versuchsreihe zeigte jedoch einen Anstieg des sFIDA readouts bei stärkerer Verdünnung an, d. h. je höher der PBS-Anteil in der Probe, umso höher der sFIDA readout.

4.1.2.2 Analyse verschiedener Körperflüssigkeiten von transgenen und Wildtyp-Mäusen im sFIDA

In einem weiteren Versuch wurden Liquor, Plasma und Urin von drei unterschiedlich alten transgenen APP_{SWE}/PS1dE9 Mäusen und zwei Wildtyp-Tieren miteinander verglichen. Liquor konnte nur von einer Wildtyp-Maus und drei transgenen Mäusen erhalten werden (Abbildung 4-3). Alle vier Liquorproben wiesen einen ähnlichen sFIDA readout zwischen ca. 1000 und 6000 auf, wobei die Liquorprobe, wie auch die Plasma- und Urinproben des ältesten transgenen Tieres (tg 225) den höchsten sFIDA readout aufwiesen. Die verschiedenen Körperflüssigkeiten der beiden anderen transgenen Tiere tg 712 und tg 505 zeigten den geringsten sFIDA readout. Die sFIDA readouts der Plasmaproben der beiden Wildtyp-Tiere, wt 223 und wt 457, unterschieden sich über mehr als eine Größenordnung. Die Plasmaprobe der jüngeren Maus zeigte einen sFIDA readout von 600 und die Plasmaprobe des älteren Tieres einen von 9000. Der sFIDA-readout der Urinprobe der transgenen Maus tg225 lag deutlich höher als der der Urinprobe der jüngeren Wildtyp-Maus wt223, aber nur geringfügig über dem sFIDA readout der Urinprobe der gleichalten Wildtyp-Maus wt457. Die Urinproben der gleichalten transgenen und Wildtyp-Maus konnten nicht anhand ihres sFIDA readouts voneinander unterschieden werden.

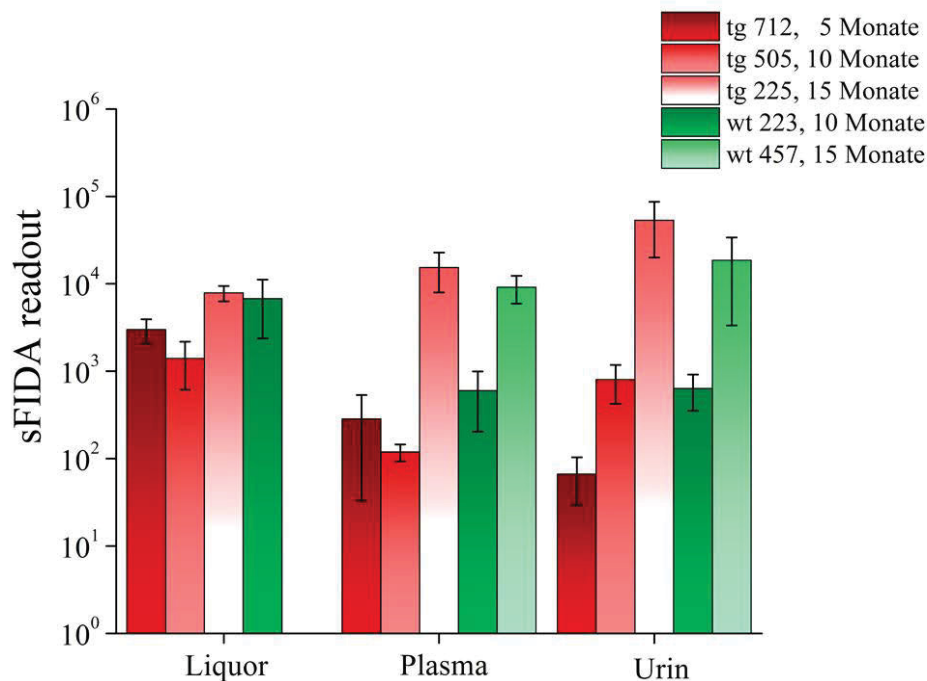


Abbildung 4-3: Analyse von Körperflüssigkeiten von transgenen und Wildtyp-Mäusen im sFIDA

Es wurden Liquor, Blutplasma und Urin-Proben von drei unterschiedlich alten APP_{SWE}/PS1dE9 transgenen und zwei Wildtyp-Mäusen im sFIDA vermessen. (tg 712, Alter 5 Monate; tg 505, Alter 10 Monate; tg 225, Alter 15 Monate, wt 223, Alter 10 Monate und wt 457, Alter 15 Monate) Hierzu wurden die Liquor-Proben 1:250 in PBS verdünnt. Die Plasma- und Urin-Proben wurden unverdünnt im sFIDA analysiert. Als Detektions-Antikörper dienten 6E10-ATTO488 und IC16-ATTO647N. Das Experiment wurde auf einer Ethanolamin-Oberfläche durchgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert der dreifachen Bestimmung einer Probenverdünnung mit der dazugehörigen Standardabweichung (Schwellenwerte (Kanal0/Kanal1): 4000/5000) (Exp. 130711).

Zusammenfassend lässt sich vermuten, dass der sFIDA readout für die Plasma- und Urinproben der transgenen und Wildtyp-Tiere von ihrem Alter abhängig zu sein schien. Je älter das Tier, umso höher war tendenziell der sFIDA readout der verschiedenen Körperflüssigkeiten. Zwischen den jeweils gleichalten Tieren aus den beiden Gruppen transgen und Wildtyp war keine Unterscheidung anhand des sFIDA readout ihrer Körperflüssigkeiten möglich.

4.1.2.3 Analyse von Hirnhomogenaten von transgenen und Wildtyp-Mäusen im sFIDA

Im folgenden Abschnitt wurden Hirnhomogenat-Proben von transgenen und Wildtyp-Mäusen im sFIDA untersucht. Aufgrund der hohen Konzentration an Biomolekülen in den Hirnhomogenat-Proben musste zunächst überprüft werden, welche Hintergrundsignale durch Autofluoreszenz im sFIDA zu erwarten sind.

Dazu wurden eine APP_{SWE}/PS1dE9-transgene und eine Wildtyp-Probe 1:10 und 1:1000 in PBS verdünnt und im sFIDA in dreifacher Bestimmung vermessen. Zum Vergleich wurden zwei Bestimmungen von PBS durchgeführt, wobei der Probe 'PBS+AK' Detektions-Antikörper zugefügt wurden. Allen anderen Proben wurden keine Detektions-Antikörper zugesetzt, somit war das erhaltene Signal alleine durch Autofluoreszenz der jeweiligen Probe und Dunkelrauschen des CCD-Chips der Kamera zu erklären. Die Schwellenwerte dieser Analyse wurden so gewählt, dass die PBS-Kontrolle ohne Detektions-Antikörper einen sFIDA readout von null hatte.

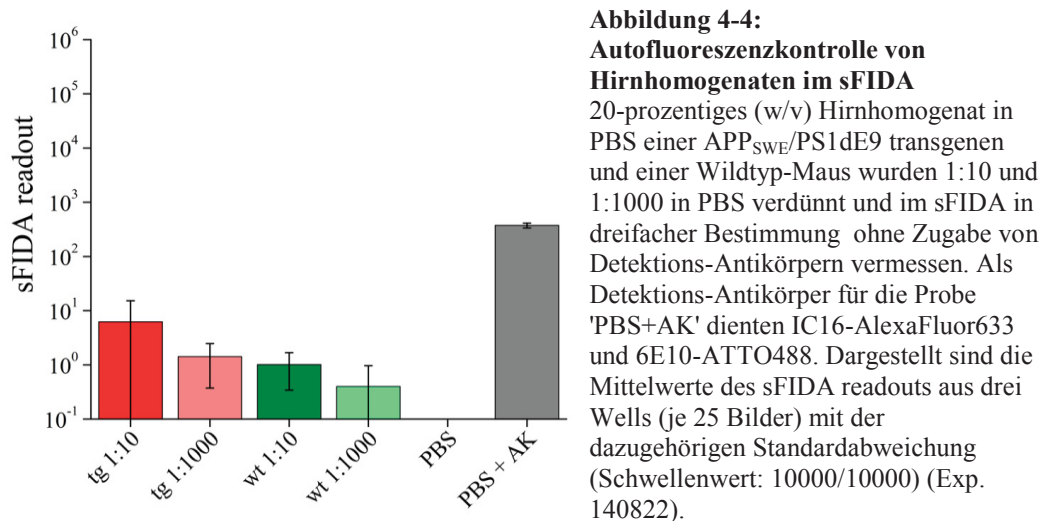


Abbildung 4-4 zeigt die erhaltenen sFIDA readouts für die Autofluoreszenz von Hirnhomogenatverdünnungen in PBS. Die Ergebnisse zeigten, dass die Autofluoreszenz von Hirnhomogenat-Proben einen sFIDA readout von unter 10

verursacht und daher vernachlässigbar ist. Die PBS-Kontrolle, welcher Detektions-Antikörper zugesetzt wurden, zeigte einen erhöhten sFIDA readout von 375.

Im anschließenden Versuch wurde eine Verdünnungsreihe von Hirnhomogenaten in PBS vermessen. Hierzu wurden 20-prozentige Hirnhomogenate von einer APP_{SWE}/PS1dE9-transgenen und einer Wildtyp-Maus auf 0,5 bis 0,0005 % (w/v) verdünnt und im sFIDA analysiert. Als Kontrolle diente PBS. In Abbildung 4-5 ist der erhaltene sFIDA readout für die verschiedenen Hirnhomogenat-Verdünnungen der transgenen und Wildtyp-Tiere dargestellt. Für alle vier verschiedenen Verdünnungen war ein eindeutiger Unterschied des sFIDA readouts zwischen transgener und Wildtyp-Probe zu erkennen. Während die Wildtyp-Proben einen relativ konstanten sFIDA readout von ungefähr 100 für alle Verdünnungsstufen aufwiesen, zeigten die transgenen Proben einen sFIDA readout von mehr als 10.000, der mit steigender Verdünnung auf circa 700 absank, aber weiterhin den sFIDA readout der Wildtyp-Probe überstieg. Die sFIDA readouts der stärkeren Verdünnungen glichen sich dem der PBS-Kontrolle von circa 400 an.

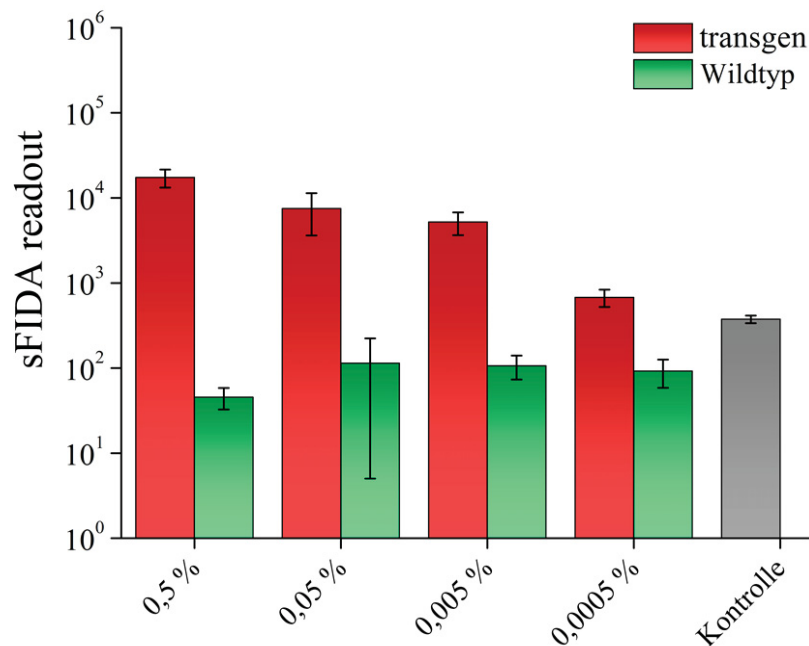


Abbildung 4-5: Analyse von Hirnhomogenat-Verdünnungen von transgenen und Wildtyp-Mäusen im sFIDA

Bei -80 °C gelagertes 20-prozentiges (w/v) Hirnhomogenat von APP_{SWE}/PS1dE9 transgenen Mäusen (rot) und Wildtyp-Mäusen (grün) in PBS wurde auf Eis aufgetaut und mit PBS weiter zu 0,5 bis 0,0005-prozentigen Suspensionen verdünnt und im sFIDA vermessen. Als Detektions-Antikörper wurden IC16-AlexaFluor633 und 6E10-ATTO488 benutzt. Der sFIDA wurde auf einer APTES-Oberfläche durchgeführt. Der dargestellte sFIDA readout basiert auf dem Mittelwert einer dreifachen Bestimmung pro Konzentration mit der zugehörigen Standardabweichung (Schwellenwerte (Kanal 0/Kanal1): 10000/10000) (Exp. 140822).

Zusammenfassend zeigten die in PBS-verdünnten Hirnhomogenat-Proben von APP_{SWE}/PS1dE9-transgenen Mäusen einen eindeutig erhöhten sFIDA readout gegenüber den Proben der Wildtyp-Tiere für alle getesteten Verdünnungen. Dieses Ergebnis deckten sich mit den Erwartungen, da es in der APP_{SWE}/PS1dE9-Mauslinie zu einer Überexpression an A β und dadurch zu einer vermehrten Bildung von A β -Oligomeren kommt (vgl. 1.2 Mausmodelle der AD).

Endogene A β -Monomere sind in jeder murinen oder humanen Probe enthalten. Präparationsbedingt könnte es unter Umständen zu einer Aggregation der A β -Monomere kommen, was dann möglicherweise zu einem falsch-positiven Signal im sFIDA führen könnte. Durch einen leicht alkalischen pH-Wert in der Hirnhomogenat-Präparation sollte die mögliche Aggregation der endogenen A β -Monomere verhindert werden können.

Im folgenden Versuch sollte daher überprüft werden, ob die Erhöhung des pH-Wertes von pH 7,4 (PBS) auf pH 8,5 (TRIS/HCl) einen Einfluss auf den sFIDA readout von Hirnhomogenat-Proben hat. Es wurden 20-prozentige (w/v) Hirnhomogenate in PBS (pH 7,4) von einer APP_{SWE}/PS1dE9-transgenen Maus, und in TRIS/HCl (pH 8,5) von einer TBA 2.1-Maus hergestellt und in den jeweiligen Puffern zu 0,5 bis 0,0005-prozentigen (w/v) Suspensionen weiter verdünnt.

In Abbildung 4-6 ist der sFIDA readout für die zwei Verdünnungsreihen der Hirnhomogenate in PBS- und TRIS/HCl-Puffer dargestellt. Für die Verdünnungsreihe in PBS zeigte sich eine eindeutige Unterscheidbarkeit der transgenen von den Wildtyp-Proben anhand ihrer sFIDA readouts (Abbildung 4-6 a). Während die Wildtyp-Proben einen sFIDA readout von unter 100 in allen Verdünnungen aufwiesen, lagen die sFIDA readouts der transgenen Proben bei über 1.000 in allen Konzentrationen.

Für die Hirnhomogenat-Präparation in TRIS/HCl ließ sich kein Unterschied zwischen transgener und Wildtyp-Probe im sFIDA feststellen (Abbildung 4-6 b). Mit steigender Verdünnung nahm der sFIDA readout für beide Proben zu und glich sich der auffällig hohen TRIS-Kontrolle an. In der TRIS-Kontrolle, der keine Detektions-Antikörper zugesetzt wurden, konnte kein Signal im sFIDA detektiert werden.

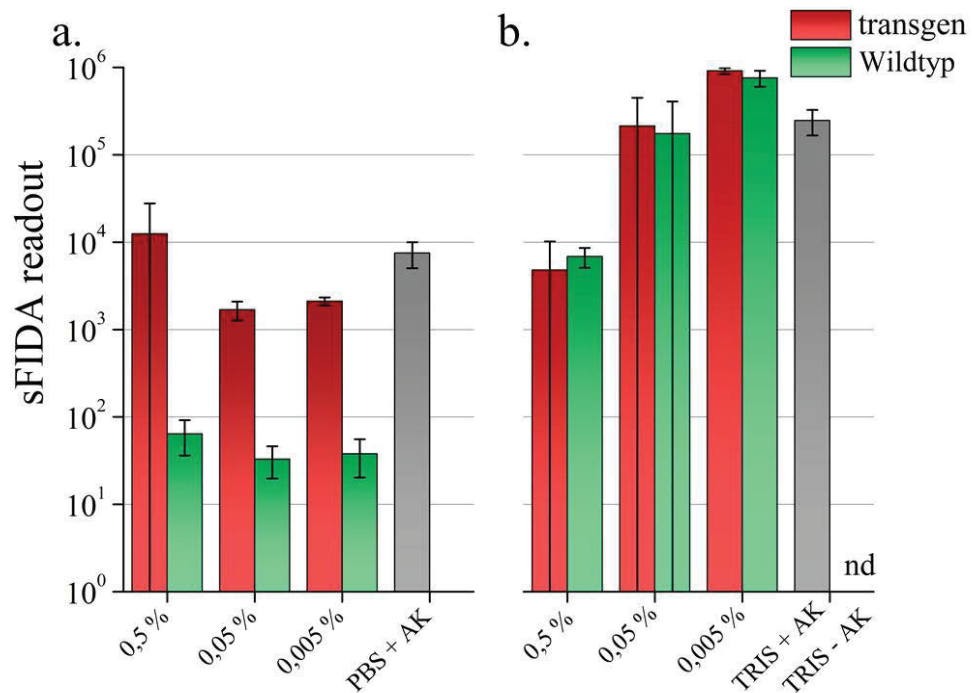


Abbildung 4-6: Analyse von Hirnhomogenaten von transgenen Mäusen in PBS und TBA 2.1-Mäusen in TRIS-Puffer im sFIDA

Die in PBS (APP_{SWE}/PS1dE9) und TRIS (TBA 2.1) hergestellten Hirnhomogenate wurden in ihren jeweiligen Puffern zu 0,5 bis 0,005-prozentigen Suspensionen verdünnt und im sFIDA vermessen. Als Detektions-Antikörper wurden IC16-AlexaFluor633 und 6E10-ATTO488 eingesetzt. Als Kontrollen dienten PBS oder TRIS, denen Detektions-Antikörper zugesetzt wurden (+ AK). In der TRIS-Kontrolle, der keine Detektions-Antikörper zugesetzt wurden, konnte kein Fluoreszenzsignal über den Schwellenwerten detektiert werden (nd: nicht detektierbar). Der dargestellte sFIDA readout basiert auf dem Mittelwert einer dreifachen Bestimmung pro Konzentration mit der zugehörigen Standardabweichung (Schwellenwerte (Kanal 0/Kanal1): 5000/5000) (Exp. 140905).

In Abbildung 4-7 sind Beispielbilder der Oberflächen der PBS- und TRIS-Kontrolle im sFIDA gegenübergestellt und belegen die stark artifizielle Oberfläche in der TRIS-Kontrolle. Offenbar kam es in der TRIS-Kontrolle zu einem hohen Maß an unspezifischer Bindung der Detektions-Antikörper an die Oberfläche.

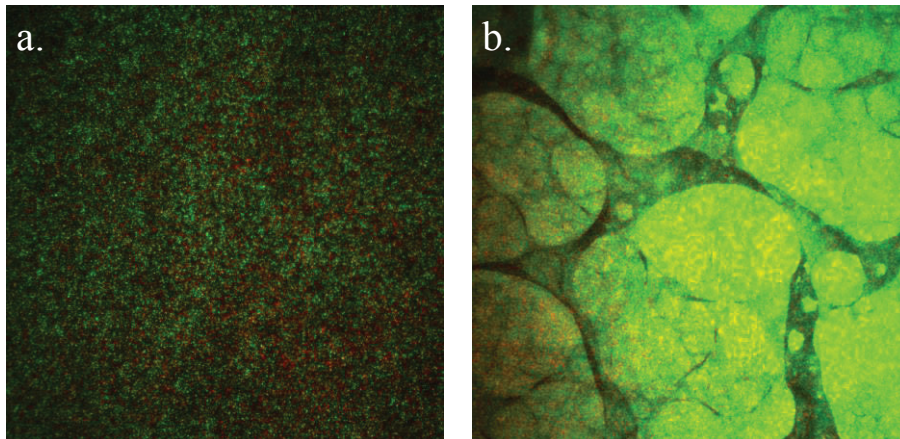


Abbildung 4-7: Beispielbilder der Oberflächen der PBS- und TRIS-Kontrolle im sFIDA
a. PBS-Kontrolle b. TRIS-Kontrolle

Abschließend lässt sich festhalten, dass die Verdünnung der Hirnhomogenate in PBS eine klare Unterscheidung von transgener und Wildtyp-Probe zuließen, wo hingegen die Verdünnung der Proben in TRIS-Puffer zu einer artifiziellen Oberfläche im sFIDA führte, die keine Unterscheidung der transgenen und Wildtyp-Proben ermöglichte.

4.1.3 Diskussion

In diesem Abschnitt wurden Ergebnisse der sFIDA-Analyse von Körperflüssigkeiten und Hirnhomogenat-Proben von APP_{SWE}/PS1dE9, APP23 und TBA 2.1 transgenen und Wildtyp-Mäusen gezeigt und auf die Unterscheidbarkeit der transgenen und Wildtyp-Gruppen hin untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass mittels des sFIDA-Verfahrens eine Unterscheidung zwischen transgenen und Wildtyp-Mäusen anhand ihres sFIDA readouts in Liquor prinzipiell möglich ist (Abbildung 4-1). Die Reproduktion dieser Ergebnisse war jedoch auf Grund von Assay-bedingten Schwankungen des Hintergrundsignals nicht durchgehend konsistent. Zwei folgende Versuche Liquor-Proben von transgenen und Wildtyp-Tieren anhand ihres sFIDA readouts voneinander zu unterscheiden blieben erfolglos (vgl. Abbildung 4-2 und Abbildung 4-3). In diesen Experimenten wurden sehr starke Signale in den Puffer-Kontrollen beobachtet, die durch ein hohes Maß an unspezifischer Bindung der Sonden an die Oberfläche erklärt werden könnten. Durch ionischen Wechselwirkungen der Fluorochrome mit der Oberflächenmatrix, oder durch elektrostatische Wechselwirkungen der Detektions-Antikörper mit den Fänger-Antikörpern könnten unspezifische Signale auf der Oberfläche entstanden sein, welche das spezifische Signal überlagerten und so die Unterscheidung der Wildtyp- und transgenen Proben unmöglich machte. Neben Assay-bedingten Faktoren können auch weitere Faktoren, wie die Art und der Zeitpunkt der Entnahme des Liquors oder Verunreinigung mit Erythrozyten die Quantifizierung der A β -Oligomere beeinflussen.

In der Analyse von Urin- und Plasma-Proben von transgenen und Wildtyp-Tieren wurde ein erhöhter sFIDA readout mit ansteigendem Alter des Tieres beobachtet (vgl. Abbildung 4-3). In den Proben der transgenen Tiere könnte dies durch die kontinuierliche Überexpression an A β -Peptiden im APP_{SWE}/PS1dE9-Mausmodell und die dadurch induzierte steigende Oligomer-Bildung erklärt werden. Innerhalb

der Mäuse gleichen Alters konnte jedoch keine Unterscheidung zwischen transgenen und Wildtyp-Tieren anhand ihres sFIDA readouts festgestellt werden.

Die Analyse der Hirnhomogenate transgener und Wildtyp-Tiere im sFIDA ermöglichte die Differenzierung der beiden Gruppen und zeigte, dass mittels sFIDA A β -Oligomere in Hirnhomogenaten bis zu einer Verdünnung von 0,0005 (w/v) % quantifiziert werden können (vgl. Abbildung 4-5 und 4-6).

Die in dieser Arbeit beschriebenen sFIDA-Analysen muriner Proben basieren auf Messungen von ein bis maximal drei Tieren pro Gruppe, mit einer Dreifachbestimmung pro Konzentration. Für eine rigorose statistische Auswertung sollte diese Anzahl jedoch auf mindestens sechs Tiere pro Gruppe erhöht werden. Dennoch können die hier gezeigten sFIDA-Analysen von murinen Proben im sFIDA als aussagekräftige Vorversuche gewertet werden, auf deren Grundlage weitere Optimierungen durchgeführt werden können.

4.2 Oberflächenoptimierung des sFIDA

4.2.1 Zielsetzung

Die in dieser Arbeit beschriebenen sFIDA-Experimente wurden ausschließlich auf ZAT-Platten durchgeführt (siehe 3.1.5 *ZAT-Platten*). Hierbei handelt es sich um Sonderanfertigungen von 96-Well Platten, vollständig bestehend aus Borosilicat-Glas. Die Vorbereitung des sFIDA basiert auf einer chemischen Funktionalisierung der Glasoberfläche der Assay-Bodenplatte. Im ursprünglichen Protokoll folgt auf einen Reinigungs- und Aktivierungsschritt der Glasoberfläche, die Einführung einer primären Amingruppe mittels Ethanolamin. Die Aktivierung der Glasoberfläche hierzu geschieht durch die Behandlung der Wells mit 5 M NaOH für mindestens drei Stunden mit anschließender 10-minütiger Plasma-Behandlung (siehe 1.4.2.1 *Reinigung und Aktivierung von Glasoberflächen mittels Plasma* (Krüger et al., 1999)). Durch die Hydroxylierung mittels NaOH und die Reaktion von $\text{OH}^\bullet$ -Radikalen, und OH^- -Ionen aus dem Wasser-Plasma mit den SiO_2 -Gruppen entstehen Silanolgruppen auf der Glasoberfläche. Nach Zugabe von 1 M Ethanolamin in DMSO kann es im nächsten Schritt zu einem nukleophilen Angriff der Silanolgruppe am α -Kohlenstoff benachbart zur Hydroxygruppe des Ethanolamins unter Freisetzung von Wasser kommen, wodurch eine kovalente Bindung zwischen der SiO_2 -Oberfläche und dem primären Amin entsteht.

Im Folgenden gilt es zu testen, ob durch die Abscheidung eines aminierten Silans eine Optimierung der Glasoberfläche, hinsichtlich der Anzahl an immobilisierten Amingruppen und der Homogenität der Beschichtung, im Vergleich zum Ethanolamin zu erzielen ist.

Amin-funktionalisierte Silane werden häufig zur Funktionalisierung von Silicium-Verbindungen (Voort and Vansant, 1996) und zur Aktivierung von Assay-Oberflächen eingesetzt (Jönsson et al., 2008; Vashist et al., 2011). Die ablaufende Reaktion ist eine Silanisierung, bei der es nach initiiender Hydrolyse durch

anschließende Kondensation zur kovalenten Bindung des Silans an die Glasoberfläche durch Ausbildung einer Si-O-Si Bindung kommt (siehe 1.4.2 *Oberflächenfunktionalisierung von Glas zur Biomolekül-Bindung* (Weetall, 1993)).

Durch eine erhöhte Anzahl von homogen verteilten Aminfunktionen könnte es im nächsten Schritt des sFIDA-Protokolls zu einer dichteren Beschichtung mit CMD kommen. Ziel ist es, die Oberfläche im sFIDA gleichmäßig mit Aminfunktionen und anschließend mit CMD zu beschichten, um einerseits die unspezifischen Wechselwirkungen von Biomolekülen mit der Glasoberfläche zu vermeiden und andererseits eine hohe Anzahl an Fänger-Antikörpern zu immobilisieren, und somit die Sensitivität des sFIDA zu erhöhen.

Die modifizierten Glasoberflächen sollen mit verschiedenen oberflächensensitiven Methoden charakterisiert werden. Der Einfluss der unterschiedlichen Funktionalisierungen auf die Benetzbarkeit der Glasoberfläche soll mittels Kontaktwinkelmessungen untersucht werden und die Veränderung der chemischen Zusammensetzung der Oberfläche soll anhand von XPS-Analysen verfolgt werden.

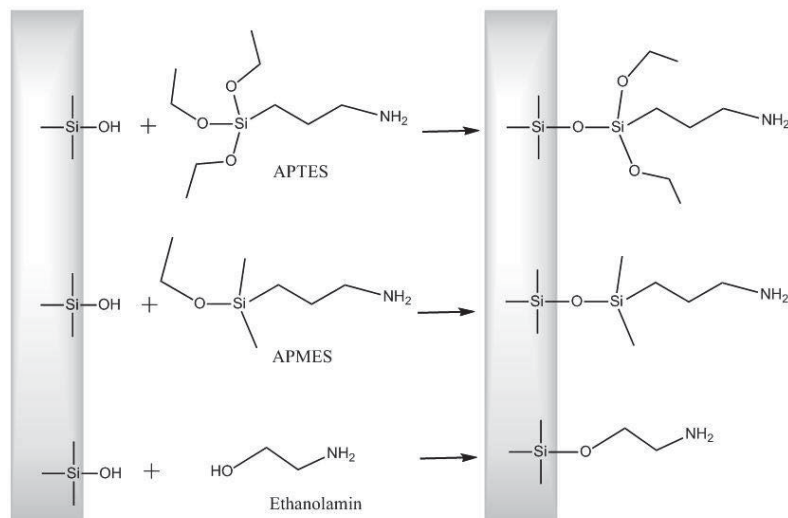


Abbildung 4-8: Aminierung der Glasoberfläche im sFIDA

Zur Aminierung der Glasoberfläche wurden drei verschiedene Amine getestet: APTES (3-(Aminopropyl)triethoxysilan), APMES (Aminopropyl)dimethylethoxysilan) und Ethanolamin.

Bei den in dieser Arbeit ausgewählten Silanen handelt es sich um APTES ((3-Aminopropyl)triethoxysilan) und APMES ((3-Aminopropyl)dimethylethoxysilan) (Abbildung 4-8). Die Abscheidung von APTES auf der Glasoberfläche soll aus der Flüssig- und Gasphase untersucht werden, die von APMES nur aus der Flüssigphase. Hier soll überprüft werden, ob durch die Sauerstoff-freien Seitenketten des APMES eine Polymerisation der Silane in Lösung verhindert werden kann und es so zu einer effizienteren Beschichtung der Glasoberfläche kommen kann. Alle durchgeführten Messungen werden mit der entsprechenden Beschichtungs-Effizienz von Ethanolamin verglichen.

4.2.2 Ergebnisse

4.2.2.1 Reinigung der Glasoberfläche und Einführung einer primären Amingruppe aus der Flüssigphase

Im Folgenden wurden die Beschichtungs-Effizienz der zwei Amin-terminierten Silane und von Ethanolamin auf der Glasoberfläche analysiert. Es wurden Kontaktwinkelmessungen und XPS-Analysen an den behandelten Glasplättchen durchgeführt. Wie oben erwähnt, wird im ersten Schritt der Oberflächenfunktionalisierung im sFIDA eine hydroxylierte Oberfläche mittels NaOH und Plasma-Behandlung generiert, deren hydrophiler Charakter zusammen mit weiteren Reinigungsschritten mittels Kontaktwinkelanalyse untersucht wurde (siehe 3.2.2.1 *Kontaktwinkelanalyse*).

Es gilt: je hydrophiler die Oberfläche, umso geringer ist der Kontaktwinkel. Aufgrund der stark hydrophilen Hydroxygruppen, welche durch die NaOH- und Plasma-Behandlung eingeführt wurden, war somit ein geringer Kontaktwinkel zu erwarten. Abbildung 4-9 a zeigt die Kontaktwinkelanalyse von vier, mittels verschiedenen Reinigungs- bzw. Aktivierungsmethoden behandelten, Glasoberflächen. Die Glasplättchen wurden je dreimal mit Ethanol und Wasser gewaschen (Messung 1) und eins von ihnen anschließend für drei Stunden mit 5 M NaOH behandelt (Messung 2). Ein mit Ethanol und Wasser gereinigtes Glasplättchen und ein mit Ethanol, Wasser und NaOH behandeltes Glasplättchen wurden anschließend für zehn Minuten in den Plasma Cleaner gegeben (Messung 3 und 4).

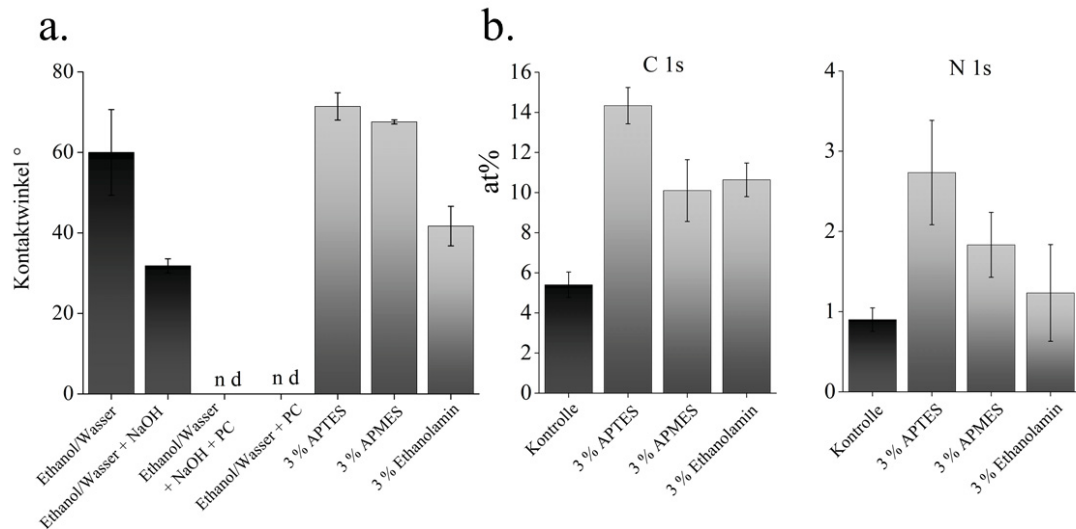


Abbildung 4-9: Analyse aminierter Glasoberflächen mittels Kontaktwinkelmessungen und XPS
a. In Schwarz: Kontaktwinkelmessungen auf unterschiedlich gereinigten Glasoberflächen (gespült mit Ethanol/Wasser-Gemisch, mit und ohne NaOH Reinigung, mit und ohne Plasma-Cleaner-Behandlung (nd: nicht bestimmt, da kein Wassertropfen immobilisiert werden konnte)). In Grau: Es wurden drei verschiedene Glasplättchen (5x5 cm) über Nacht in 3-prozentige Lösungen aus APTES ((3-Aminopropyl)triethoxysilan), APMES ((Aminopropyl)diethylethoxysilan) und Ethanolamin in Ethanol gelagert. Nach anschließendem Waschen und Trocknen wurde an fünf verschiedenen Stellen auf den Glasplättchen der Kontaktwinkel mittels Tropfenkonturanalyse bestimmt. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von jeweils fünf Messungen. **b.** XPS-Analyse der gereinigten und aminierten Glasoberflächen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Kohlenstoff und Stickstoffatomen als Mittelwert aus drei Messungen mit Standardabweichung an unterschiedlichen Punkten auf der Glasoberfläche. Als Kontrolle diente ein mittels Ethanol und Wasser gereinigtes und nicht-funktionalisiertes Glasplättchen.

Durch die zusätzliche Behandlung der mit Ethanol und Wasser gereinigten Glasplättchen mit NaOH zeigte sich bereits eine deutliche Verringerung des Kontaktwinkels von 59° auf 31°. Durch eine nachfolgende Plasma-Behandlung wurden die Oberflächen so hydrophil, dass eine Bestimmung des Kontaktwinkels nicht mehr möglich war, da der Tropfen direkt zerlaufen ist.

Es konnte anhand der Kontaktwinkelmessung der verschiedenen Glasreinigungs- und Aktivierungsmethoden gezeigt werden, dass die zusätzliche Behandlung der gereinigten Glasplättchen mit NaOH bereits zu einer erhöhten Hydrophilie und somit zur Bildung von Hydroxygruppen auf der Glasoberfläche beitrug, die Plasma-

Behandlung jedoch zur maximalen Hydrophilie und vermutlichen Absättigung der Oberfläche mit Hydroxygruppen führte.

Durch die Einführung der Silane und des Ethanolamins werden unpolare CH₂-Gruppen auf der Oberfläche immobilisiert. Hierdurch wird die Glasoberfläche hydrophober und es ist ein Anstieg des Kontaktwinkels zu erwarten. Abbildung 4-9 a zeigt die Kontaktwinkelmessungen der mit APTES, APMES und Ethanolamin behandelten Glasplättchen. Die Glasplättchen wurden hierzu nach Reinigung und Plasma-Aktivierung über Nacht in jeweils 3-prozentige Lösungen der Amine in Ethanol eingelegt und am nächsten Tag mehrfach mit Ethanol und Wasser abgespült und anschließend für zwei Stunden bei 110 °C getrocknet. Die gemessenen Kontaktwinkel für APTES ergaben einen Mittelwert von 71°, die für APMES 67° und die für Ethanolamin 41°. Die Erhöhung der Kontaktwinkel auf den Silan-modifizierten Glasoberflächen und der damit verbundene Anstieg der Oberflächenhydrophobie wiesen auf eine erfolgreiche Bindung der Silane auf der Oberfläche hin. Die Mittelwerte der Kontaktwinkelanalyse an fünf verschiedenen Messpunkten zeigten nur eine geringe Standardabweichung, was auf eine homogene Beschichtung hindeutete. Der im Vergleich zur silanisierten Oberfläche niedrige Kontaktwinkel der Ethanolamin-funktionalisierten Oberfläche ist ein erster Hinweis auf eine weniger effektive Oberflächenmodifizierung mit Ethanolamin.

Mit Hilfe der XPS kann die quantitative Elementzusammensetzung von Festkörperoberflächen mit einer Informationstiefe von 2 bis 3 nm bestimmt werden (siehe 3.2.2.2 *Röntgenphotoelektronenspektroskopie*). In Abbildung 4-9 b sind die atomaren Prozentanteile von Stickstoff und Kohlenstoff auf den jeweiligen Glasoberflächen dargestellt. Durch die Funktionalisierung der Glasoberfläche mit den verschiedenen Aminen kam es sowohl zu einer Zunahme des Kohlenstoffanteils als auch zu einer, wenn auch im Verhältnis geringen, Zunahme des Stickstoffanteils.

Der Anteil an Kohlenstoff und Stickstoff war mit 14 at% bzw. 2,7 at%, für die APTES-Oberfläche der höchste, während die APMES- und Ethanolamin-

Oberflächen beide einen Kohlenstoffanteil von 10 at% und einen Stickstoffanteil von 1,8 at% und 1,2 at% hatten. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde entschieden, die APTES-Funktionalisierung der APMES-Abscheidung vorzuziehen und im Folgenden die APTES-Behandlung der Glasoberfläche weiter zu untersuchen.

4.2.2.2 APTES-Abscheidung aus der Flüssig- und aus der Gasphase

Neben der Abscheidung von APTES aus Ethanol wurde im nächsten Schritt auch die Abscheidung aus der Gasphase untersucht, da es hierdurch zur Immobilisierung einer homogenen Monolage des Silans auf der Glasoberfläche kommen soll (Vandenberg et al., 1991).

Hierzu wurde APTES zusammen mit Triethylamin (TEA) unter Argon-Atmosphäre in einem Exsikkator in die Gasphase überführt (Ebner et al., 2007). Die Silanisierung erfolgte durch eine katalytische Aktivierung des Silans mittels TEA und einer anschließenden Kondensation des Silans auf der Glasoberfläche unter Ausbildung einer kovalenten Si-O-Si Bindung. Für die Kondensation wurden nach der Reaktion über Nacht die überschüssigen Chemikalien entnommen und das Silan auf der Glasoberfläche ausgehärtet, indem es unter Argon-Atmosphäre im Exsikkator entweder für mind. zwei Stunden auf 60 °C erhitzt wurde oder bei Raumtemperatur über Nacht im geschlossenen Exsikkator gelagert wurde.

Die Flüssigphasenabscheidung des APTES wurde im nächsten Versuch, nicht wie im vorherigen aus Ethanol, sondern aus Toluol durchgeführt, da laut Literatur die Silanisierung mit APTES unter möglichst trockenen Bedingungen durchgeführt werden sollte, um eine vorherige Polymerisation des APTES in der Flüssigkeit zu verhindern (Howarter and Youngblood, 2006). Des Weiteren sind bei Anwesenheit von Wasser die Silanolgruppen negativ geladen und die Amingruppen des APTES positiv, wodurch es bevorzugt zu elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem Amin und der Silanolgruppe, als zu einer kovalenten Si-O-Si-Bindung kommen kann

(Vandenberg et al., 1991). Um die Abscheidungseffizienz zu erhöhen, wurde die APTES-Konzentration in Toluol im nächsten Versuch von 3 % auf 7 % erhöht.

Als Kontrolle in der Kontaktwinkelmessung diente für die Flüssigphasenabscheidung ein Glasplättchen, welches nur in Toluol eingelegt war, für die Gasphasenabscheidung eines, das sich über Nacht unter Argon/TEA-Atmosphäre befand. Abbildung 4-10 a zeigt für beide Oberflächenmodifikationen einen deutlichen Anstieg des Kontaktwinkels im Vergleich zur Kontrolle. Durch die APTES-Abscheidung aus Toluol stieg der Kontaktwinkel von 30° auf 62°, durch die Abscheidung aus der Gasphase von 29° auf 64°. Im Vergleich zur APTES-Flüssigphasenabscheidung aus Ethanol mit einem Kontaktwinkel von 71° zeigte sich ein geringer Unterschied zum Kontaktwinkel der APTES-Abscheidung aus Toluol von 62°.

Für die Flüssigphasenabscheidung von APTES aus Toluol konnte in den XPS-Ergebnissen in Abbildung 4-10 b ein deutlicher Anstieg des Kohlenstoff-Anteils nach der Silanisierung im Vergleich zur Kontrolle von 7,5 auf 14 at% beobachtet werden. Für den Stickstoff-Anteil war hier ein Anstieg von 1,7 auf 2,8 at% zu verzeichnen.

Im Vergleich zu der APTES-Abscheidung aus Ethanol zeigte sich kein Unterschied im Kohlenstoffanteil (beide 14 at%) und ein zu vernachlässigender im Stickstoffanteil (2,7 at% EtOH / 2,8 at% Toluol) auf beiden Oberflächen. Durch die Gasphasenabscheidung von APTES stieg der Kohlenstoffanteil von 4,8 auf 7,4 at% und der Anteil an Stickstoff von 0,6 auf 2,2 at%.

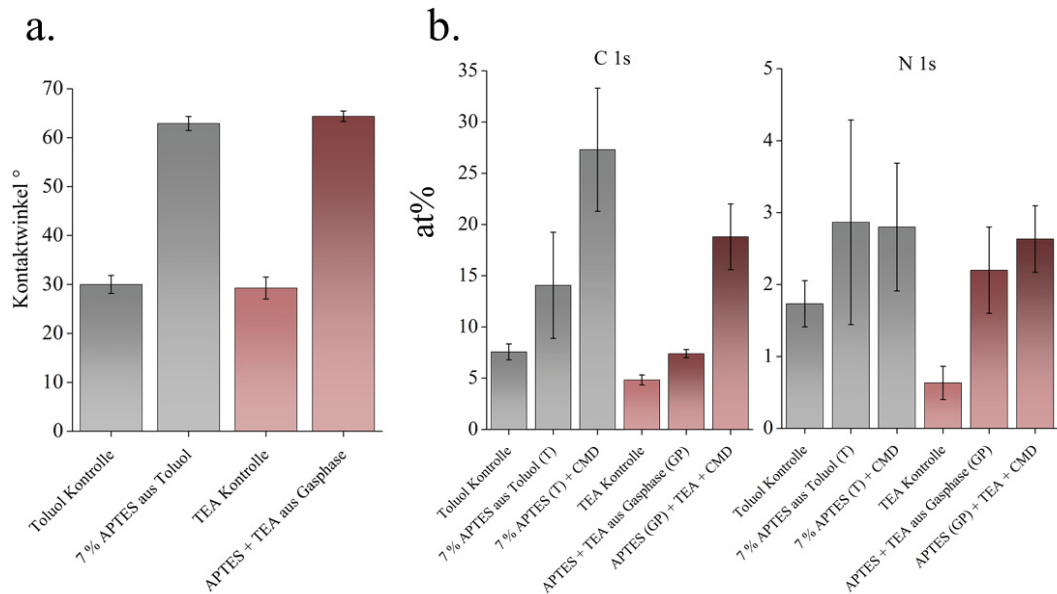


Abbildung 4-10: Analyse verschiedener APTES-Funktionalisierungen und CMD-Beschichtungen von Glasoberflächen mittels Kontaktwinkelmessungen und XPS

a. Kontaktwinkelmessung auf zwei verschiedenen APTES-aminieren Glasoberflächen. Grau: APTES-Abscheidung aus der Flüssigphase durch 7-prozentige APTES-Lösung in Toluol, Reaktion über Nacht. Rot: APTES-Abscheidung aus der Gasphase unter Argon-Atmosphäre mit TEA über Nacht. Mittelwerte der fünf verschiedenen Messpunkte pro Glasplättchen mit Standardabweichung. **b.** XPS-Analyse der APTES (flüssig/gas)-funktionalisierten Glasoberflächen und ihrer Weiterfunktionalisierung durch Carboxymethyldextran (CMD). Als Kontrolle dienten in beiden Experimenten Glasplättchen die entweder über Nacht in Toluol eingelegt waren oder sich in Argon/TEA-Atmosphäre befanden. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Kohlenstoff und Stickstoffatomen als Mittelwert mit Standardabweichung aus drei unterschiedlichen Messpunkten auf der Glasoberfläche.

Anhand der erhaltenen Verhältnisse von Kohlenstoff zu Stickstoff aus den XPS-Ergebnissen ließen sich Aussagen darüber treffen, in welchem Bindungszustand sich die Silane und das Ethanolamin befanden. Das Verhältnis von C:N betrug für nicht reagiertes APTES 9:1, für APMES 7:1 und für Ethanolamin 2:1. Tabelle 4-1 zeigt die Verhältnisse der erhaltenen XPS-Signale nach der Funktionalisierung. Für die Reaktion von Ethanolamin mit der Glasoberfläche war keine Veränderung des C:N-Verhältnisses zu erwarten, da es hier nur zur Bildung von Wasser kam. Das jedoch trotzdem angestiegene Verhältnis von Kohlenstoff gegenüber Stickstoff könnte durch noch vorhandenes Lösungsmittel (DMSO) erklärt werden. Das C:N-Verhältnis für

die Reaktion von APMES aus Ethanol war ebenfalls höher als erwartet. Hier wäre unter optimalen Bedingungen eine Reduktion des Verhältnisses von 7:1 auf 5:1 zu erwarten gewesen, wenn die Ethoxygruppe am Silicium durch eine Siloxan-Bindung ersetzt worden wäre. Es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass es zur Anlagerung von Kohlestoffdioxid aus der Atmosphäre gekommen ist, wodurch das erhöhte Kohlenstoff-Signal erklärt werden könnte.

Das Verhältnis von C:N nach der Abscheidung von APTES sollte im Idealfall 3:1 betragen, was durch die Reaktion aus der Gasphase erreicht wurde. Hier scheinen alle drei Ethoxygruppen durch Si-O-Si Bindungen ersetzt worden zu sein (Howarter and Youngblood, 2006). Bei der Abscheidung aus Ethanol oder Toluol wurde ein Verhältnis von 5:1 erhalten, was dafür spricht, dass die zwei Ethoxy-Seitengruppen am Silan noch vorhanden waren.

Tabelle 4-1: Kohlenstoff:Stickstoff-Verhältnisse aus den erhaltenen XPS-Ergebnissen für die Oberflächenfunktionalisierungen mit Ethanolamin, APMES und APTES

	EtNH ₂ DMSO	APMES Ethanol	APTES Ethanol	APTES Toluol	APTES Gasphase
C:N Verhältnis	8:1	6:1	5:1	5:1	3:1

Die in Tabelle 4-1 erstellten Verhältnisse scheinen zumindest für die Reaktion von APTES aus der Flüssig- oder Gasphase tendenzielle Aussagen über den erhaltenen Bindungszustand des Silans zu erlauben, welche jedoch aufgrund der genannten Ungenauigkeiten erneut bestätigt werden sollten.

Zusammenfassend handelt es sich somit sowohl bei der Flüssigphasen-, als auch bei der Gasphasenabscheidung von APTES auf Glas um zwei effektive Methoden, um primäre Amine auf der Oberfläche zu immobilisieren, was durch den Anstieg des Kontaktwinkels und den Anstieg der Kohlenstoff- und Stickstoff-Anteile auf den behandelten Glasoberflächen mittel Kontaktwinkelmessungen, sowie XPS-Analysen bestätigt werden konnte.

4.2.2.3 Analyse der CMD-Beschichtung auf den silanisierten Glasoberflächen

Neben den unterschiedlichen Silanisierungsmethoden der Glasoberflächen wurde auch die kovalente Bindung von Carboxymethyldextran (CMD) auf der Oberfläche, als der nächste Schritt des sFIDA-Protokolls, mittels XPS untersucht (Abbildung 4-10 b). Für die Immobilisierung von CMD wurden seine Carboxyfunktionen mittels EDC/NHS in NHS-Ester überführt, welche anschließend durch den nukleophilen Angriff des primären Amins der aminierten Glasoberfläche substituiert wurden. Es kam zur Ausbildung einer Amidbindung zwischen den Carbonsäuregruppen des CMD und der primären Amingruppe des Silans auf der Glasoberfläche.

Durch die Beschichtung der silanisierten Oberfläche mit CMD war ein Anstieg des Kohlenstoffanteils auf der Oberfläche zu erwarten, welcher sich bei der aus Toluol silanisierten Probe in einem Anstieg von 14 at% auf 27 at% zeigte und bei der, in der Gasphase behandelten Probe, in einem Anstieg des Kohlenstoffanteils von 7,4 at% auf 19 at%. Somit konnte belegt werden, dass es durch beide APTES-Immobilisierungsmethoden möglich war CMD auf die Glasoberfläche aufzubringen. Im folgenden Experiment galt es daher, den Einfluss der verschieden behandelten Oberflächen im sFIDA zu überprüfen.

4.2.2.4 Vergleich von unterschiedlich modifizierten Glasoberflächen im sFIDA

In der hier beschriebenen Versuchsreihe sollte geklärt werden, welchen Einfluss die Oberflächenbehandlungen mit APTES gegenüber der ursprünglichen Behandlung mit Ethanolamin auf die Analyse von Konzentrationsreihen von CB-Oligomere im sFIDA haben.

Zur Generierung der Ethanolamin-Oberfläche (Abbildung 4-11 a) wurde nach NaOH- und Plasma-Aktivierung der Glasoberfläche eine 1 M Ethanolamin-Lösung in DMSO (6,25 % v/v) in die Wells gefüllt und über Nacht darin gelagert. Die Durchführung des weiteren Protokolls erfolgte ab hier in den folgenden sFIDA-Vergleichsversuchen identisch. Die Amin-funktionalisierte Oberfläche wurde mit

CMD und Fänger-Antikörper beschichtet, bevor Proben aufgetragen wurden. Die Detektion der CB-Oligomere erfolgte durch 6E10-ATTO488 und IC16-AlexaFluor633. Abbildung 4-11 b zeigt den sFIDA readout einer Verdünnungsreihe von CB-Oligomeren auf einer APTES-Oberfläche, die durch Flüssigphasenabscheidung aus Ethanol aufgebracht wurde. Hierzu wurde eine 7-prozentige APTES-Lösung in Ethanol hergestellt und über Nacht auf die NaOH/Plasma aktivierte Glasoberfläche pipettiert. Die in Abbildung 4-11 c dargestellte sFIDA-Messung wurde auf einer APTES-Oberfläche durchgeführt, die durch eine Gasphasenabscheidung von APTES generiert wurde. Dazu wurde, wie bereits oben beschrieben, APTES zusammen mit TEA in einem mit Argon befüllten Exsikkator in die Gasphase überführt. Die ZAT-Platte wurde über Nacht in dieser Atmosphäre gelagert, bevor am nächsten Tag die überschüssigen Chemikalien entnommen wurden und der Exsikkator erneut mit Argon gespült und die Platte darin für mehrere Stunden zur Trocknung gelagert wurde.

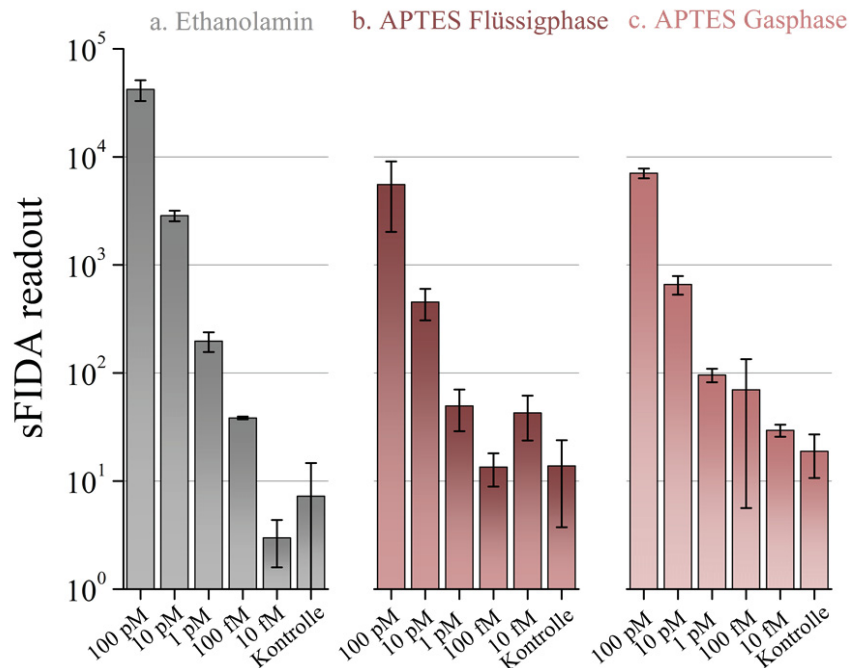


Abbildung 4-11: Analyse verschiedener Konzentrationen von CB-Oligomeren in PBS auf verschiedenen Glasfunktionalisierungen im sFIDA

a. die Glasfunktionalisierung mit Ethanolamin erfolgte aus DMSO über Nacht. **b.** die APTES-Abscheidung aus der Flüssigphase erfolgte aus einer 7-prozentigen APTES-Lösung aus Ethanol. **c.** Die APTES-Abscheidung aus der Gasphase erfolgte aus einer Argon/APTES/TEA-Atmosphäre über Nacht. Die CB-Oligomere wurden in PBS verdünnt und jede Konzentration in dreifacher Bestimmung gemessen. Als Kontrolle diente PBS. Dargestellt ist der Mittelwert der Dreifachbestimmung mit der dazugehörigen Standardabweichung. Als Detektions-Antikörper dienten: 6E10-ATTO488 und IC16-AlexaFluor633. Die Schwellenwerte für die Analyse lagen für Kanal 0/Kanal 1 bei 5000/5000 (Exp 140520 und 141117).

Auf der Ethanolamin-Oberfläche im sFIDA zeigte sich eine nahezu lineare Korrelation des sFIDA readout zu der eingesetzten CB-Oligomer-Konzentration bis in den unteren femtomolaren Bereich. Auch für die APTES-beschichteten Oberflächen zeigte sich eine Korrelation der CB-Oligomer-Konzentration zum sFIDA readout, welche jedoch nur im oberen Konzentrationsbereich linear verlief. Beim Vergleich der beiden APTES-Beschichtungen konnte für die Beschichtung aus der Gasphase eine kontinuierliche Abnahme des sFIDA readouts mit geringer werdender Probenkonzentration bis zur Negativkontrolle beobachtet werden. Für die

APTES-Beschichtung aus der Flüssigphase war dieser Zusammenhang nur bis zu höheren CB-Oligomer-Konzentrationen gegeben.

Der sFIDA auf der Gasphasen-beschichteten Oberfläche ermöglichte somit eine sensitivere Quantifizierung der CB-Oligomere bis zu einer Konzentration von 10 fM im Vergleich zur Flüssigphasen-beschichteten Oberfläche bis 10 pM. Auch die XPS-Ergebnisse für die Gasphasenabscheidung haben auf eine effiziente Oberflächenbeschichtung schließen lassen. Aus diesen Gründen wurde für weitere Versuche die APTES-Beschichtung aus der Gasphase der APTES-Beschichtung aus der Flüssigphase vorgezogen.

4.2.2.5 Analyse von A β -SiNP in Wasser, Liquor und Plasma auf verschiedenen Glasoberflächen im sFIDA

Im Folgenden wurden die beiden Glasoberflächen mit der Ethanolamin-Beschichtung und der APTES-Beschichtung aus der Gasphase im sFIDA untersucht. Bei den dafür verwendeten Standardmolekülen handelte es sich um 80 nm große SiNP, deren Oberflächen mit A β -Monomeren funktionalisiert waren. Verschiedene Varianten von A β -SiNP wurden innerhalb dieser Arbeit als zuverlässiger Standard im sFIDA etabliert (siehe *4.3 Entwicklung und Analyse von Standardmolekülen im sFIDA*).

Hierzu wurden zwei ZAT-Platten gereinigt und durch NaOH- und Plasma-Behandlung aktiviert und anschließend mit Ethanolamin aus DMSO oder APTES aus der Gasphase funktionalisiert. Anschließend folgten die CMD-Beschichtung und die kovalente Bindung der Fänger-Antikörper, welche im nächsten Schritt die A β -SiNP gebunden haben. A β -SiNP wurden in Wasser, Liquor und Plasma von 300 pM bis 3 fM verdünnt und auf den unterschiedlich funktionalisierten sFIDA-Oberflächen gemessen. Abbildung 4-12 zeigt die sFIDA readouts für die verschiedenen A β -SiNP Verdünnungen auf der Ethanolamin-Oberfläche im sFIDA.

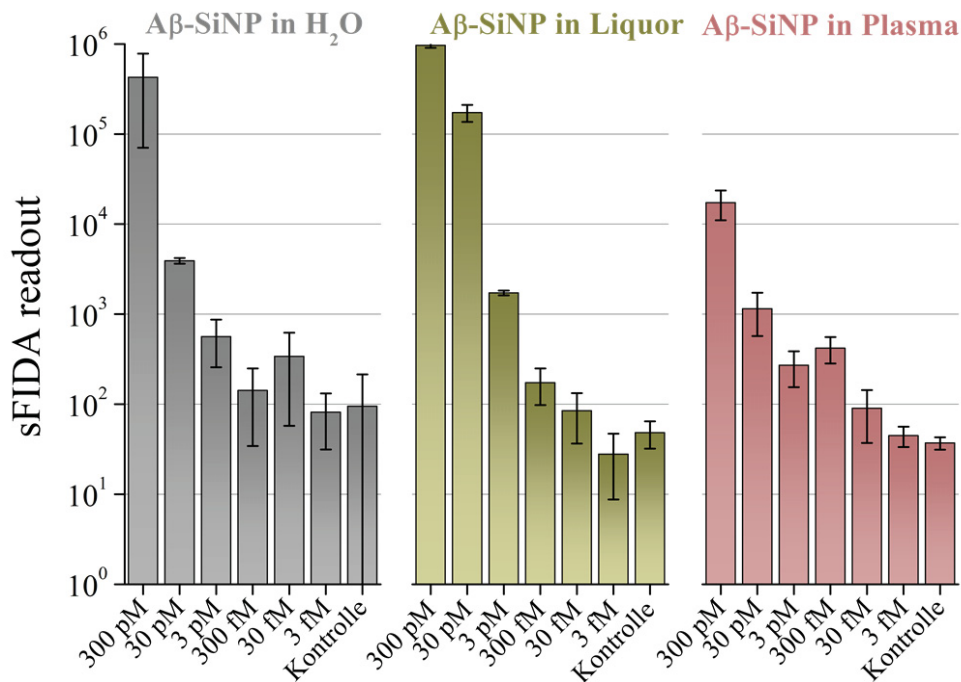


Abbildung 4-12: Analyse von Aβ-SiNP in Wasser, Liquor und Plasma auf Ethanolamin-Oberfläche im sFIDA

Die Glasfunktionalisierung mit Ethanolamin erfolgte aus DMSO über Nacht. Die Aβ-SiNP wurden in Wasser (grau), in humanem Liquor (grün) und in humanem Blutplasma (rot) verdünnt. Die dargestellten sFIDA readouts basieren auf dem Mittelwert einer dreifachen Bestimmung pro Konzentration mit der zugehörigen Standardabweichung. Als Kontrolle wurden dieselben Flüssigkeiten wie zur Verdünnung der Aβ-SiNP eingesetzt (Wasser, Liquor oder Plasma). Als Detektions-Antikörper dienen: 6E10-ATTO488 und IC16-AlexaFluor633. Die Schwellenwerte für die Analysen lagen für Kanal 0/Kanal 1 für Wasser und Liquor bei 5000/5000 und für Plasma bei 8000/5000 (Exp. 141117).

Die Aβ-SiNP Verdünnung in Wasser zeigte einen konzentrationsabhängigen sFIDA readout für die ersten drei Konzentrationen bis ungefähr 3 pM. Für die Verdünnung der Aβ-SiNP in Liquor stellte sich eine Nachweisgrenze im unteren femtomolaren Bereich ein. Die in Plasma verdünnte Aβ-SiNP-Konzentrationsreihe zeigte einen entsprechenden Zusammenhang zum sFIDA readout über die ersten beiden Größenordnungen bis 30 pM.

In dem sFIDA auf der APTES-Oberfläche (Abbildung 4-13) konnten die Aβ-SiNP sowohl in Wasser, Liquor und Plasma über drei bis vier Größenordnungen bis in den femtomolaren Bereich quantifiziert werden.

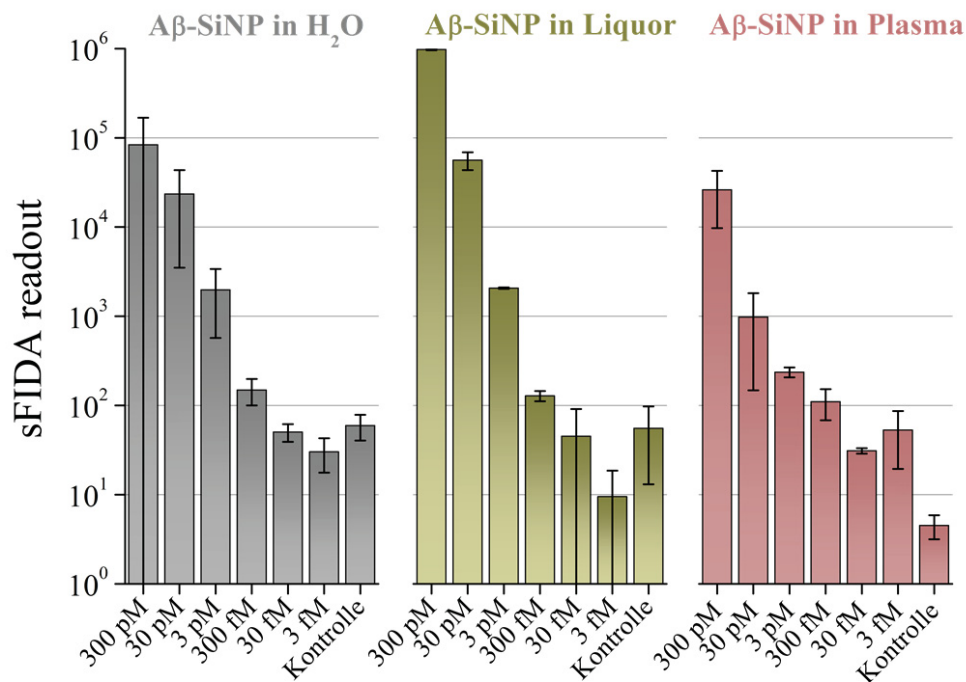


Abbildung 4-13: Analyse von Aβ-SiNP in Wasser, Liquor und Plasma auf APTES-Oberfläche im sFIDA

Die APTES-Abscheidung aus der Gasphase erfolgte aus einer Argon/APTES/TEA-Atmosphäre über Nacht. Die CB-Oligomere wurden in Wasser (grau), in humanem Liquor (grün) und humanem Blutplasma (rot) verdünnt und jede Konzentration in dreifacher Bestimmung im sFIDA gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert zusammen mit der Standardabweichung. Als Kontrolle wurden dieselben Flüssigkeiten wie zur Verdünnung der Aβ-SiNP eingesetzt (Wasser, Liquor oder Plasma). Als Detektions-Antikörper dienten: 6E10-ATTO488 und IC16-AlexaFluor633. Die Schwellenwerte für die Analysen lagen für Kanal 0/Kanal 1 für Wasser bei 3000/4000, für Liquor bei 5000/3000 und für Plasma bei 4000/5000 (Exp. 141117).

Während die Nachweisgrenzen der Aβ-SiNP in den verschiedenen Flüssigkeiten auf der Ethanolamin-Oberfläche zwischen Konzentrationen von 30 pM bis 30 fM schwankten (Abbildung 4-12), konnte auf der APTES-Oberfläche eine Korrelation des sFIDA readouts zur eingesetzten Aβ-SiNP-Konzentration für alle drei Verdünnungsreihen bis in den femtomolaren Bereich beobachtet werden (Abbildung 4-13).

4.2.3 Diskussion

In diesem Teil der Arbeit sollte überprüft werden, ob die Silanisierung mit einem Aminosilan eine Alternative zur Ethanolamin-Behandlung im sFIDA-Protokoll darstellt, um primäre Amingruppen auf der Glasoberfläche zu binden. Die Vermessung von Kontaktwinkeln auf den unterschiedlich modifizierten Glasoberflächen zeigte eine stärkere Zunahme des Winkels nach der Funktionalisierung mit APTES im Vergleich zu der mit Ethanolamin, was auf eine effektivere Immobilisierung von APTES im Vergleich zu Ethanolamin schließen ließ (Abbildung 4-9). Die Untersuchung verschiedener APTES-Abscheidungen aus Ethanol, Toluol und aus der Gasphase mittels XPS belegte die effizienteste APTES-Immobilisierung durch die Abscheidung aus der Gasphase, da man anhand der Kohlenstoff:Stickstoff-Verhältnisse abschätzen konnte, dass im Fall der APTES-Gasphasenabscheidung alle Ethoxygruppen durch Siloxanbindungen ersetzt wurden (Tabelle 4-1). Generell wird die Silanisierung mit APTES aus der Gasphase favorisiert, um homogene Monolagen auf Silicium-haltigen Oberflächen, wie z. B. Glas oder Silicium-Wafer aufzubringen (Ebner et al., 2007). In der Flüssigphase kann es zu elektrostatischen Wechselwirkungen und Polymerisationen kommen, die die kovalente Bindung von APTES an die Glasoberfläche möglicherweise verhindern könnte (Vandenberg et al., 1991).

Innerhalb der nächsten Versuche wurden Konzentrationsreihen von Standardmolekülen auf den Oberflächen im sFIDA gemessen. CB-Oligomere in PBS-Puffer konnte sowohl auf der Ethanolamin-Oberfläche, als auch auf der APTES-Oberfläche aus der Gasphase im sFIDA bis in den femtomolaren Bereich quantifiziert werden.

80 nm große β -SiNP konnten im sFIDA sowohl auf der APTES-Oberfläche aus der Gasphase, als auch auf der Ethanolamin-Oberfläche bis zu Konzentrationen zwischen 300 fM und 30 fM in Wasser, Liquor und Plasma gemessen werden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass beide Oberflächen zu ähnlich sensitiven

Quantifizierungen von A β -Standardmolekülen im sFIDA führen können und es trotz der effizienteren Abscheidung von APTES im Vergleich zu Ethanolamin keine höhere Sensitivität im sFIDA erzielt werden konnte.

Die Durchführung der APTES-Beschichtung aus der Gasphase war experimentell weniger aufwendig als die Beschichtung mit Ethanolamin, da das angewandte Protokoll frei von Wasch-Schritten war und eine Lagerung der aminierten Oberfläche in der Gasphase von mehreren Tagen erlaubt und daher gut vorbereitet werden kann. Nach Abschluss dieser Versuchsreihe wurde im folgenden Verlauf dieser Arbeit daher nur noch mit der APTES-Beschichtung aus der Gasphase im sFIDA gearbeitet.

Innerhalb dieser Arbeit wurde die Reinigung, Aminierung und CMD-Beschichtung der Oberfläche des sFIDA näher untersucht. Anhand der durchgeführten Messungen konnten jedoch keine Aussagen über die Zugänglichkeit der Amin-Gruppen und die entstandenen Strukturen des APTES oder des CMD auf den Glasoberflächen getroffen werden. Hierzu müssen Experimente zur weiteren Charakterisierung folgen, wie beispielsweise AFM-Aufnahmen der Oberfläche, Ellipsometrie-Messungen zur Bestimmung der Schichtdicke und Bindungsstudien zur Zugänglichkeit des primären Amins und der Carboxygruppen des CMD, z. B. mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen (Jönsson et al., 2008; Xing et al., 2007).

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der chemischen Modifikation der Glasoberfläche. Es wurden Methoden wie Kontaktwinkelmessungen und XPS-Analysen etabliert, welche zur Qualitätskontrolle der Glasoberflächenbeschichtung des sFIDA eingesetzt werden können.

Auch der weitere Oberflächenaufbau des sFIDA-Assays kann analysiert, und bei Bedarf optimiert werden. Zur Quantifizierung der gebundenen Fänger-Antikörper können beispielsweise Biolayer-Interferometrie (BLI) Messung durchgeführt werden. Die Sensoroberfläche kann anhand des sFIDA-Protokolls beschichtet und

mit Fänger-Antikörpern beladen werden. Während der Immobilisierung der Fänger-Antikörper auf der Sensoroberfläche wird die Verschiebung des Interferenzmusters in Echtzeit gemessen, was ein direktes Maß für die Veränderung der optischen Dichte der biologischen Schicht ist und quantitative Aussagen über die Anzahl an immobilisierten Fänger-Antikörpern erlaubt. Durch diese Methode können die weiteren Inkubationszeiten optimiert werden, da man in Echtzeit erkennen kann, zu welchem Zeitpunkt die Schichtdicke nicht mehr zunimmt und die Oberfläche gesättigt ist. Auch die Bindung der Proben und Detektions-Antikörper könnte auf diese Weise untersucht werden.

4.3 Entwicklung und Analyse von Standardmolekülen im sFIDA

4.3.1 Zielsetzung

Der Einsatz von geeigneten Standardmolekülen kann die Kalibrierung, Optimierung und den Vergleich von verschiedenen Biomarker-basierten Analysemethoden in der AD-Diagnose ermöglichen. Ein Standard würde in jedem Experiment die Validierung der Sensitivität der jeweiligen Messung erlauben.

Dieser Teil der Arbeit gilt der Analyse und Entwicklung von Standardmolekülen im sFIDA, mit Hilfe derer die Sensitivität des Assays zur Quantifizierung von A β -Oligomeren unter Puffer-Bedingungen und in Anwesenheit von biologischem Material bestimmt werden soll. Ein passendes Standardmolekül für die Immundetektion von A β -Oligomeren in der Diagnose der AD sollte die Anforderungen an eine definierte Größe, eine Langzeitstabilität ohne Dissoziation oder weitere Aggregation und die Kenntnis über die Anzahl seiner zugänglichen Epitope erfüllen.

Bei den in dieser Arbeit verwendeten kommerziell erhältlichen CB-Oligomere handelt es sich um stabilisierte Oligomere bestehend aus ca. 200 A β ₁₋₄₂-Monomeren mit einer bekannten Konzentration an Oligomer-Einheiten. Anhand von 'spiking'-Experimenten von CB-Oligomeren in Liquor soll herausgefunden werden, ob die Anwesenheit von Biomolekülen zu einem Sensitivitätsverlust der sFIDA-Analyse führt.

Der zweite Teil dieses Abschnittes soll der Entwicklung und Charakterisierung eines Standardmoleküls von definierter Größe und hoher Stabilität mit einer bekannten Anzahl an Peptidstrukturen beschrieben gelten. Zudem soll seine Eignung als Standard im sFIDA in verschiedenen Körperflüssigkeiten überprüft werden.

4.3.2 Ergebnisse

4.3.2.1 Analyse von CB-Oligomeren

Analyse von CB-Oligomeren in PBS im sFIDA

Es wurden Konzentrationsreihen von 100 pM bis 10 fM von CB-Oligomere in PBS hergestellt und im sFIDA analysiert. Als Negativkontrolle diente PBS. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-14 dargestellt. Es zeigte sich eine nahezu lineare Korrelation des sFIDA readouts mit der eingesetzten CB-Oligomer Konzentration bis zu 100 fM, wodurch ihre sensitive Analyse unter Pufferbedingungen im sFIDA belegt werden konnte.

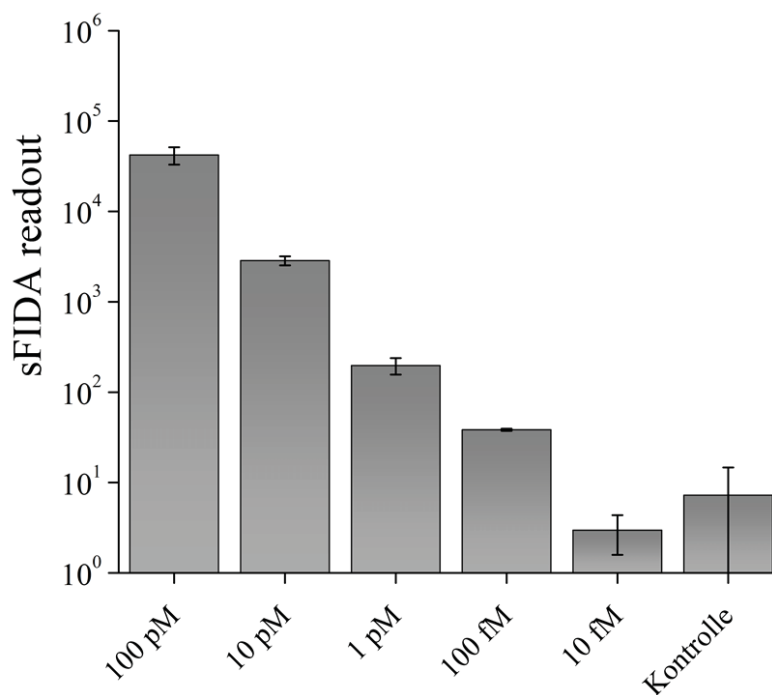


Abbildung 4-14: Analyse von CB-Oligomeren in PBS im sFIDA

CB-Oligomere wurden von 100 pM bis 10 fM in PBS verdünnt. PBS diente als Kontrolle. Der dargestellte sFIDA readout basiert auf dem Mittelwert einer dreifachen Bestimmung pro Konzentration mit der zugehörigen Standardabweichung. Der sFIDA wurde auf einer Ethanolamin-Oberfläche durchgeführt. Als Detektions-Antikörper dienten: 6E10-ATTO488 und IC16-AlexaFluor633. Die Schwellenwerte für die Analyse lagen bei 5000/5000 für Kanal 0/Kanal 1 (Exp: 140520).

Analyse von CB-Oligomeren in Liquor im sFIDA

Zur weiteren Analyse der CB-Oligomere im sFIDA wurden 'spiking'-Experimente durchgeführt, in denen eine bekannte Konzentration an CB-Oligomeren humanem Liquor zugesetzt wurde. Eine 'ungespikte' Liquor-Probe diente als Kontrolle (Abbildung 4-15). In dem Experiment galt es die Sensitivität des Nachweises von A β -Oligomeren in Anwesenheit von biologischem Material zu überprüfen. Biologisches Material, wie zum Beispiel Liquor, weist eine hohe Konzentration an Proteinen auf, welche die Sensitivität des Assays durch die Maskierung von A β -Epitopen möglicherweise beeinflussen könnten. Abbildung 4-15 zeigt den sFIDA readout für eine Konzentrationsreihe von CB-Oligomeren von 24,2 pM bis 2,42 fM in humanem Liquor.

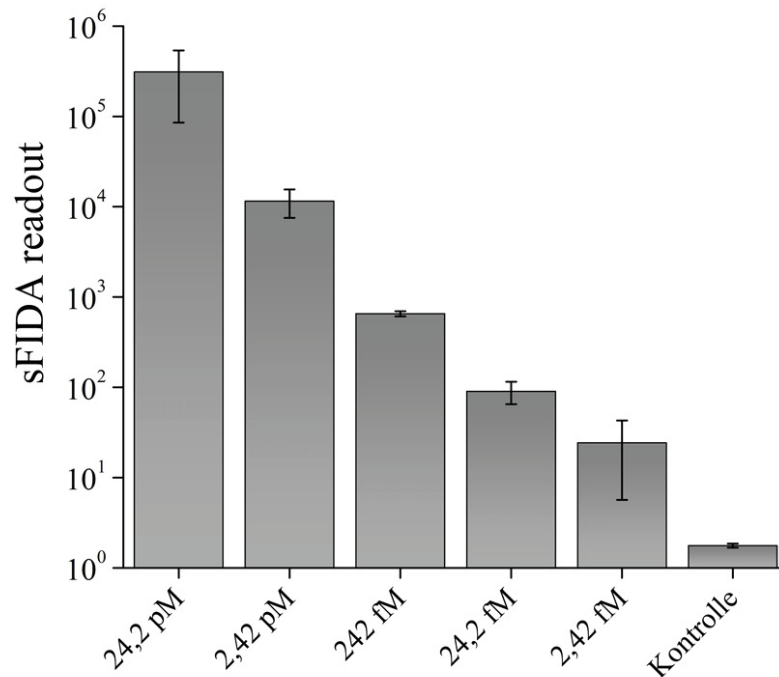


Abbildung 4-15: Analyse von CB-Oligomeren in Liquor im sFIDA

CB-Oligomere wurden von 24,2 pM bis 2,42 fM in humanem Liquor verdünnt. Als Kontrolle diente 'ungespikter' Liquor. Der dargestellte sFIDA readout basiert auf dem Mittelwert einer dreifachen Bestimmung pro Konzentration mit der zugehörigen Standardabweichung. Der sFIDA wurde auf einer Ethanolamin-Oberfläche durchgeführt. Als Detektions-Antikörper dienen: 6E10-ATTO488 und IC16-AlexaFluor633. Die Schwellenwerte für die Analyse lagen für Kanal 0/Kanal 1 bei 2000/4000 (Exp: 130404).

Es stellte sich eine nahezu lineare Abhängigkeit zwischen der Konzentration der zugesetzten CB-Oligomere und dem sFIDA readout bis zu einer Konzentration von 2,42 fM ein, womit bestätigt werden konnte, dass sFIDA eine sensitive Methode zur Quantifizierung von CB-Oligomeren in Anwesenheit von Liquor darstellt.

Einfluss von Tau-Gefrier-Zyklen auf die Analyse von CB-Oligomeren im sFIDA

Im folgenden Experiment sollte geklärt werden, in wie fern Tau-Gefrier-Zyklen von CB-Oligomeren in Liquor ihre Detektion im sFIDA beeinflussen. Es ist bekannt, dass Tau-Gefrier-Zyklen die Eigenschaften und Morphologien von Biomolekülen verändern können.

Zur Überprüfung wurden CB-Oligomere auf 24,2 pM in humanem Liquor verdünnt und für 20 Minuten bei -80°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde ein Aliquot entnommen (Zyklus 1) und der Rest wieder eingefroren. Nach 20 Minuten wurde die Probe wieder aufgetaut (Zyklus 2) und ein weiteres Aliquot entnommen. Die CB-Oligomer-Proben aus Zyklus 1 und 2, sowie eine nicht eingefrorene Probe wurden anschließend weiter bis 242 fM in Liquor verdünnt und im sFIDA vermessen. Die Kontroll-Liquorproben wurden den gleichen Gefrierzyklen unterzogen.

In Abbildung 4-16 sind die sFIDA readouts der drei CB-Oligomer Verdünnungsreihen dargestellt. Die verschiedenen Konzentrationen der nicht eingefrorenen CB-Oligomere (frisch) zeigten eine lineare Abhängigkeit zum sFIDA readout. Die einmal eingefrorene Probe (Zyklus 1) wies für die beiden höheren Konzentrationen einen zehnfach niedrigeren sFIDA readout auf, als die frische Probe. Für die Konzentration von 242 fM CB-Oligomeren ließ sich keine Veränderung des sFIDA readout verzeichnen. Die Probe aus Zyklus 2 zeigte insgesamt einen niedrigeren sFIDA readout als die nicht eingefrorene Probe. Für die höchste und niedrigste Konzentration an CB-Oligomeren war eine zusätzliche Signalabschwächung zur Probe aus Zyklus 1 zu erkennen.

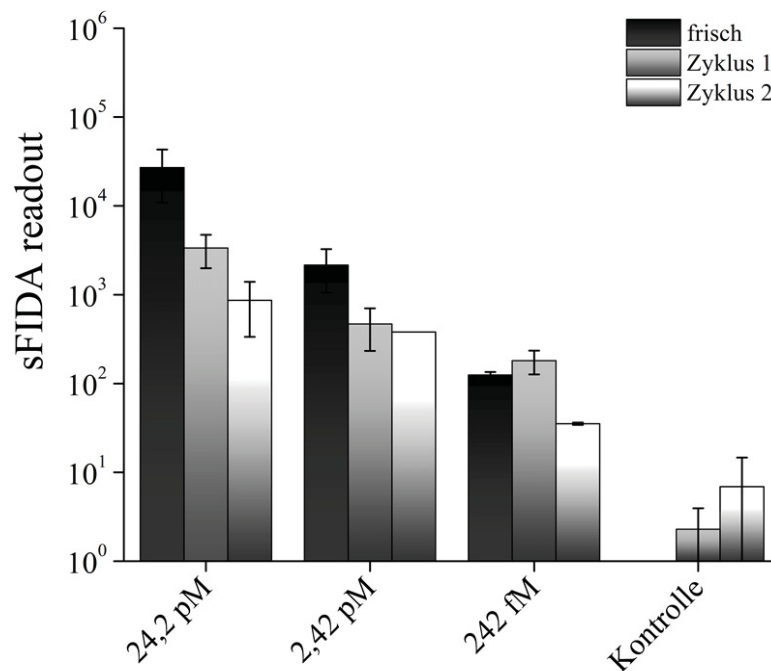


Abbildung 4-16: Tau-Gefrier Zyklen von CB-Oligomeren verdünnt in Liquor im sFIDA

CB-Oligomere wurden humanem Liquor zugesetzt und bis zu zwei Tau-Gefrier-Zyklen unterzogen. Die frische 'gespikete' Probe (schwarz) wurde lediglich bei 4°C gelagert. Die Probe aus Zyklus 1 (dunkelgrau): wurde einmal für 20 Minuten bei -80°C eingefroren, bevor sie im sFIDA vermessen wurde. Die CB-Oligomer Probe aus Zyklus 2 (hellgrau) wurde zweimal für 20 Minuten bei -80 °C eingefroren und anschließend vermessen. Die Kontroll-Liquorproben wurden den gleichen Zyklen unterzogen. Der dargestellte sFIDA readout basiert auf dem Mittelwert einer dreifachen Bestimmung pro Konzentration mit der zugehörigen Standardabweichung. Der sFIDA wurde auf einer Ethanolamin-Oberfläche durchgeführt. Als Detektions-AK dienten: 6E10-ATTO488 und IC16-ATTO647N. Die Schwellenwerte für die Analyse lagen für Kanal 0/Kanal 1 bei 5000/5000. (Exp: 130327).

Es lässt sich zusammenfassen, dass es durch das Einfrieren von CB-Oligomer-'gespikten' Liquor-Proben zu einer Reduktion des sFIDA readouts kommen kann, welche sich durch zunehmende Anzahl an Gefrier-Zyklen verstärken kann.

4.3.2.2 Synthese und Charakterisierung von Standardmolekülen

Synthesestrategie von biofunktionalisierten SiNP

Kern des in dieser Arbeit entwickelten Standardmoleküls war ein SiNP. Die Herstellung dessen erfolgte mittels der sog. Stöber-Synthese (Stöber et al., 1968). Dabei kam es in einem Gemisch aus TEOS, Ammoniak, Wasser und Ethanol durch die Hydrolyse von TEOS zur Ausbildung von Si-O-Si Bindungen und der Formierung von SiNP. SiNP haben eine stabile amorphe Struktur, sind bis zu einer Größe von > 50 nm nahezu monodispers, sind nicht toxisch, biologisch inert und lassen sich in Wasser oder Ethanol unbegrenzt lange lagern. Durch ihre, von Hydroxygruppen geprägte, homogene Oberfläche lassen sie sich auf einfache Weise chemisch modifizieren (siehe Kapitel 1.5 *Nanopartikel*).

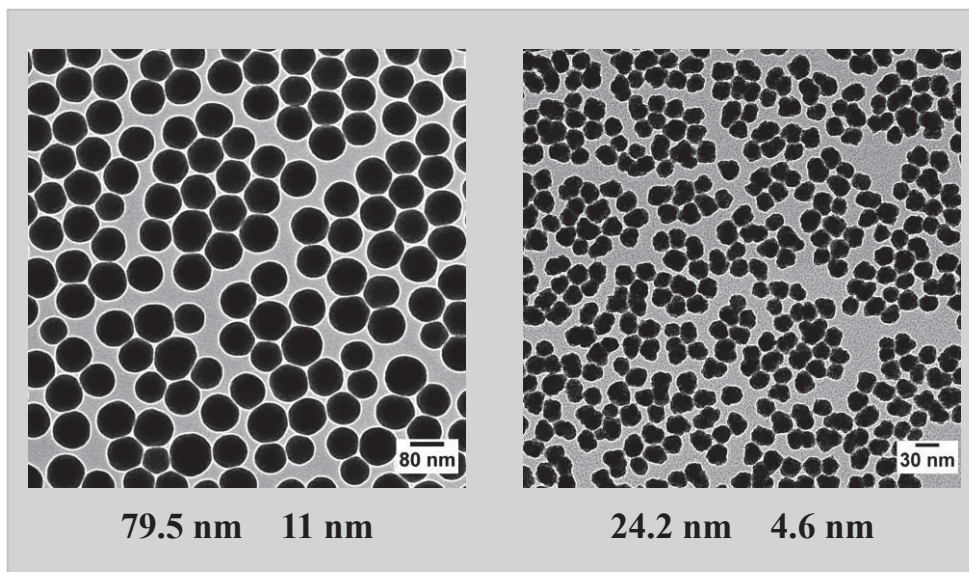


Abbildung 4-17: TEM-Aufnahmen von 80 nm und 24 nm großen SiNP

Die Synthese der SiNP erfolgt mittels des Stöber-Verfahrens. Die Aufnahmen wurden an einem Zeiss Libra 120 Transmissionselektronenmikroskop durchgeführt. Dargestellt ist der, anhand von 250 Partikeln berechnete, Feret-Durchmesser und die dazugehörige Standardabweichung.

In dieser Arbeit wurden SiNP durch die oben beschriebene Methode mit einem Feret-Durchmesser von 80 nm und 24 nm hergestellt. Abbildung 4-17 zeigt

Transmissionselektronenmikroskopie-Aufnahmen der synthetisierten SiNP. Während 80 nm großen SiNP eine nahezu kugelförmige Struktur aufwiesen, waren die 24 nm großen SiNP eher polyedrisch geformt, bedingt durch den Mechanismus der Partikelbildung (Masalov et al., 2011).

Die weitere Funktionalisierung der SiNP ist schematisch in Abbildung 4-18 dargestellt.

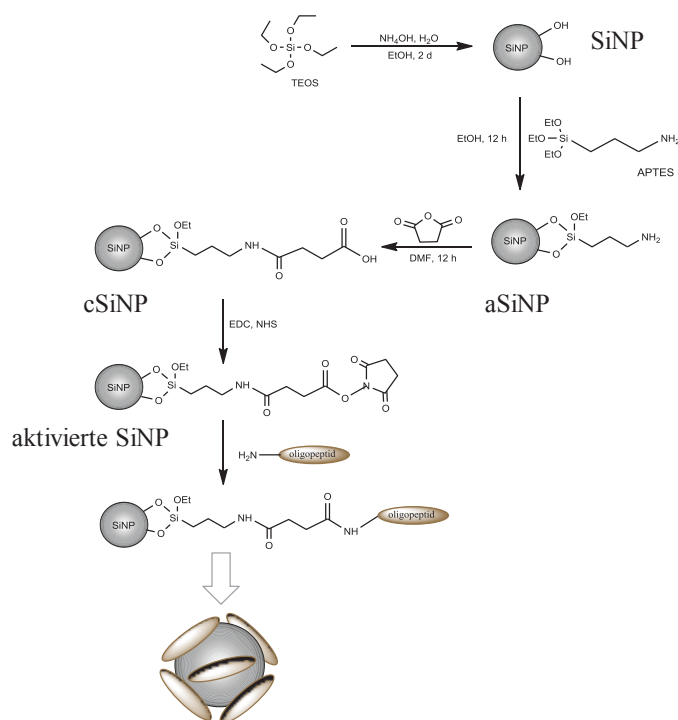


Abbildung 4-18: Synthese-Strategie von biofunktionalisierten SiNP

Durch die Hydrolyse von TEOS in Anwesenheit von Wasser und Ammoniak kommt es zur Bildung von SiNP. Durch die Kondensation von APTES auf der Partikeloberfläche wird das Silan im nächsten Schritt kovalent an die Partikeloberfläche gebunden (2, aSiNP). Die, durch APTES eingebrachte primäre Amingruppe reagiert mit Bernsteinsäureanhydrid unter Ausbildung einer Amidbindung und führt eine endständige Carboxygruppe auf der Partikeloberfläche (cSiNP) ein. Die Carboxygruppe wird durch Umsetzung mit EDC/NHS in einen aktivierten NHS-Ester umgewandelt (aktivierte SiNP), welche durch Reaktion mit einem primären Amin des Peptides substituiert wird, was zur Ausbildung einer Amidbindung führt, und so das Polypeptid kovalent mit der SiNP-Oberfläche verknüpft.

Nach erfolgreicher Synthese und TEM-Charakterisierung wurden die SiNP mit einer Lösung von APTES in Ethanol versetzt. Hier kam es durch eine Silanisierung zur

kovalenten Bindung von APTES an den SiNP, wodurch eine primäre Amingruppe auf der Oberfläche eingeführt wurde (aminiertes SiNP, aSiNP). Zur Einführung einer Carboxygruppe wurden die aSiNP im nächsten Schritt unter trockenen Bedingungen in DMF mit Bernsteinsäureanhydrid umgesetzt. Hier kam es durch einen nukleophilen Angriff des primären Amins am Carbonyl-Kohlenstoff des Anhydrids zur Ringöffnung unter Ausbildung einer Amidbindung und zu einer Carboxy-Terminierung des SiNP (carboxyliertes SiNP, cSiNP). Die vorhandene Carboxygruppe wurde im nächsten Schritt mittels EDC/NHS aktiviert und in einen reaktiven NHS-Ester umgesetzt (aktivierte SiNP). Dieser Aktivierungsschritt war die Voraussetzung für die folgende, kovalente Bindung eines Polypeptides. Im letzten Schritt reagierte eine primäre Amingruppe, der N-Terminus oder die Lysin-Seitenkette eines Biomoleküls (zB. Polypeptid) mit dem aktivierten SiNP unter Substitution des NHS-Esters und Ausbildung einer weiteren Amidbindung. Durch diesen Schritt kann ein beliebiges Biomolekül passender Größe mit zugänglicher primärer Amingruppe kovalent auf der Oberfläche eines SiNP gebunden werden.

Die in dieser Arbeit beschriebenen SiNP wurden mit zwei verschiedenen Biomolekülen modifiziert. In einem Fall wurde synthetisches A β ₁₋₄₂ kovalent auf die Partikeloberfläche gebunden. Es ist jedoch bekannt, dass speziell der C-Terminus der A β ₁₋₄₂-Peptide leicht zur Aggregation neigt. Daher sollte überprüft werden, ob die Immobilisierung von A β ₁₋₄₂-Peptiden auf der SiNP-Oberfläche zur Aggregation dieser in Lösung führen könnte und durch sterische Probleme die Detektion der Standards im sFIDA blockiert ist. In einem weiteren Ansatz wurde somit ein kurzkettiges Peptid, genannt 2MAP, auf der SiNP-Oberfläche immobilisiert. 2MAP besteht aus zwei A β ₁₋₁₁-Untereinheiten, die über ein Lysin miteinander verknüpft sind ((A β ₁₋₁₁)-Lys-(A β ₁₋₁₁)-Trp-Trp-Lys) und vermutlich nicht zur Aggregation neigt.

Beide Peptide enthielten das N-terminale Fragment A β ₁₋₁₁, welches von allen in dieser Arbeit verwendeten Antikörpern erkannt wird. Die kovalente Bindung des Biomoleküls mit dem SiNP erfolgte durch die Reaktion eines primären Amins des

A β mit dem generierten NHS-Ester auf der SiNP-Oberfläche. Dieses primäre Amin findet sich entweder am N-Terminus, oder beim A β_{1-42} zusätzlich an den zwei Lysinen an Position 16 und 28 und beim 2MAP-Peptid am endständigen oder den verknüpfenden Lysinen.

Spektroskopische Charakterisierung der Syntheseschritte biofunktionalisierter SiNP

Die Produkte der oben beschriebenen Funktionalisierungsschritte zur Herstellung von biofunktionalisierten SiNP wurden mittels ATR-Infrarotspektroskopie analysiert (Abbildung 4-19). Die Messungen wurden von Dr. Nicole Lühmann (ZEA, Forschungszentrum Jülich) durchgeführt.

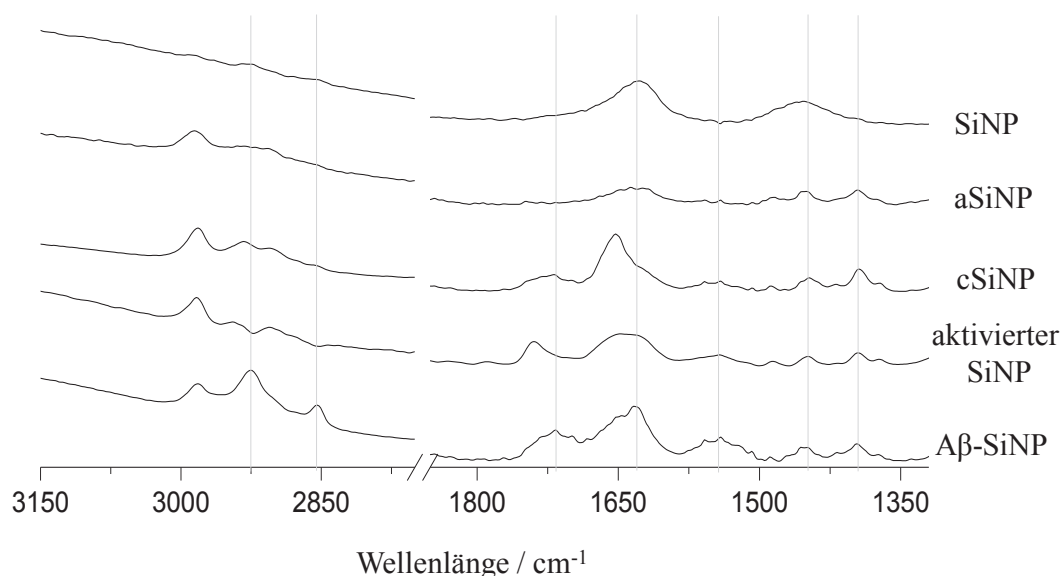


Abbildung 4-19: ATR-Infrarotspektren der verschiedenen SiNP-Funktionalisierungen

Die verschiedenen Funktionalisierungsschritte der SiNP wurden mittels ATR-Infrarotspektroskopie analysiert. Hierzu wurden die SiNP in Ethanol aufgenommen. Ein Tropfen der Lösung wurde auf den Diamant-Kristall aufgetragen und verdampft. Die Spektren wurden durch die Mittelung von 128 scans und bei einer Auflösung von 4 cm⁻¹ erhalten. Der Strahlengang wurde während der Messung mit Argon gespült.

In den dargestellten IR-Spektren zeigte sich der Hydratationsgrad der SiNP in der H-O-H Schwingung bei ca. 1630 cm⁻¹. Die breite Bande bei 1450 cm⁻¹ konnte

Carbonat-Anionen zugeordnet werden, die sich durch die Anlagerung von CO₂ an die Silanol-Oberfläche ausbildeten.

Durch die Funktionalisierung mit APTES kam es zu CH₂-Scher/Deformationsschwingungen bei 1395 and 1445 cm⁻¹ zusammen mit C-H Streckschwingungen zwischen 2900 und 2980 cm⁻¹. Die kovalente Bindung der Bernsteinsäure auf der Partikeloberfläche konnte durch die zusätzlichen Signale bei 1655 cm⁻¹ (Amid I) und 1723 cm⁻¹ (COOH) belegt werden. Nach der Bindung des Biomoleküls auf der Partikeloberfläche zeigte sich eine deutliche Verstärkung des Signals der CH₂-Streckschwingung bei 2925 cm⁻¹ und 2855 cm⁻¹. Die vorher nur schwache Bande bei 1720 cm⁻¹, die für die Carboxygruppen aus den Seitenketten des Proteins stand, stieg bei Anwesenheit des Biomoleküls stark an. Eine neue Bande bei 1542 cm⁻¹ konnte der Amid II-Schwingung von Peptiden zugeordnet werden.

Zusammenfassend ließ sich mit Hilfe der ATR-Infrarotspektroskopie der erfolgreiche Verlauf der einzelnen Funktionalisierungsschritte der SiNP hin zu Aβ-SiNP verfolgen.

Bestimmung des Proteingehalts auf der SiNP-Oberfläche

Zur Bestimmung der Proteingehaltes auf der SiNP-Oberfläche wurde ein BCA-Assay durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine photometrische Methode zur quantitativen Bestimmung von Proteinen. Cu²⁺-Ionen werden in Anwesenheit von Peptidbindungen oder spezifischen Aminosäureseitengruppen unter alkalischen Bedingungen zu Cu⁺-Ionen reduziert, welche im nächsten Schritt mit 2,2-Bichinolin-4,4-dicarbonsäure (Bicinchoninsäure) zu einer Komplexverbindung mit violetter Farbe umgesetzt werden, dessen Absorption bei 562 nm bestimmt werden kann.

Zur quantitativen Bestimmung der Anzahl an Aβ-Peptiden auf der SiNP-Oberfläche wurden die SiNP nach ihrer Kopplung an Aβ mit Hexafluoroisopropanol (HFIP) gereinigt, um nicht gebundenes Peptid zu entfernen und in Wasser gelagert. Nach Umsetzung der Aβ-SiNP mit der Kupfersulfat-Lösung und der Bicinchoninsäure

unter alkalischen Bedingungen wurde die Absorption des entstandenen Komplexes in den Proben bei 562 nm gemessen. Die Konzentration an Peptid in der SiNP-Lösung wurde durch Korrelation mit einer ebenfalls vermessenen BSA-Standardgeraden erhalten.

Abbildung 4-20 zeigt die Berechnung des Molekulargewichts von 24 nm SiNP anhand ihrer durch TEM bestimmten Größe und ihrer aus der Literatur bekannten Dichte (Masalov et al., 2011). Durch eine gravimetrische Bestimmung konnte die Konzentration von A β -SiNP bestimmt werden. Anhand der Ergebnisse des BCA-Assays und des bekannten Molekulargewicht von A β ₁₋₄₂ wurde der Proteingehalt der Lösung festgestellt. Setzt man die Anzahl der SiNP mit der Anzahl an Peptiden ins Verhältnis, erhält man den Beladungsgrad an A β -Peptiden pro SiNP. In dem hier gezeigten Beispiel befanden sich auf einem 24 nm großen SiNP durchschnittlich 44 A β -Peptide.

SiNP

Durchmesser: 24 nm

Dichte: 1,85 g/cm

$$V_{\text{Kugel}} = \frac{4}{3} \pi r^3$$

$$V_{\text{SiNP}} = 7,2 \cdot 10^{-18} \text{ cm}^3$$

$$\text{Gewicht pro SiNP: } 7,2 \cdot 10^{-18} \text{ cm}^3 \times 1,85 \text{ g/cm} = 1,32 \cdot 10^{-17} \text{ g}$$

$$\text{Molekulargewicht: } 1,32 \cdot 10^{-17} \text{ g} \times 6,022 \cdot 10^{23} \frac{1}{\text{mol}} = 8 \cdot 10^6 \text{ g/mol}$$

Konzentration von A β -SiNP:

$$1 \text{ g/l} : 8 \cdot 10^6 \text{ g/mol} = 1,25 \cdot 10^{-7} \text{ mol/l}$$

Proteingehalt:

24,7 g/ml (BCA-Assay)

$$0,0247 \text{ g/l} : 4515 \text{ g/mol} = 5,47 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$$

Verhältnis von SiNP zu Protein:

$$1,25 \cdot 10^{-7} \text{ mol/l} : 5,47 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l} = \underline{\underline{43,6}}$$

Abbildung 4-20: Beispielberechnung der Konzentration und Peptidbeladung von 24 nm A β -SiNP

Der Proteingehalt der A β -SiNP-Lösung wurde mittels BCA-Assay bestimmt. Hierzu wurden die in Wasser gelagerten A β -SiNP laut Herstellervorschrift (Extra Sense BCA Assay Protein Assay Kit, Biovision) mit Kupfersulfat und Bicinchoninsäure versetzt. Die Absorption des erhaltenen Farbstoffkomplexes wurde am UV/VIS-Spektrometer bei 562 nm vermessen. Die molare Konzentration der A β -Peptide wurde mit der der SiNP ins Verhältnis gesetzt und es ergibt sich eine Peptidbeladung von ca. 44 A β -Peptiden pro 24 nm SiNP.

4.3.2.3 Analyse von biofunktionalisierten SiNP im sFIDA

In diesem Teil der Arbeit wurden biofunktionalisierte SiNP als potenzielle Standardmoleküle im sFIDA getestet. Zur Herstellung der Standards wurde die Oberfläche von SiNP durch vier Funktionalisierungsschritte mit A β_{1-42} oder 2MAP-Monomeren beschichtet. Ihre Größe konnte anhand von TEM-Aufnahmen determiniert werden und wurde innerhalb der Versuchsreihe von 80 nm auf 24 nm reduziert, um sich dem Größenbereich von A β -Strukturen zwischen 3 und 20 nm anzupassen, die als A β -Oligomere beschrieben werden (Mastrangelo et al., 2006; Glabe, 2008; Hoshi et al., 2003; Roychaudhuri et al., 2009; Sakono and Zako, 2010). Die erfolgreiche Funktionalisierung der SiNP mit A β -Epitopen verschiedener Art

konnte anhand von ATR-FTIR Spektren festgestellt werden und die Anzahl an Peptiden auf der Oberfläche wurde mit Hilfe eines BCA-Assays bestimmt. In Abbildung 4-21 ist das Detektionsprinzip des sFIDA anhand von biofunktionalisierten SiNP schematisch dargestellt. Das Verfahren basiert auf einer Immundetektion der A β -SiNP durch ihre Anbindung an eine Glasoberfläche mit Hilfe eines monoklonalen Anti-A β -Antikörpers und ihrer Visualisierung mittels zweier Fluoreszenz-markierter monoklonaler Anti-A β -Antikörper. Die resultierende räumliche Überlagerung der beiden Fluoreszenz-Signale bildet die Grundlage des sFIDA readout (nähere Erläuterung: 3.2.6 Datenauswertung mittels sFIDA).

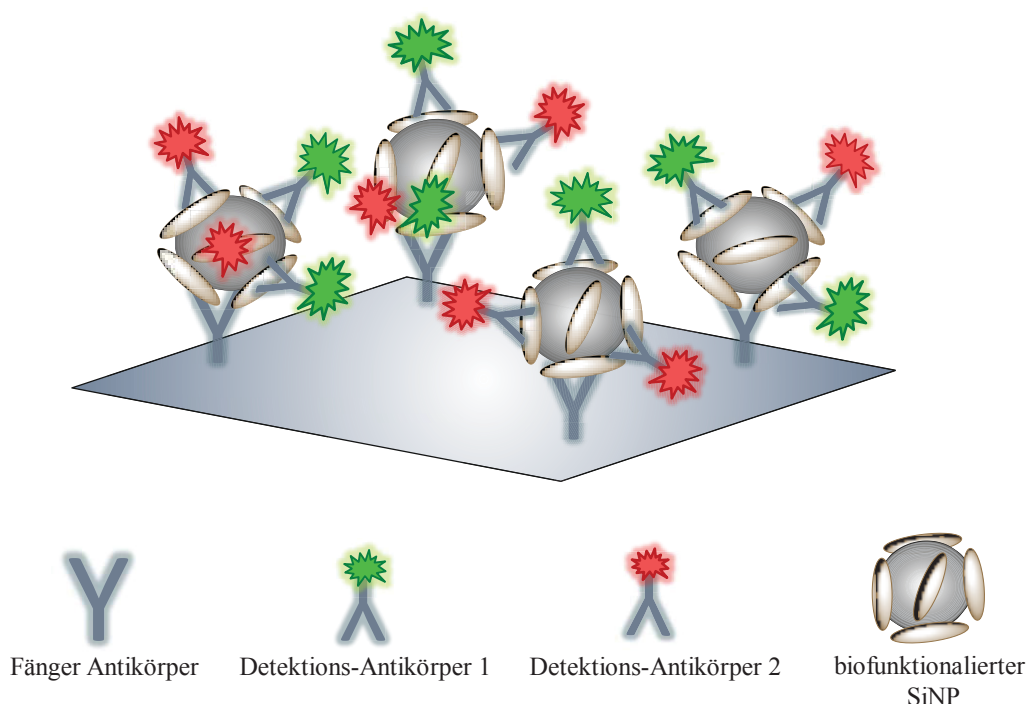


Abbildung 4-21: schematische Darstellung des sFIDA-Prinzips anhand von A β -SiNP

Biofunktionalisierte SiNP werden durch Wechselwirkung ihrer Epitope mit den Fänger-Antikörpern auf der sFIDA-Oberfläche immobilisiert. Ihre Detektion erfolgt durch Zugabe zweier verschieden markierter Detektions-Antikörper. Durch dieses Verfahren können in der Fluoreszenzmikroskopie nur Strukturen in beiden Kanälen detektiert werden, die mindestens drei Epitope zur Verfügung stellen, da alle eingesetzten monoklonalen Antikörper an überlappenden Epitopen am N-Terminus zwischen AS 1-11 binden.

In den folgenden Versuchen galt es zu testen, ob und mit welcher Sensitivität die hergestellten 24 nm großen A β -SiNP und 2MAP-SiNP im sFIDA zu quantifizieren sind. Hierzu wurden 24 nm große A β -SiNP hergestellt und über fünf Größenordnungen in Wasser verdünnt und in dreifacher Bestimmung im sFIDA vermessen. Als Detektions-Antikörper dienten IC16-AlexaFluor633 und 6E10-ATTO488.

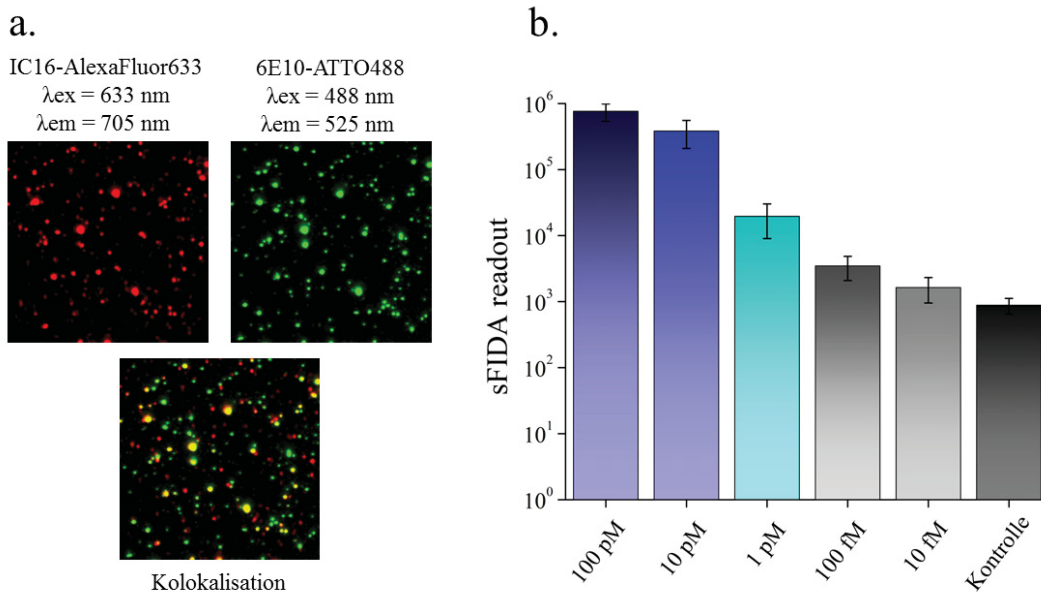


Abbildung 4-22: Detektion von A β -SiNP im sFIDA

A β -SiNP wurden von 100 pM bis 10 fM in Wasser verdünnt in einem, mittels APTES-Protokoll vorbereiteten sFIDA vermessen. Als Detektions-Antikörper dienten IC16-AlexaFluor633 und 6E10-ATTO488. Alle Konzentrationen wurden in dreifacher Bestimmung gemessen. Es wurden pro Kanal in jedem Well 25 Bilder aufgenommen. **a.** Detektion von IC16-AlexaFluor633: exemplarischer Bildausschnitt für Kanal 0. Detektion von 6E10-ATTO488: exemplarischer Bildausschnitt und für Kanal 1. Beispielbild für die Kolokalisation von Kanal 0 und 1. **b.** sFIDA readout der A β -SiNP-Verdünnung in Wasser von 100 pM bis 10 fM, mit Wasser als Kontrolle. Der sFIDA wurde auf einer APTES-Oberfläche durchgeführt. Der dargestellte sFIDA readout basiert auf dem Mittelwert einer dreifachen Bestimmung pro Konzentration mit der zugehörigen Standardabweichung (Schwellenwerte (Kanal 0/Kanal1): 5000/5000).

Anhand der in Abbildung 4-22 a gezeigten Bilddaten konnte eine homogene Verteilung von Signalen mit einem hohen Signal/Rausch-Verhältnis auf einer Artefakt-freien Oberfläche bei der Messung der A β -SiNP im sFIDA beobachtet werden. Es war eine hohe Anzahl an kolokalisierten Ereignissen zu erkennen. Hier

wurden A β -SiNP vermutlich von jeweils einem oder mehreren der beiden Detektions-Antikörper gebunden. Genau diese Ereignisse floßen in den in Abbildung 4-22 b dargestellten sFIDA readout ein, für den sich eine eindeutige Korrelation zu den eingesetzten Konzentrationen an A β -SiNP darstellte.

Analyse von A β -SiNP in verschiedenen Körperflüssigkeiten im sFIDA

Im folgenden Experiment sollte untersucht werden, wie sich die Verdünnung verschiedener Konzentrationen von 24 nm große A β -SiNP in humanem Material auf den sFIDA readout auswirkt. Dazu wurden A β -SiNP seriell in Wasser, humanem Liquor und humanem Plasma verdünnt. Als Kontrollen dienten die jeweiligen Flüssigkeiten ohne zugesetzte A β -SiNP. In Abbildung 4-23 sind die entsprechenden sFIDA readouts der Verdünnungsreihen zusammengefasst.

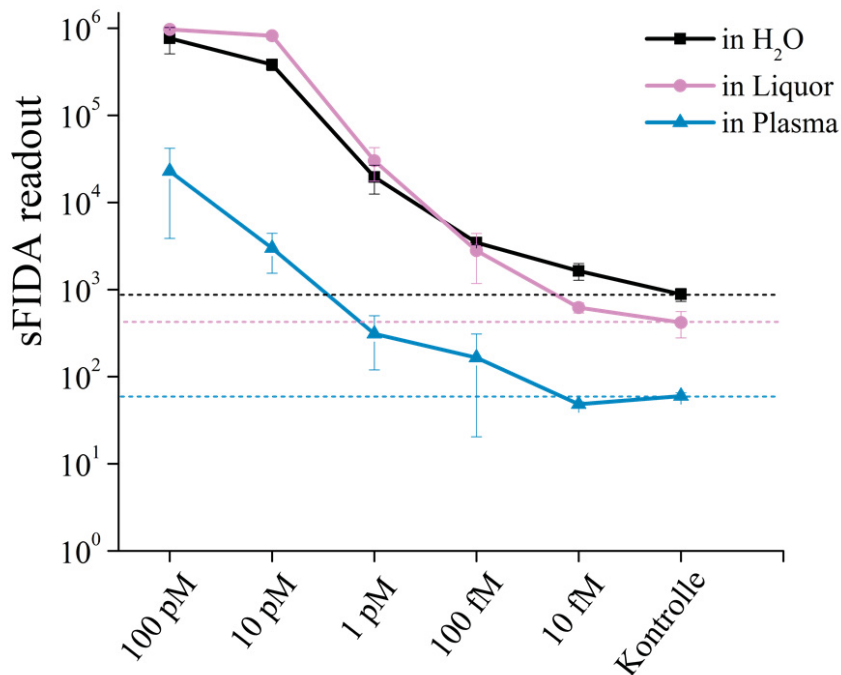


Abbildung 4-23: Analyse von Aβ-SiNP in Wasser, Liquor und Plasma im sFIDA

24 nm große Aβ-SiNP wurden seriell in Wasser (schwarz), Liquor (pink) und Plasma (blau) verdünnt und auf eine mittels APTES-Protokoll vorbereitete sFIDA Platte aufgetragen. Jede Konzentration wurde in dreifacher Bestimmung vermessen. Als Kontrolle diente die jeweilige Flüssigkeit ohne zugesetzte Aβ-SiNP. Dargestellt ist der Mittelwert der dreifachen Bestimmung mit der dazugehörigen Standardabweichung. Als Detektions-Antikörper dienten IC16-AlexaFluor633 und 6E10-ATTO488. Die Schwellenwerte für die Analysen lagen für Kanal 0/Kanal 1 für Wasser bei 4000/3000, für Liquor bei 5000/5000 und für Plasma bei 5000/5000. (Exp: 24 nm Aβ-SiNP: 150207)

Für die Verdünnung der Aβ-SiNP in Wasser und Liquor zeigte sich eine Korrelation des sFIDA readouts zur eingesetzten Konzentration and Aβ-SiNP über fünf Größenordnungen bis zur niedrigsten eingesetzten Konzentration von 10 fM. Für die Verdünnung der Aβ-SiNP in Plasma konnte ein konzentrationsabhängiger Zusammenhang des sFIDA readout mit der Aβ-SiNP-Konzentration bis zu einer Nachweisgrenze von 100 fM festgestellt werden.

Analyse von 2MAP-SiNP in verschiedenen Körperflüssigkeiten im sFIDA

Im nächsten Versuch sollte überprüft werden, welchen Einfluss die Beschichtung der SiNP mit dem kurzkettigen 2MAP-Konstrukt auf ihre Quantifizierung im sFIDA hat. 2MAP besteht, wie bereits oben beschrieben, aus zwei A β_{1-11} -Untereinheiten ((A β_{1-11})-Lys-(A β_{1-11})-Trp-Trp-Lys). A β_{1-42} -Peptide neigen aufgrund ihrer hydrophoben Aminosäuren am C-Terminus zur Aggregation, was eventuell auch zur Aggregation der mit A β_{1-42} funktionalisierten SiNP hätte führen können. Durch die Verwendung der N-terminalen 2MAP-Sequenz sollte eine mögliche Aggregation der SiNP aufgrund von Peptid-Wechselwirkungen verhindert werden, indem nur der Bereich der Epitop-Sequenzen der verwendeten Antikörper auf der SiNP-Oberfläche immobilisiert wurde. 24 nm 2MAP-SiNP wurden in Wasser, Liquor und Plasma verdünnt und im sFIDA analysiert (Abbildung 4-24).

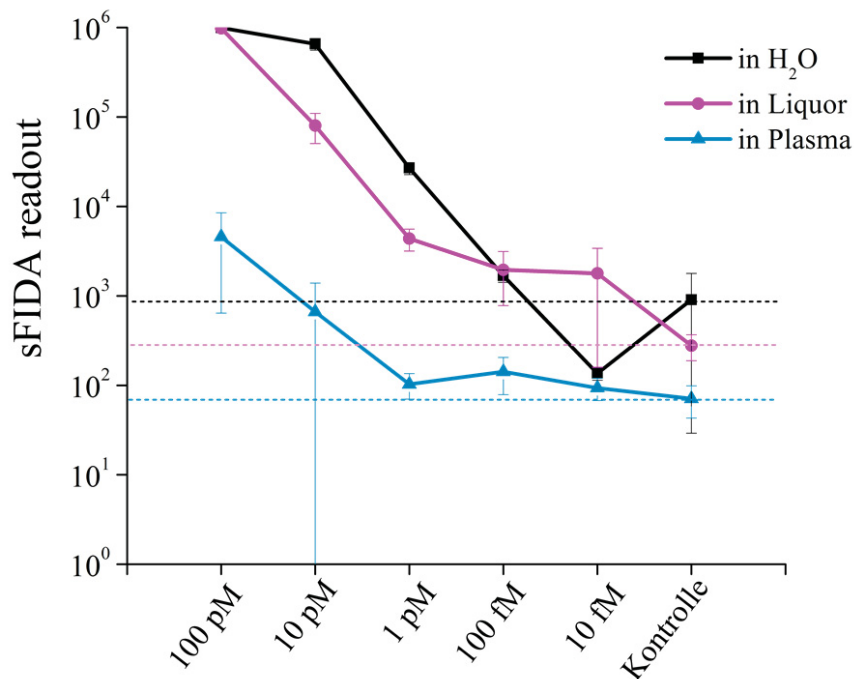


Abbildung 4-24: Analyse von 2MAP-SiNP in Wasser, Liquor und Plasma im sFIDA

24 nm große 2MAP-SiNP wurden seriell in Wasser (schwarz), Liquor (pink) und Plasma (blau) von 100 pM bis 10 fM verdünnt. Der dargestellte sFIDA readout basiert auf dem Mittelwert einer dreifachen Bestimmung pro Konzentration mit der zugehörigen Standardabweichung. Als Detektions-Antikörper dienen: 6E10-ATTO488 und IC16-AlexaFluor633. Der sFIDA wurde auf einer APTES-Oberfläche durchgeführt. Die Schwellenwerte für Kanal 0/Kanal 1 lagen in Wasser, Liquor, Plasma bei 5000/5000 (Exp: 24 nm 2MAP-SiNP: 150122-25).

Für die Verdünnung von 2MAP-SiNP in Wasser zeigte sich ein konzentrationsabhängiger sFIDA readout bis zu einer Nachweisgrenze von 100 fM, bedingt durch den auffällig niedrigen sFIDA readout für die Konzentration von 10 fM im Verhältnis zur Wasser-Kontrolle. Für die Verdünnung der 2MAP-SiNP in Liquor konnte ein konzentrationsabhängiger sFIDA readout mit einer Unterscheidung der niedrigsten Konzentration von 10 fM von der Liquor-Kontrolle gemessen werden. Die Konzentrationsreihe der 2MAP-SiNP in Plasma zeigte eine Korrelation zum sFIDA readout bis zu einer Nachweisgrenze von ca. 10 pM.

4.3.3 Diskussion

Das sFIDA-Verfahren ermöglicht die spezifische Quantifizierung von A β -Oligomeren in Körperflüssigkeiten wie Liquor oder Plasma. Zur Kalibrierung, Optimierung und zur Ermittlung der Inter-/Intra-Variabilität des Assays ist ein Standard von enormer Wichtigkeit.

Die in dieser Arbeit analysierten, kommerziell erhältlichen CB-Oligomere ließen sich im sFIDA bis zu einer Konzentration von 2,4 fM in Liquor und 100 fM in PBS-Puffer quantifizieren. Die Anwesenheit von Biomolekülen im Liquor scheint einen positiven Effekt auf die Sensitivität des Assays zu haben.

Die o. g. Nachweisgrenze von CB-Oligomeren in Liquor entspricht einer Peptid-Konzentration von 2,16 pg/ml und ist somit ähnlich zu den Nachweisgrenzen, die für andere Oligomer-spezifische Assays beschrieben werden (2,2 pg/ml: Bruggink et al., 2013) oder liegt um eine Größenordnung darüber (0,2 pg/ml: Hölttä et al., 2013 und 0,09 pg/ml: Savage et al., 2014).

Der Einfluss von Tau-Gefrier-Zyklen auf die Quantifizierung von in Liquor 'gespikten' CB-Oligomeren zeigte tendenziell eine Abnahme des sFIDA readout innerhalb der drei getesteten Konzentrationen mit der Anzahl an Gefrierzyklen. Die Beobachtung, dass bei zunehmender Anzahl an Tau-Gefrier-Zyklen weniger Oligomer-Einheiten detektiert werden konnten, könnte durch eine Tau-Gefrier-Zyklen induzierte Aggregation der CB-Oligomere erklärbar sein, wodurch diese möglicherweise nicht mehr quantitativ nachgewiesen werden konnten.

Das Ergebnis sollte nicht direkt auf klinische Proben übertragen werden, da es sich bei CB-Oligomeren um stabilisierte Strukturen handelt, die durch die Tau-Gefrier-Zyklen vermutlich in anderer Form beeinflusst wurden, als es für biologische Proben der Fall gewesen wäre. Hier könnte es einerseits zur Zersetzung oder Konformationsänderung der nativen A β -Oligomere kommen (Schoonenboom et al., 2004) und andererseits könnte die Aggregation von monomerem A β induziert

werden, was zu falsch-positiven Signalen im sFIDA führen würde. Diese möglichen Prozesse müssen anhand entsprechender sFIDA-Experimente überprüft werden.

Der in dieser Arbeit entwickelte Standard, genannt A β -SiNP, wurde so entworfen, dass er verschiedene Eigenschaften eines Oligomers abbildet. Die Größe des SiNP-Kerns liegt mit 24 nm nahe des Größenbereichs nativer Oligomere zwischen 3 und 20 nm (Glabbe, 2008; Mastrangelo et al., 2006; Sakono and Zako, 2010) und er exponiert auf seiner Oberfläche eine bekannte Anzahl an Peptidstrukturen, die durch monoklonale Anti-A β -Antikörper erkannt werden können. Die erfolgreiche Synthese und Funktionalisierung der SiNP wurde anhand von mikroskopischen, spektroskopischen und biochemischen Analysen bestätigt.

Zur weiteren Charakterisierung und Qualitätskontrolle der biofunktionalisierten SiNP können zukünftig verschiedene Methoden angewendet werden. Beispielsweise könnte ihr hydrodynamischer Radius durch dynamische Lichtstreuung (DLS) ermittelt werden. Die genaue SiNP-Konzentration in Lösung könnte mittels Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) oder Durchflusszytometrie bestimmt werden. Die räumliche Verteilung der A β -Peptide auf der SiNP-Oberfläche würde möglicherweise mit Hilfe von FRET-Experimenten näher analysiert werden können. Die Anzahl von zugänglichen Epitopen auf der A β -SiNP-Oberfläche könnte durch Bindung eines Gold-markierten Anti-A β Antikörpers und anschließender Visualisierung der Goldpartikel auf dem A β -SiNP im Transmissionselektronenmikroskop oder über eine Quantifizierung der gebundenen Anti-A β Antikörper mittels einer Biolayer-Interferometrie (BLI) Messung erfolgen. Hier könnte nach Anbindung der A β -SiNP auf der Sensoroberfläche und Zugabe der Anti-A β -Antikörper die Veränderung der Schichtdicke anhand des Interferenzmusters bestimmt werden, wodurch die Menge der an die A β -SiNP gebundenen Detektions-Antikörper auf dem Sensor quantifizierbar wäre.

Die Analyse der 24 nm großen A β -SiNP im sFIDA wurden anhand von Konzentrationsreihen von 100 pM bis 10 fM in Wasser, Liquor und Plasma durchgeführt und zeigte eine Korrelation zwischen den eingesetzten Konzentrationen und dem sFIDA readout über bis zu fünf Größenordnungen mit Nachweisgrenzen von bis zu 10 fM in Liquor und Wasser. Bei einer Anzahl von durchschnittlich 44 Peptiden pro Partikel kommt dies einer A β -Peptidkonzentration von 1,98 pg/ml gleich. Der in Oligomer-spezifischen ELISA-Verfahren detektierte, physiologische Gehalt an A β -Oligomeren in Liquor von AD-Patienten und gesunden Probanden variiert stark in einem Peptidkonzentrationsbereich von 10 pg/ml bis 0,1 pg/ml (Savage et al., 2014) und zeigt, dass A β -SiNP sich mit ihrer Nachweisgrenze von 1,98 pg/ml im sFIDA als Standard in der Quantifizierung von A β -Oligomeren in Liquor eignen. Diese Nachweisgrenze der A β -SiNP im sFIDA ist wie die von CB-Oligomeren im sFIDA ähnlich zu den oben erwähnten Nachweisgrenzen anderer Oligomer-spezifischer Assays.

Für die Verdünnung der A β -SiNP in Plasma im Vergleich zu Liquor wurde eine erhöhte Nachweisgrenze von 100 fM festgestellt. In der Literatur wird beschrieben, dass Lipoproteine, wie zum Beispiel ApoE und Albumine, die in hohen Konzentrationen in Plasma auftreten, A β -Bindestellen maskieren können (Biere et al., 1997). Diese Plasmakomponenten könnten einen maskierenden Effekt auf die A β -Epitope der Standards ausgeübt haben, wodurch es möglicherweise zu der leicht abgeschwächten Sensitivität der Detektion von A β -SiNP im sFIDA kommen konnte.

Die Nachweisgrenze von 100 fM A β -SiNP in Plasma entspricht einer Peptidkonzentration von ca. 19,8 pg/ml. Diese Konzentration liegt nur etwa eine Größenordnung niedriger als die beschriebene Konzentration von Gesamt-A β in Plasma (Toledo et al., 2013), welches sowohl in einer monomeren, als auch in einer aggregierten Form vorliegen kann. Das Verhältnis von Monomer- versus Oligomerkonzentration in Liquor liegt bei etwa drei Größenordnungen (Yang et al., 2015). Überträgt man dieses Verhältnis auf Plasma, so müsste die Sensitivität der

Analyse von A β -SiNP in Plasma gesteigert werden, um A β -SiNP als Standard in der Quantifizierung nativer A β -Oligomere einzusetzen.

Wie bereits beschrieben neigt besonders die Isoform A β_{1-42} zur Aggregation. Zur Überprüfung, ob durch die Beschichtung der SiNP mit A β_{1-42} eine Aggregation der Partikel induziert werden könnte, wurden zum Vergleich kurzkettige Peptide (sog. 2MAP), welche nur den weniger stark aggregierenden N-Terminus (1-11) enthalten, auf die SiNP-Oberfläche aufgebracht. Anhand der gezeigten sFIDA-Analysen mit 2MAP- und A β -SiNP konnten jedoch ähnliche Nachweisgrenzen der beiden SiNP-Varianten in Wasser, Liquor und Plasma anhand ihrer sFIDA readout bestätigt werden, was darauf hindeutet, dass es durch die Verwendung von A β_{1-42} auf der SiNP-Oberfläche zu keiner Aggregation der SiNP oder sterischen Abschirmung der Epitope gekommen ist. Sowohl A β -SiNP, als auch 2MAP-SiNP konnten bis in den unteren femtomolaren Bereich konzentrationsabhängig im sFIDA quantifiziert werden.

Für lösliche A β -Oligomere werden sowohl Strukturen mit niedrigem Molekulargewicht, bestehend aus 2 bis 8 Monomeren, als auch Strukturen mit hohem Molekulargewicht aus 20 bis 40 Monomeren beschrieben. Durch eine Näherung mit Hilfe der linearen Dichte (MPL, Masse pro Längeneinheit) von 9 kDa/nm für A β -Strukturen (Mastrangelo et al., 2006) kann gezeigt werden, dass demnach A β -Oligomere aus 40 A β -Monomeren ca. 20 nm groß wären. Die hergestellten 24 nm großen A β -SiNP liegen somit im Größenbereich nativer Oligomere.

Die meisten der entwickelten Biomarker-basierten Diagnoseverfahren funktionieren nach dem Prinzip der Immunodetektion, von denen die ELISA-Technik die am häufigsten eingesetzte Methode zur Quantifizierung von A β -Peptiden in Körperflüssigkeiten darstellt (Klaver et al., 2011). Zur Bestimmung der Nachweisgrenzen von A β -Oligomeren werden Oligomere oder ADDLs aus synthetischen A β_{1-42} -Peptiden hergestellt (Bruggink et al., 2013; Klaver et al., 2010). Die Präparationsverfahren für Oligomere aus synthetischem A β resultieren in einem

Gemisch verschieden großer A β -Oligomer-Spezies von geringer Stabilität, da der Aggregationsprozess weiter voranschreiten kann. (siehe *1.3.4 Standardisierung von Detektionsmethoden*). Die Immundetektion der A β -Oligomere hängt jedoch stark von ihrer Größe ab, wobei die publizierten Nachweisgrenzen der o. g. ELISA-Techniken in Massenkonzentrationen angegeben werden. Diese Ensemble-Messungen erlauben daher, im Gegensatz zum sFIDA-Verfahren keine Aussagen über die Größe und Anzahl einzelner detektierter A β -Oligomere.

Auch durch die kovalente Verknüpfung der Oligomere mit Hilfe der PICUP-Methode (Photo-induced cross-linking of unmodified proteins) (Lambert et al., 1998) bleibt zwar die Größe stabil, aber die Anzahl von zugänglichen Bindestellen der A β -Oligomere ist unbekannt. A β -SiNP stellen eine definiertere und stabilere Alternative dar, die dazu genutzt werden kann, die Sensitivität verschiedener Detektionsmethoden zu validieren und den Standardisierungsprozess von Detektionsmethoden zwischen verschiedenen Operatoren, Laboren und klinischen Studien zu unterstützen.

A β -SiNP können in einer Vielzahl an Oligomer-spezifischen Diagnoseverfahren der AD als Standard zum Einzelpartikelnachweis vor hohem A β -Monomerhintergrund eingesetzt werden. Wie bereits erwähnt, ist das Sandwich ELISA-Prinzip die am häufigsten verwendete Plattform zur Detektion von A β -Oligomeren in Körperflüssigkeiten, in welcher A β -SiNP einen geeigneten Standard darstellen können. Lediglich in ELISA-Verfahren, in denen Oligomer-spezifische Anti-A β -Antikörper zum Einsatz kommen (Savage et al., 2014), müsste das Design der A β -SiNP dahingehend verändert werden, dass anstelle von linearen A β -Peptiden, strukturelle oligomer-spezifische Epitope an den Partikel gebunden werden.

Im Folgenden werden zwei weitere Oligomer-spezifische Detektionsverfahren vorgestellt, die ebenfalls eine Anwendung der A β -SiNP als Standard potenziell ermöglichen.

In der AlphaLISA-Methode kommt es zur Bindung zweier, an unterschiedliche Partikel gekoppelter, Anti-A β -Antikörper an ein Oligomer in räumlicher Nähe zueinander. Nach Anregung des einen Partikel wird eine chemische Reaktion im anderen induziert, welche in der Emission von Licht bei 615 nm resultiert und als Oligomer-spezifisches Signal gewertet wird (Beaudet et al., 2008). Die nahe Bindung der beiden Sonden könnte auch auf der A β -SiNP Oberfläche gewährleistet sein. Auch in der, von Santos et al. (2007) beschriebenen Methode zur A β -Oligomer-spezifischen Detektion mittels Durchflusszytometrie und FRET könnten die beiden eingesetzten Sonden auf der A β -SiNP-Oberfläche in räumlicher Nähe gebunden werden und somit die A β -SiNP in diesem Assay als Standard eingesetzt werden.

Die genaue Größenbestimmung von A β -Oligomeren in Patientenproben könnte in Zukunft klären, ob gewisse Größen von A β -Oligomeren in Liquor oder anderen Körperflüssigkeiten vermehrt auftreten, oder ob sie mit der Art der Demenz oder dem Krankheitsfortschritt korrelieren. Mit Standard-Mikroskopieverfahren ist es bislang nicht möglich die Größe von nativen A β -Oligomeren in Körperflüssigkeiten zu bestimmen, da sie unterhalb der optischen Auflösungsgrenze liegt. Hier könnte möglicherweise eine Größenbestimmung über die Fluoreszenzintensität mit Hilfe von A β -SiNP Aufschluss geben. Bei Verwendung von stöchiometrisch-markierten Fluoreszenz-Sonden zur Detektion der A β -SiNP, könnte anhand der Fluoreszenzintensität und über die bekannte Anzahl an Epitopen, auf die Anzahl gebundener Sonden geschlossen werden. Durch den Vergleich mit den Fluoreszenzintensitäten der detektierten Signale in der Patientenprobe wäre es so möglich, die Anzahl gebundener Sonden an diese zu bestimmen und ins Verhältnis zu ihrer Größe zu setzen.

Die hier beschriebene Studie galt der Entwicklung eines Standards in der A β -Oligomer-basierten Diagnose der AD. Oligomer-Spezies können auch durch Ko-Aggregation von A β mit anderen Proteinen, wie beispielsweise tau oder α -Synuclein entstehen (Clinton et al., 2010; Guo et al., 2006). Auch für die Analyse solcher Ko-Aggregate könnten biofunktionalisierte SiNP geeignete Standardmodelle darstellen, da ihre Oberfläche flexibel mit verschiedenen Peptiden funktionalisiert werden kann.

Oligomere Strukturen stellen auch in der Diagnose vieler weiterer Proteinfehlfaltungserkrankungen vielversprechende Biomarker dar. So kommt es bei der Parkinson-Krankheit zur Aggregation von α -Synuclein oder beim Typ II Diabetes zur Bildung von IAPP-Oligomeren (Insel Amyloid Polypeptid; Brender et al., 2011). Durch die beschriebenen Aktivierungsschritte der SiNP kann im finalen Schritt ein beliebiges Peptid (z. B. α -Synuclein oder IAPP) mit einer primären Aminogruppe kovalent auf der Partikeloberfläche gebunden werden. Das in dieser Arbeit etablierte Verfahren zur Synthese von biofunktionalisierten SiNP bietet somit auch die Möglichkeit, Standards in der Aggregat-basierten Diagnose von Parkinson oder Diabetes Typ II bereitzustellen.

5 Anhang

5.1 Abkürzungsverzeichnis

APMES	(3-Aminopropyl)dimethylethoxysilan
APTES	(3-Aminopropyl)triethoxysilan
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
ADDL	Abeta derived diffusible ligand
AD	Alzheimersche Demenz
aSiNP	aminiertes Silica-Nanopartikel
AS	Aminosäure
AICD	Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain
APP	Amyloid-Precursor Protein
A β	Amyloid- β
ATR	attenuated total reflection
BSA	Bovines Serum Albumin
cSiNP	carboxylierter Silica-Nanopartikel
CMD	Carboxymethyldextran
CB	Crossbeta
Da	Dalton
DEA	Diethanolamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	<i>enzyme-linked Immunosorbent assay</i> (Immunoassay)
fM	femtomolar <i>fluorescence intensity distribution analysis</i> (Analyse der Verteilung von
FIDA	Fluoreszenzintensitäten)
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
FTIR	Fourier-transformierte Infrarotspektroskopie
HFIP	Hexafluoroisopropanol
IR	Infrarotspektroskopie

LSM	Laser scanning Mikroskop
MRT	Magnetresonanztomographie
MAP	multi-Antigen Peptid
nm	Nanometer
nM	nanomolar
NaOH	Natriumhydroxid
NTP	Neural Thread Protein
NHS	N-Hydroxysuccinimid
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
p-tau	phosphoriliertes tau-Protein
pM	picomolar
PEG	Ployethylenglykol
PEO	Polyethylenoxid
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
pE A β	pyroglutamat A β (A β , das an der dritten Aminosäure mit einem Pyroglutamat startet)
SiNP	Silica-Nanopartikel
sFIDA	surface-based Fluorescence-Intensity Distribution-Analysis
TIRF	total internal fluorescence
t-tau	total tau-Protein
tg	transgen
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEA	Triethylamin
XPS	<i>X-ray photoelectron spectroscopy</i> (Röntgenphotoelektronenspektroskopie)

Abbildungsverzeichnis

1-1: Nicht-amyloidogene und amyloidogene Prozessierung des APP	5
1-2: Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese	8
1-3: sFIDA Oberfläche.....	20
1-4: Reaktionsmechanismus von APTES auf Glasoberfläche.....	24
1-5: Basenkatalysierte Hydroxylierung von APTES	26
1-6: Schematische Darstellung der Bindung von APTES und Ethanolamin auf Glas	27
1-7: Schematische Darstellung des Stöber-Prozesses	30
3-1: ZAT-Platte	43
3-2: Histogramm von A β -SiNP in Wasser für Kanal 0	55
4-1: Analyse von Liquor-Proben von transgenen und Wildtyp-Mäusen im sFIDA.....	64
4-2: Analyse von Liquor-Proben von transgenen oder Wildtyp-Mäusen im sFIDA.....	66
4-3: Analyse von Körperflüssigkeiten von transgenen und Wildtyp-Mäusen im sFIDA.....	68
4-4: Autofluoreszenzkontrolle von Hirnhomogenaten im sFIDA	69
4-5: Analyse von Hirnhomogenat-Verdünnungen von transgenen und Wildtyp-Mäusen im sFIDA .	71
4-6: Analyse von Hirnhomogenaten von transgenen Mäusen in PBS und TBA 2.1-Mäusen in TRIS- Puffer im sFIDA.....	73
4-7: Beispielbilder der Oberflächen der PBS- und TRIS-Kontrolle im sFIDA.....	74
4-8: Aminierung der Glasoberfläche im sFIDA	79
4-9: Analyse aminierter Glasoberflächen mittels Kontaktwinkelmessungen und XPS und XPS81	
4-10: Analyse verschiedener APTES-Funktionalisierungen und CMD Beschichtungen von Glasoberflächen mittels Kontaktwinkelmessungen und XPS	85
4-11: Analyse verschiedener Konzentrationen von CB-Oligomeren in PBS auf verschiedenen Glasfunktionalisierungen im sFIDA.....	89
4-12: Analyse von A β -SiNP in Wasser, Liquor und Plasma auf Ethanolamin-Oberfläche im sFIDA.....	91
4-13: Analyse von A β -SiNP in Wasser, Liquor und Plasma auf APTES-Oberfläche im sFIDA.....	92
4-14: Analyse von CB-Oligomeren in PBS im sFIDA.....	98
4-15: Analyse von CB-Oligomeren in Liquor im sFIDA.....	99
4-16: Tau-Gefrier Zyklen von CB-Oligomeren verdünnt in Liquor im sFIDA.....	101
4-17: TEM-Aufnahmen von 80 nm und 24 nm großen SiNP	102
4-18: Synthese-Strategie von biofunktionalisierten SiNP	103
4-19: ATR-Infrarotspektren der verschiedenen SiNP-Funktionalisierungen	105
4-20: Beispielberechnung der Konzentration und Peptidbeladung von 24 nm A β - SiNP.....	108
4-21: schematische Darstellung des sFIDA-Prinzips anhand von A β -SiNP	109

4-22: Detektion von A β -SiNP im sFIDA	110
4-2 : Analyse von A β -SiNP in Wasser, Liquor und Plasma im sFIDA.....	112
4-24: Analyse von 2MAP-SiNP in Wasser, Liquor und Plasma im sFIDA	114

5.2 Tabellenverzeichnis

3-1: verwendete Verbrauchsmaterialien.....	39
3-2: verwendete Chemikalien und Puffer.....	40
3-3: verwendete Peptide und Antikörper	41
3-4: verwendete Geräte	41
3-5: verwendete Software	43
4-1: Kohlenstoff:Stickstoff-Verhältnisse aus den erhaltenen XPS-Ergebnissen für die Oberflächenfunktionalisierungen mit Ethanolamin, APMES und APTES	86

6 Literaturverzeichnis

Adlard, P., Tran, B., Finkelstein, D., Desmond, P., Johnston, L., Bush, A., and Egan, G. (2014). A review of β -amyloid neuroimaging in Alzheimer's disease. *Front. Neurosci.*, 8, article 327

Alexandru, A., Jagla, W., Graubner, S., Becker, A., Bäuscher, C., Kohlmann, S., Sedlmeier, R., Raber, K., Cynis, H., Röncke, R., et al. (2011). Selective Hippocampal Neurodegeneration in Transgenic Mice Expressing Small Amounts of Truncated A β Is Induced by Pyroglutamate-A β Formation. *Journal of Neuroscience* 31, 12790–12801.

Alzheimers Association (2014). 2014 Alzheimer's disease facts and figures. *Genes and Alzheimer's Disease Fact Sheet*, 1-3.

Alzheimer's Disease International ADI (2014) Alzheimer World Report 2014. *Alzheimer's Disease International*.

Bakalova, R., Zhelev, Z., Aoki, I., Ohba, H., and Imai, Y (2006). Silica-shelled single quantum dot micelles as imaging probes with dual or multimodality. *Anal. Chem.*, 78, 5925–5932.

Ballard, C., Gauthier, S., Corbett, A., Brayne, C., Aarsland, D., and Jones, E. (2011). Alzheimer's disease. *The Lancet* 377, 1019–1031.

Barattin, R., and Voyer, N. (2011). Chemical modifications of atomic force microscopy tips. *Methods Mol. Biol.* 736, 457–483.

Barbé, C., Bartlett, J., Kong, L., Finnie, K., Lin, H.Q., Larkin, M., Calleja, S., Bush, A., and Calleja, G. (2004). Silica Particles: A Novel Drug-Delivery System. *Adv. Mater.* 16, 1959–1966.

Barghorn, S., Nimmrich, V., Striebing, A., Krantz, C., Keller, P., Janson, B., Bahr, M., Schmidt, M., Bitner, R., Harlan, J., et al. (2005). Globular amyloid beta-peptide1-42 oligomer - a homogenous and stable neuropathological protein in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry* 95, 834–847.

Bayer, TA, and Wirths, O. (2008). Review on the APP/PS1KI mouse model: intraneuronal A β accumulation triggers axonopathy, neuron loss and working memory impairment. *Genes, Brain and Behavior*, 7, 6-11.

Beaudet, L., Rodriguez-Suarez, R., Venne, M.-H., Caron, M., Bédard, J., Brechler, V., Parent, S., and Bielefeld-Sévigny, M. (2008). AlphaLISA immunoassays: the no-wash alternative to ELISAs for research and drug discovery. *Nature Methods* 5

Bennett, D.A., Schneider, J.A., Wilson, R.S., Bienias, J.L., and Arnold, S.E. (2004). Neurofibrillary tangles mediate the association of amyloid load with clinical Alzheimer disease and level of cognitive function. *Archives of Neurology* 61, 378–384.

Bekris LM, Yu C-EE, Bird TD & Tsuang DW (2010) Genetics of Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 23, 213–27.

Bertram, L., McQueen, M., Mullin, K., Blacker, D., and Tanzi, R. (2007). Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nat. Genet.* 39, 17–23.

Biere, A.L., Ostaszewski, B., Stimson, E.R., Hyman, B.T., Maggio, J.E., and Selkoe, D.J. (1997). Amyloid beta-peptide is transported on lipoproteins and albumin in human plasma. *The Journal of Biological Chemistry* 271, 32916–32922.

Birkmann, E., Schäfer, O., Weinmann, N., Dumpitak, C., Beekes, M., Jackman, R., Thorne, L., and Riesner, D. (2006). Detection of prion particles in samples of BSE and scrapie by fluorescence correlation spectroscopy without proteinase K digestion. *Biol. Chem.* 387, 95–102.

Birkmann, E., Henke, F., Weinmann, N., Dumpitak, C., Groschup, M., Funke, A., Willbold, D., and Riesner, D. (2007). Counting of single prion particles bound to a capture-antibody surface (surface-FIDA). *Vet. Microbiol.* 123, 294–304.

Bitar, A., Ahmad, N., Fessi, H., and Elaissari, A. (2012). Silica-based nanoparticles for biomedical applications. *Drug Discovery Today* 17, 11471154.

Blennow, K. (2004). Cerebrospinal fluid protein biomarkers for Alzheimer's disease. *NeuroRx* 1, 213–225.

Blennow, K., Hampel, H., Weiner, M., and Zetterberg, H. (2010). Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 6, 131–144.

Blennow, K., Mattsson, N., Schöll, M., Hansson, O., and Zetterberg, H. (2015). Amyloid biomarkers in Alzheimer's disease. *Trends in Pharmacological Sciences.* 1-13.

Bombois, S. a new decision tree combining Abeta 1-42 and p-tau levels in Alzheimers Diagnosis. *10*, 357-364.

Borchelt, D.R., Thinakaran, G., Eckman, C.B., Lee, M.K., Davenport, F., Ratovitsky, T., Prada, C.-M., Kim, G., Seekins, S., and Yager, D. (1996). Familial Alzheimer's disease-linked Presenilin 1 variants elevate A 1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* 17, 1005–1013.

Brender, J., Salamekh, S., and Ramamoorthy, A. (2011). Membrane disruption and early events in the aggregation of the diabetes related peptide IAPP from a molecular perspective. *Acc. Chem. Res.* 45, 454–462.

Bruggink, K.A., Jongbloed, W., Biemans, E.A., Veerhuis, R., Claassen, J.A., Kuiperij, H.B., and Verbeek, M.M. (2013). Amyloid- β oligomer detection by ELISA in cerebrospinal fluid and brain tissue. *Analytical Biochemistry* 433, 112–120.

Clinton, L.K., Blurton-Jones, M., Myczek, K., Trojanowski, J.Q., and LaFerla, F.M. (2010). Synergistic Interactions between Abeta, tau, and alpha-synuclein: acceleration of neuropathology and cognitive decline. *J. Neurosci.* 30, 7281–7289.

Cummings, J. (2011). Biomarkers in Alzheimer's disease drug development. *Alzheimers Dement* 7, e13–44.

- Deisenhammer, F., Bartos, A., Egg, R., Gilhus, N.E., Giovannoni, G., Rauer, S., Sellebjerg, F., and Tumani, H. (2010). Routine cerebrospinal fluid (CSF) analysis. European handbook of neurological management, 2nd edition, Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 5-17.
- Donaldson, K., Stone, V., Tran, C.L., Kreyling, W., and Borm, P.J. (2004). Nanotoxicology. *Occup Environ Med* 61, 727–728.
- Ebner, A., Hinterdorfer, P., and Gruber, H. (2007). Comparison of different aminofunctionalization strategies for attachment of single antibodies to AFM cantilevers. *Ultramicroscopy* 107.
- Fagan, A., Mintun, M., Mach, R., Lee, S., Dence, C., Shah, A., LaRossa, G., Spinner, M., Klunk, W., Mathis, C., et al. (2006). Inverse relation between in vivo amyloid imaging load and cerebrospinal fluid A β 42 in humans. *Ann Neurol*. 59, 512–519.
- Ferri, CP, Prince, M, Brayne, C, Brodaty, H, and Fratiglioni, L (2006). Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *The Lancet*. 366, 2112-2117.
- Finder, V.H., and Glockshuber, R. (2007). Amyloid- β Aggregation. *Neurodegener Dis* 4, 13–27.
- Freir, D.B., Nicoll, A.J., Klyubin, I., Panico, S., Mc Donald, J.M., Risse, E., Asante, E.A., Farrow, M.A., Sessions, R.B., Saibil, H.R., et al. (2011). Interaction between prion protein and toxic amyloid β assemblies can be therapeutically targeted at multiple sites. *Nat Commun* 2, 336.
- 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. *Nat Rev Neurol* 6, 67–77.
- Fukumoto, H, Tokuda, T, Kasai, T, Ishigami, N, and Hidaka, H (2010). High-molecular-weight β -amyloid oligomers are elevated in cerebrospinal fluid of Alzheimer patients. *The FASEB Journal*. 24, 2716-2726.
- Funke, S.A., Birkmann, E., Henke, F., Görtz, P., Lange-Asschenfeldt, C., Riesner, D., and Willbold, D. (2007). Single particle detection of A β aggregates associated with Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 364, 902–907.
- Funke, S.A., Wang, L., Birkmann, E., and Willbold, D. (2010). Single-particle detection system for A β aggregates: adaptation of surface-fluorescence intensity distribution analysis to laser scanning microscopy. *Rejuvenation Res* 13, 206–209.
- Georganopoulou, D.G., Chang, L., Nam, J.-M.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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 2273–2276.
- Ghiso, J, Calero, M, Matsubara, E, Governale, S, and Chuba, J (1997). Alzheimer's soluble amyloid β is a normal component of human urine. *FEBS Letters*. 408, 105-108.
- Goodman, IJ (2008). Practical utility of urinary assay in the diagnosis of Alzheimer's disease: AlzheimerAlertTM. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 8, 21-28.

- Guo, J.-P.P., Arai, T., Miklossy, J., and McGeer, P.L. (2006). Abeta and tau form soluble complexes that may promote self aggregation of both into the insoluble forms observed in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *103*, 1953–1958
- Haass, C., Lemere, C.A., Capell, A., Citron, M., Seubert, P., Schenk, D., Lannfelt, L., and Selkoe, D.J. (1995). The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by γ -secretase cleavage within the secretory pathway. *Nature Medicine* *1*, 1291–1296.
- Hampel, H, Buerger, K, and Zinkowski, R (2004). Measurement of Phosphorylated Tau Epitopes in the Differential Diagnosis of Alzheimer Disease: A Comparative Cerebrospinal Fluid Study. *Arch Gen Psychiatry*, *61*, 95-102.
- Hancock, G. (1995). Diagnostics of active species in plasmas. *Surface and Coatings Technology* *74-75*, 1014.
- Harder, P., Grunze*, M., Dahint, R., Whitesides, G., and Laibinis, P. (1998). Molecular Conformation in Oligo(ethylene glycol)-Terminated Self-Assembled Monolayers on Gold and Silver Surfaces Determines Their Ability To Resist Protein Adsorption. *J. Phys. Chem. B* *102*, 426–436.
- Hardy, J., and Selkoe, D.J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* *297*, 353–356.
- Henriksen, K., O'Bryant, S., Hampel, H., Trojanowski, J., Montine, T., Jeromin, A., Blennow, K., Lönneborg, A., Wyss-Coray, T., Soares, H., et al. (2013). The future of blood-based biomarkers for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* *10*, 115–131.
- Herskovits, A., Locascio, J., Peskind, E., Li, G., and Hyman, B. (2013). A Luminex Assay Detects Amyloid β Oligomers in Alzheimer's Disease Cerebrospinal Fluid. *PLoS ONE* *8*.
- Hilliard, LR, Zhao, X, and Tan, W (2002). Immobilization of oligonucleotides onto silica nanoparticles for DNA hybridization studies. *Analytica Chimica Acta.* *470*, 52-56.
- Hoshi, M., Sato, M., Matsumoto, S., Noguchi, A., Yasutake, K., Yoshida, N., and Sato, K. (2003). Spherical aggregates of beta-amyloid (amylospheroid) show high neurotoxicity and activate tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 β . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 6370–6375.
- Howarter, J., and Youngblood, J. (2006). Optimization of Silica Silanization by 3-Aminopropyltriethoxysilane. *Langmuir* *22*, 11142–11147.
- Hoyer, S. (2000). Brain glucose and energy metabolism abnormalities in sporadic Alzheimer disease. Causes and consequences: an update. *Exp. Gerontol.* *35*, 1363–1372.
- Hölttä, M, Hansson, O, Andreasson, U, and Hertze, J (2013). Evaluating amyloid- β oligomers in cerebrospinal fluid as a biomarker for Alzheimer's disease. *PloS One*. *8* (6).
- Jack, 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., et al. (2013). Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers. *Lancet Neurol* *12*, 207–216.

Jankowsky, J., Fadale, D., Anderson, J., Xu, G., Gonzales, V., Jenkins, N., Copeland, N., Lee, M., Younkin, L., Wagner, S., et al. (2004). Mutant Präsenilins specifically elevate the levels of the 42 residue β -amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific γ secretase. *Hum. Mol. Genet.* *13*, 159–170.

Jeon, S., Lee, J., Andrade, J., and Gennes, P. (1991). Protein—surface interactions in the presence of polyethylene oxide. *Journal of Colloid and Interface Science* *142*, 149–158.

Jönsson, L, and Berr, C (2005). Cost of dementia in Europe. *European Journal of Neurology.*, *12*, 50-53.

Jönsson, C., Aronsson, M., Rundström, G., Pettersson, C., Mendel-Hartvig, I., Bakker, J., Martinsson, E., Liedberg, B., MacCraith, B., Öhman, O., et al. (2008). Silane – dextran chemistry on lateral flow polymer chips for immunoassays. *Lab Chip* *8*, 1191–1197.

Kang, K, Choi, J, Nam, JH, Lee, SC, and Kim, KJ (2008). Preparation and characterization of chemically functionalized silica-coated magnetic nanoparticles as a DNA separator. *J. Phys. Chem. B*, *113*, 536-543.

Kim, SH, and Jeyakumar, M (2007). Dual-mode fluorophore-doped nickel nitrilotriacetic acid-modified silica nanoparticles combine histidine-tagged protein purification with site-specific fluorophore. *J.A.C.S.*, *129*, 13254-13264.

Kinkel, J., and Unger, K. (1984). Role of solvent and base in the silanization reaction of silicas for reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* *316*, 193200.

Klaver, A., Patrias, L., Finke, J., and Loeffler, D. (2011). Specificity and sensitivity of the A β oligomer ELISA. *Journal of Neuroscience Methods* *195*, 249254.

Klaver, A.C., Finke, J.M., Digambaranath, J., Balasubramaniam, M., and Loeffler, D.A. (2010). Antibody concentrations to A 1–42 monomer and soluble oligomers in untreated and antibody–antigen-dissociated intravenous immunoglobulin preparations. *International Immunopharmacology* *10*, 115–119.

Korzeniowska, B., Nooney, R., Wencel, D., and McDonagh, C. (2013). Silica nanoparticles for cell imaging and intracellular sensing. *Nanotechnology* *24*, 442002.

Krüger, P., Knes, R., and Friedrich, J. (1999). Surface cleaning by plasma-enhanced desorption of contaminants (PEDC). *Surface and Coatings Technology* *112*, 240244.

LaFerla, FM, Green, KN, and Oddo, S (2007). Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience.*, *8*, 499-509.

Lai, CY, Trewyn, BG, and Jeftinija, DM (2003). A mesoporous silica nanosphere-based carrier system with chemically removable CdS nanoparticle caps for stimuli-responsive controlled release of Neurotransmitters and Drug Molecules. *125*, 4451-4459.

- Lambert, MP, Barlow, AK, and Chromy, BA (1998). Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β 1–42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, *95*, 6448–6453.
- Lee, JE, Lee, N, Kim, H, Kim, J, and Choi, SH (2009). Uniform mesoporous dye-doped silica nanoparticles decorated with multiple magnetite nanocrystals for simultaneous enhanced magnetic resonance imaging. *J.A.C.S.*, *132*, 552–557.
- Lewczuk, P., Mroczko, B., Fagan, A., and Kornhuber, J. (2015). Biomarkers of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: A current perspective. *Advances in Medical Sciences* *60*, 7682.
- Luo, D, and Saltzman, WM (2006). Nonviral gene delivery: thinking of silica. *Gene Therapy.*, *13*, 585–586.
- Marcello, A, Wirths, O, and Schneider-Axmann, T (2009). Circulating immune complexes of A β and IgM in plasma of patients with Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transm.*, *116*, 913–920.
- Masalov, V., Sukhinina, N., Kudrenko, E., and Emelchenko, G. (2011). Mechanism of formation and nanostructure of Stöber silica particles. *Nanotechnology* *22*, 275718.
- Mehta, PD, Pirttilä, T, and Mehta, SP (2000). Plasma and cerebrospinal fluid levels of amyloid β proteins 1–40 and 1–42 in Alzheimer disease. *Arch Neurol.* *57*, 100–105.
- De la Monte, S.M., Garner, W., and Wands, J.R. (1997). Neuronal thread protein gene modulation with cerebral infarction. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *17*, 623–635.
- Mastrangelo, I.A., Ahmed, M., Sato, T., Liu, W., Wang, C., Hough, P., and Smith, S.O. (2006). High-resolution atomic force microscopy of soluble Abeta42 oligomers. *J. Mol. Biol.* *358*, 106–119.
- Mucke, L. (2009). Neuroscience: Alzheimer's disease. *Nature* *461*, 895–897.
- Nelson, R., Sawaya, M.R., Balbirnie, M., Madsen, A.Ø., Riek, C., Grothe, R., and Eisenberg, D. (2005). Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils. *Nature* *435*, 773–778.
- Oddo, S, Caccamo, A, Smith, IF, and Green, KN (2006). A dynamic relationship between intracellular and extracellular pools of A β . *The American Journal of Pathology*, *168*, 184–194.
- Pall life sciences, Quantifizierung monoklonaler Antikörper Biolayer-Inferferometrie.
- Petersen, R.C. (2004). Mild cognitive impairment as a diagnostic entity. *Journal of Internal Medicine* *256*, 183–194.
- Pich, E., Jeromin, A., Frisoni, G., Hill, D., Lockhart, A., Schmidt, M., Turner, M., Mondello, S., and Potter, W. (2014). Imaging as a biomarker in drug discovery for Alzheimer's disease: is MRI a suitable technology? *Alzheimers Res Ther* *6*, 51.
- Pomeroy, C, and Filice, GA (1988). Effect of intravenous silica on the course of *Nocardia asteroides* pneumonia. *Infection and Immunity.*, *56*, 2507–2511.
- Price, JL, and Morris, JC (1999). Tangles and plaques in nondemented aging and “preclinical” Alzheimer's disease. *Annals of Neurology.*, *45*, 358–368.

- Qhobosheane, M., Santra, S., Zhang, P., and Tan, W. (2001). Biochemically functionalized silica nanoparticles. *The Analyst* 126, 1274–1278.
- Riener, C., Kada, G., and Gruber, H. (2014). Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine. *Anal Bioanal Chem* 373, 266–276.
- Riener, C.K., Stroh, C.M., Ebner, A., Klampfl, C., Gall, A.A., Romanin, C., Lyubchenko, Y.L., Hinterdorfer, P., and Gruber, H.J. (2003). Simple test system for single molecule recognition force microscopy. *Analytica Chimica Acta* 479, 59–75.
- Roychaudhuri, R, Yang, M, and Hoshi, MM (2009). Amyloid β -protein assembly and Alzheimer disease. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 4749-4753.
- Saido, T.C., Iwatsubo, T., Mann, D.M., Shimada, H., Ihara, Y., and Kawashima, S. (1995). Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species, A beta N3(pE), in senile plaques. *Neuron* 14, 457–466.
- Sakono, M., and Zako, T. (2010). Amyloid oligomers: formation and toxicity of A β oligomers. *FEBS J.* 277, 1348–1358.
- Santos, A.N., Torkler, S., Nowak, D., Schlittig, C., Goerdes, M., Lauber, T., et al., Detection of Amyloid- β Oligomers in Human Cerebrospinal Fluid by Flow Cytometry and Fluorescence Resonance Energy Transfer, 11, 117-125.
- Savage, M., Kalinina, J., Wolfe, A., Tugusheva, K., Korn, R., Cash-Mason, T., Maxwell, J., Hatcher, N., Haugabook, S., Wu, G., et al. (2014). A sensitive a β oligomer assay discriminates Alzheimer's and aged control cerebrospinal fluid. *J. Neurosci.* 34, 2884–2897.
- Scheltens, P, Fox, N, Barkhof, F, and Carli, D.C. (2002). Structural magnetic resonance imaging in the practical assessment of dementia: beyond exclusion. *The Lancet Neurology*, 1, 13-20.
- Shipley, S.M., Frederick, M.C., Filley, C.M., and Kluger, B.M. (2013). Potential for misdiagnosis in community-acquired PET scans for dementia. *Neurol Clin Pract* 3, 305–312.
- Silberzan, P., Leger, L., Ausserre, D., and Benattar, J. (1991). Silanation of silica surfaces. A new method of constructing pure or mixed monolayers. *Langmuir* 7, 1647-1651.
- Singh, L., Bhattacharyya, S., Kumar, R., Mishra, G., Sharma, U., Singh, G., and Ahalawat, S. (2014). Sol-Gel processing of silica nanoparticles and their applications. *Advances in Colloid and Interface Science* 214, 1737.
- Spies, P.E., Verbeek, M.M., Groen, T., and Claassen, J. (2012). Reviewing reasons for the decreased CSF Abeta42 concentration in Alzheimer disease. *Frontiers in Bioscience* 2024–2034.
- Stöber, W., Fink, A., and Bohn, E. (1968). Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *Journal of Colloid and Interface Science* 26.
- Takata, M., Nakashima, M., Takehara, T., Baba, H., Machida, K., Akitake, Y., Ono, K., Hosokawa, M., and Takahashi, M. (2008). Detection of amyloid beta protein in the urine of Alzheimer's disease patients and healthy individuals. *Neurosci. Lett.* 435, 126–130.

- Toledo, J.B., Shaw, L.M., and Trojanowski, J.Q. (2013). Plasma amyloid beta measurements - a desired but elusive Alzheimer's disease biomarker. *Alzheimers Res Ther* 5, 8.
- Trischmann, L., Schaupp, M., Penz, M., Tiller, F.-W.W., et al. (2007). Detection of amyloid-beta oligomers in human cerebrospinal fluid by flow cytometry and fluorescence resonance energy transfer. *J. Alzheimers Dis.* 11, 117–125.
- Vandenberg, E.T., Bertilsson, L., Liedberg, B., Uvdal, K., Erlandsson, R., Elwing, H., and Lundström, I. (1991). Structure of 3-Aminopropyl Triethoxy Silane on Silicon Oxide. *Journal and Colloid and Interface Science*, 147, 103-118.
- Vashist, S., Dixit, C., MacCraith, B., and O'Kennedy, R. (2011). Effect of antibody immobilization strategies on the analytical performance of a surface plasmon resonance-based immunoassay. *The Analyst* 136, 4431.
- Viola, K., and Klein, W. (2015). Amyloid β oligomers in Alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis. *Acta Neuropathol.*
- Voort, P., and Vansant, E. (1996). Silylation of the Silica Surface A Review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 19, 2723-2752.
- Wang, L., Zhao, W., and Tan, W. (2008). Bioconjugated silica nanoparticles: Development and applications. *Nano Res.* 1, 99-115.
- Wang-Dietrich, L., Funke, S.A., Kühbach, K., Wang, K., Besmehn, A., Willbold, S., Cinar, Y., Bannach, O., Birkmann, E., and Willbold, D. (2013). The amyloid- β oligomer count in cerebrospinal fluid is a biomarker for Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 34, 985–994.
- Weetall, H.H. (1993). Preparation of immobilized proteins covalently coupled through silane coupling agents to inorganic supports. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 41, 157–188.
- Wirths, O., Multhaup, G., and Bayer, T. (2004). A modified β -amyloid hypothesis: intraneuronal accumulation of the β -amyloid peptide – the first step of a fatal cascade. *J Neurochem* 91, 513–520.
- Xia, W, Yang, T, Shankar, G, and Smith, IM (2009). A specific enzyme-linked immunosorbent assay for measuring β -amyloid protein oligomers in human plasma and brain tissue of patients with Alzheimer., *Arch Neurol*, 66, 190-199.
- Xing, Y., Dementev, N., and Borgouet, E. (2007). Chemical labeling for quantitative characterization of surface chemistry. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* 11, 8691.
- Yang, HH, Zhang, SQ, Chen, XL, and Zhuang, ZX (2004). Magnetite-containing spherical silica nanoparticles for biocatalysis and bioseparations. *Anal Chem*, 76, 1316-1321.
- Yang, T., O'Malley, T.T., Kanmert, D., Jerecic, J., Zieske, L.R., Zetterberg, H., Hyman, B.T., Walsh, D.M., and Selkoe, D.J. (2015). A highly sensitive novel immunoassay specifically detects low levels of soluble A β oligomers in human cerebrospinal fluid. *Alzheimers Res Ther* 7, 14.
- Youn, Y.C. (2011). urine neural thread protein measurements in alzheimers disease., *J Am Med Dir, Assoc.*, 12, 372-376.