

**Biophysikalische Charakterisierung
der Interaktion von Nanoobjekten,
peptidbasierten Medikamentenprototypen
und dem Amyloid- β -Peptid**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Christina Decker
aus Neunkirchen

Düsseldorf, Oktober 2016

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: Herr Univ.-Prof. Dr. Dieter Willbold

Korreferent: Frau Univ.-Prof. Dr. Henrike Heise

Tag der mündlichen Prüfung: 24.11.2016

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1 Einleitung	3
1.1 Alzheimersche Demenz	3
1.2 Amyloid- β -Peptid assoziierte Pathologie	3
1.3 D-Peptidbasierte Therapien bei der Alzheimerschen Demenz	6
1.4 Therapeutisch wirksame Nanopartikel	8
1.4.1 Charakteristika von Nanopartikel.....	8
1.4.2 Nanopartikel als Transportsysteme in der Biomedizin	9
1.5 Multimodale Anwendung der Analytischen Ultrazentrifugation	10
1.6 Ziele der Arbeit	11
2 Materialien.....	13
2.1 Puffer	13
2.2 Chemikalien	14
2.3 Proteine	14
2.4 Geräte	15
2.5 Software	16
3 Methoden	17
3.1 A β 42-Probenherstellung	17
3.2 Analytische Ultrazentrifugation.....	17
3.2.1 Technische Grundlagen	18
3.2.2 Physikalische Grundlagen.....	21
3.2.3 Softwarebasierte Datenauswertung	25
3.2.3.1 SEDNTERP	25
3.2.3.2 SEDANAL.....	26
3.2.3.3 SEDFIT	28
3.2.3.4 GUSSI	31
4 Charakterisierung der Aβ42-Speziesverteilung.....	32
4.1 Einfluss verschiedener Puffersysteme auf die A β 42-Speziesverteilung.....	32
4.2 Einfluss steigender Salzkonzentrationen auf die A β 42-Speziesverteilung.....	34
4.3 Einfluss der Zentrifugationstemperatur auf die A β 42-Speziesverteilung	38

Inhaltsverzeichnis

5 Aβ42-Ligandenwechselwirkungsstudien	41
5.1 A β 42-HSA-Wechselwirkung.....	41
5.2 A β 42-D-Peptid-Wechselwirkung	46
5.2.1 Wechselwirkungsuntersuchung mittels Absorptionsdetektion.....	46
5.2.2 Wechselwirkungsuntersuchung mittels Fluoreszenzdetektion	51
6 Charakterisierung der Größenverteilung und Ligandenwechselwirkung von Nanopartikeln	57
6.1 Charakterisierung der Größenverteilung von HSA-Nanopartikeln.....	57
6.2 Charakterisierung der Ligandenwechselwirkung mit Goldnanopartikeln.....	63
6.2.1 Quantifizierung der Ligandenwechselwirkung.....	64
6.2.2 Überstandsanalyse nach Oberflächensättigung	73
7 Diskussion	78
7.1 Protein-Ligandenwechselwirkungsstudien in der AUZ.....	78
7.2 Charakterisierung von Nanopartikeln in der AUZ	82
8 Zusammenfassung.....	84
9 Summary	85
10 Selbstständigkeitserklärung.....	86
11 Danksagung.....	87
12 Literaturverzeichnis	88

Abkürzungsverzeichnis

A β	Amyloid- β
A β 42	Amyloid- β 42
FITC-A β 42	FITC- β -Ala-Amyloid- β 42
AD	Alzheimersche Demenz
APP	Amyloid-Precursor-Protein
AuNP	Goldnanopartikel
AUZ	Analytische Ultrazentrifugation
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cPoise	Centipoise
DLS	Dynamische Lichtstreuung
FDS	Fluoreszenzdetektionssystem
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HFIP	1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-isopropanol
HSA	Humanes Serumalbumin
MSV-Lauf	Mehrstufiger Sedimentationsgeschwindigkeitslauf
Mw	Molekulargewicht
n.a.	nicht anwendbar
n.b.	nicht bestimmbar
NaP _i	Natriumphosphat-Puffer
NP	Nanopartikel
OD	Absorption
PBS	Dulbecco's PBS
Ri-Noise	radialunabhängiges Rauschen
rpm	Umdrehungen pro Minute
RMSD	Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung

| Abkürzungsverzeichnis

RT	Raumtemperatur
S	Svedberg Einheit
SV-Lauf	Sedimentationsgeschwindigkeitslauf
Ti-Noise	zeitunabhängiges Rauschen
u.a.	unter anderem
UZ	analytische Ultrazentrifuge
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Alzheimersche Demenz

Bei der Alzheimerschen Demenz handelt es sich um eine langsam fortschreitende neurodegenerative Erkrankung des humanen Hirns, deren Symptomatik bereits 1907 von Alois Alzheimer, dem späteren Namensgeber der Erkrankung, beschrieben wurde [1]. Die markantesten klinischen Symptome sind dabei kognitive Beeinträchtigungen und Verhaltens- und Gedächtnisstörungen der Patienten. Neuropathologische Hauptmerkmale sind extrazelluläre Amyloidplaques, die hauptsächlich aus Ablagerungen des Amyloid- β -Peptids ($A\beta$) bestehen und intrazelluläre Neurofibrillenbündel, deren Hauptbestandteile hyperphosphorylierte Tauproteine sind. Diese Ablagerungen führen zu Degradationsprozessen von Axonen und Synapsen und final zum Absterben von Hirnneuronen, was zu den genannten Symptomen führt. Die wichtigsten Risikofaktoren einer Neuerkrankung stellen dabei der Alterungsprozess des menschlichen Organismus und die damit einhergehenden, auf zellulärer Ebene ablaufenden Veränderungen dar. Diese werden, neben einer genetischen Prädisposition, aktuell auch als die Hauptursachen einer Neuerkrankung angesehen. Darüber hinaus sind somatische, immunologische und psychosoziale Risikofaktoren zu nennen [2, 3]. Schätzungen gehen davon aus, dass die aktuelle Zahl an Alzheimer Patienten von im Jahr 2015 weltweit 46 Millionen, auf 131,5 Million weltweit im Jahr 2050 ansteigen wird [4]. Dies macht deutlich, wie wichtig die Entwicklung kurativer, kostengünstiger Therapien ist, da zum aktuellen Zeitpunkt nur präventive und symptomatische Therapien zur Verfügung stehen [5].

1.2 Amyloid- β -Peptid assoziierte Pathologie

In dem der Alzheimerschen Demenz zugrundeliegenden pathologischen Prozess wird dem Amyloid- β -Peptid und dessen unterschiedlichen strukturellen Formen eine zentrale Rolle zugesprochen. Dies wurde bereits 1992 von Hardy J.A und Higgins G.A in Form der Amyloid-Kaskaden-Hypothese postuliert [6] und wird heute in Form der Amyloid-Hypothese als eines der Hauptansatzmodelle für die Entwicklung von kurativen Therapien gegen die Alzheimersche Demenz angesehen [7]. Bei der Amyloid-Hypothese heute wird nicht mehr nur alleine die Produktion des $A\beta$ -Peptids als initialer Schritt im pathologischen Prozess der Alzheimerschen Demenz angesehen, sondern eine Disharmonie zwischen der Produktion und der Degradation von $A\beta_{42}$ und anderen $A\beta$ -Peptidvarianten. Untermuert wird dies heute durch umfassend verfügbare Genotyp-Phänotyp-Studien, aus denen hervorgeht, dass sowohl eine Überproduktion als auch eine verminderte Degradation der $A\beta$ -Peptidvarianten unabhängig voneinander zum klinischen Bild der Alzheimerschen Demenz führen kann.

1 | Einleitung

Hardy J.A und Higgins G.A postulierten bei ihrer ursprünglichen Amyloid-Kaskaden-Hypothese einen strikten Down-Stream-Prozess von der reinen A β -Produktion zur Alzheimerschen Demenz. Neuere Forschungsergebnisse sprechen aber anderen zellulären Prozessen, wie einem veränderten Cholesterol/Sterol-Metabolismus, Entzündungsprozessen mit Zusammenhang zum angeborenen Immunsystem des Hirns und endosomalen, vesikulären Resorptionsprozessen heute einen bedeutend höheren Einfluss auf die pathologischen Prozesse der Alzheimerschen Demenz zu [7].

Die Produktion von verschiedenen A β -Peptidvarianten erfolgt durch die proteolytische Spaltung des Typ I Transmembranglycoproteins Amyloid-Precursor-Protein (APP), das in nahezu allen Säugetierzellmembranen lokalisiert ist. Es unterliegt einer Reihe von proteolytischen Spaltungsprozessen, wobei eine gleichzeitige Spaltung des APP durch die β -Sekretase im Zelllumen und die γ -Sekretase im transmembranen Sequenzbereich zur Sekretion von A β -Peptiden mit einer variierenden Länge von 38-43 Aminosäuren führt (Abbildung 1.2) [8]. Entsprechend ihrer Länge weisen die A β -Peptide unterschiedliche Eigenschaften bezüglich ihrer Löslichkeit, Stabilität und biologischen und toxischen Eigenschaften auf [9]. Je mehr hydrophobe Aminosäuren die entsprechende A β -Peptidvariante an ihrem C-terminalen Ende aufweist, desto stärker neigt sie zur Aggregation. Dabei führen Mutationen in der Gensequenz des Amyloid-Precursor-Proteins (APP) zur Bildung von mehr A β 42 und A β 43-Varianten, die zur stärkeren Selbstaggregation neigen, wodurch es zu einer vermehrten Plauebildung kommt. Im Gegensatz zu A β 42 und A β 43 gilt A β 40 aktuell als nicht amyloid und seine Bildung wird als ein nicht pathologischer, lebenslang ablaufender Prozess angesehen. Die physiologische Funktion von A β 40 konnte noch nicht abschließend geklärt werden [9, 10]. Eine Vervielfachung der Gensequenz des APP, wie bei einer Trisomie 21 zu beobachten, resultiert in einer variantenunabhängig, erhöhten A β -Konzentration. Mutationen in den beiden Gensequenzen von Presenilin-1 und -2, welche für die katalytische Untereinheit der γ -Sekretase kodieren, führen ebenfalls zur Erhöhung der A β 42 und A β 43-Konzentration. Ein Allel des Apolipoprotein E, ApoE4, das im Rahmen der A β -Degradation als Transporterprotein fungiert, führt zur einer Reduktion der A β -Degradation und so zu einer vermehrten Plauebildung, unabhängig des Prozessierungsprozesses von APP [7]. Nach der proteolytischen Spaltung werden die A β -Peptide aus ihrer ursprünglich hydrophoben Umgebung in der Membran in das hydrophilere Cytosol oder den hydrophileren extrazellulären Raum sekretiert. Die Änderung des Umgebungsmilieus führt von einer α -helikaldominierten Struktur des A β -Monomers, in hydrophober Umgebung, zu einer β -faltblattdominierten Struktur in hydrophiler Umgebung. Erfolgt nach der Prozessierung des APP und einer damit einhergehenden Freisetzung von A β 42 und längeren A β -Peptidvarianten nicht deren Resorption oder Degradation, kommt es in Folge der Strukturumwandlung zur Aggregation [11] und den weiteren pathologischen Prozessen der Amyloid-Hypothese.

1 | Einleitung

Dabei ist besonders die Bildung von sogenannten toxischen A β -Oligomeren hervorzuheben. Diese kleinen A β -Aggregate, bezüglich deren genauer Größen noch kein Konsens besteht, sollen Auslöser der bekannten Tau-Pathologie sein, an deren Ende sich aus hyperphosphorylierten Tauproteinen intrazelluläre Neurofibrillenbündel bilden [9]. Außerdem sollen diese A β -Oligomere an eine Reihe verschiedener Rezeptoren binden und so deren Funktionalität beeinflussen. Zudem sollen sie unspezifisch mit Membranen assoziieren und deren Permeabilisation und oxidativen Stress auslösen [9]. Weitere Bestandteile der Amyloid-Hypothese sind u.a. in Folge der Aggregatbildung von A β -Peptiden auftretende Entzündungsprozesse und eine veränderte neuronale Homöostase, was letztlich zu neuronalen und synaptischen Fehlfunktionen und Neuronensterben führt [7].

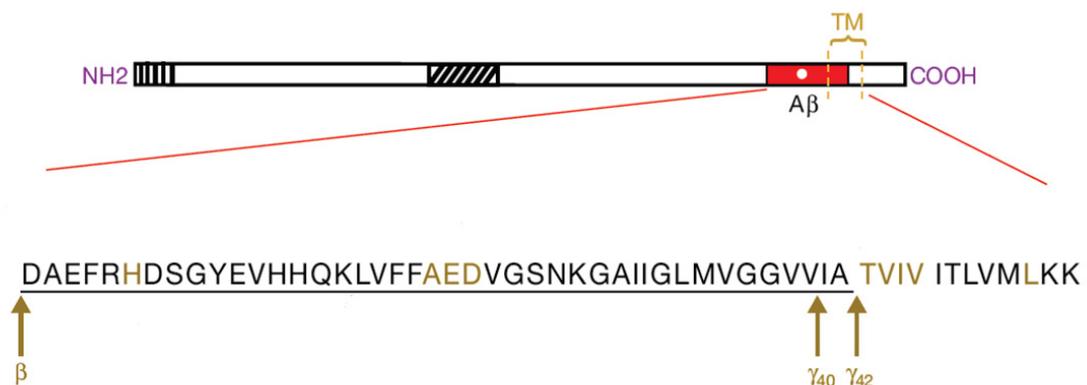


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der proteolytischen Spaltung des Amyloid-Precursor-Proteins (APP) in verschiedene A β -Peptidvarianten (modifiziert nach [8]). Oben: schematische Darstellung der 770 Aminosäuren großen Sequenz von APP, wobei TM den Transmembranbereich von AS 700-723 kennzeichnet. Der rot unterlegte Bereich markiert den Sequenzbereich aus dem durch Proteolyse die unterschiedlichen langen A β -Peptidvarianten hervorgehen. Unten: Aminosäuresequenz des Transmembranbereichs von APP mit dem darüber hinaus gehenden Sequenzanteil des A β -Peptids (AS 672-723). Der unterstrichene Sequenzbereich kennzeichnet die Aminosäuresequenz von A β 42. β : Schnittstelle der β -Sekretase; γ_{40} bzw. γ_{42} : Schnittstellen der γ -Sekretase, die zur Bildung von A β 40 bzw. A β 42 führt.

Da APP als Transmembranprotein nicht nur spezifisch auf neuronale Zellen des zentralen Nervensystems (ZNS) beschränkt ist, sondern auch in Zellmembranen der Peripherie auftritt, erfolgt auch dort eine Proteolyse von APP in die verschiedenen A β -Peptidvarianten. Darüber hinaus ist bekannt, dass rezeptorvermittelte Transportprozesse von A β über die Bluthirnschranke erfolgen, was einen Gleichgewichtszustand zwischen der peripheren A β -Konzentration und der im Hirn vermuten lässt. Zudem wird im Rahmen der sogenannten peripheren Sinkhypothese davon ausgegangen, dass ein Gleichgewicht zwischen A β -Monomeren und den Plaques im Hirn besteht und nicht nur neugebildetes A β -Monomer abtransportiert wird, sondern es auch zum Degradationsprozess der Plaques kommt, da die A β -Monomerkonzentration durch den erhöhten Abtransport im Hirn reduziert und ein Konzentrationsausgleich vom Organismus angestrebt wird [12].

1 | Einleitung

Ein Therapieansatz, der auf der peripheren Sinkhypothese beruht, ist es, eine Reduktion der mit der Amyloid-Hypothese assoziierten Pathologie zu erreichen, in dem eine Reduktion der A β -Konzentration im Hirn über einen erhöhten Abtransport von A β -Monomeren über die Bluthirnschranke in die Peripherie erfolgt. Eine Reduktion der dadurch erhöhten peripheren A β -Konzentration erfolgt anschließend durch eine Reihe von unterschiedlichen endozytotischen Prozessen [13]. Neuere Studien hinterfragen jedoch den Ansatz der peripheren Sinkhypothese, dass eine Reduktion der peripheren A β -Konzentration, basierend auf Diffusionsprozessen und rezeptorvermittelten Transportprozessen von A β über die Bluthirnschranke, zu einer Reduktion der A β -Konzentration im Hirn führt [14, 15]. Diese Studien lassen schlussfolgern, dass die der A β -Homöostase zugrundeliegenden Produktions-, Degradations-, Aggregations- und Transportprozesse im Körper bedeutend komplexer sind, als bisher angenommen. Es ist vielmehr eine umfassende Therapie notwendig, die nicht alleine auf eine Körperregion oder auf einen der zugrundeliegenden pathologischen Prozesse abzielt [7].

1.3 D-Peptidbasierte Therapien bei der Alzheimerschen Demenz

Mit Blick auf die Komplexität der Pathologie der Alzheimerschen Demenz und der damit schwierigen Therapieentwicklung, werden eine Reihe unterschiedlicher Ansatzpunkte für die Entwicklung von kurativen Therapien verfolgt. Ein möglicher Ansatzpunkt, der sich aus der Amyloid-Hypothese ergibt, ist die Inhibierung der A β -Aggregationsprozesse mittels D-enantiomeren Peptiden. Peptidbasierte Medikamente zeigen im Vergleich zu kleinen organischen Wirkstoffmolekülen eine hohe Bioaktivität und Spezifität mit einer gleichzeitig niedrigen Toxizität. Darüber hinaus kommt es nur selten zu unspezifischen Wechselwirkungen mit Nicht-Zielstrukturen und nur geringen intermolekularen Wechselwirkungen der Peptide untereinander [16, 17]. Ein entscheidender Nachteil dieser peptidbasierten Medikamente ist, neben einer geringen Löslichkeit und einer geringen Blut-Hirnschranken-Gängigkeit, ihre geringe Stabilität, aufgrund natürlicher proteasevermittelter Degradationsprozesse im Körper. Eine Möglichkeit diesen Nachteil zu umgehen, sich aber weiterhin deren Vorteile zu Nutze zu machen, ist die Entwicklung von D-enantiomeren Peptiden mittels z.B. Spiegelbild-Phagen-Display-Verfahren. D-enantiomere Peptide zeigen im Vergleich zu deren L-aminosäurebasierten Pendanten eine verringerte Degradationsrate durch Proteasen, damit eine längere Halbwertszeit im Körper, sind kaum immunogen und werden nach oraler Administration systemisch resorbiert [16, 17]. Ein solches, mittels Spiegelbild-Phagen-Display selektiertes, D-enantiomeres Peptid stellt das 12 Aminosäuren lange D3-Peptid dar (Abbildung 1.3) mit dem bereits umfangreiche biophysikalische und zellbiologische Studien zur Untersuchung der Affinität und Spezifität bezüglich des A β -Peptids und dessen Aggregatformen durchgeführt wurden.

1 | Einleitung

Darüber hinaus wurden Tiermodellstudien durchgeführt, um das therapeutische Potential von D3 in transgenen Alzheimermausmodellen zu untersuchen. Dabei führte eine D3-Verabreichung in den Mausstudien zu einer Reduktion der A β -Plaques in den Hirnen der Mäuse und zu einer erhöhten kognitiven Leistung. Zudem präzipitiert D3 toxische A β -Oligomere zu nicht toxischen, nicht amyloidogenen amorphen Aggregaten [18, 19, 20]. Neben diesen experimentellen Untersuchungen von D3 mit A β und dessen Aggregatformen wurden auch *in silico* Studien durchgeführt, um auf molekularer Ebene Aussagen über potentielle Interaktionen zwischen D3 und dem A β 42-Monomer und A β 42-Pentamer machen zu können. Dabei nimmt D3 aufgrund der repulsiven Kräfte seiner fünf positivgeladenen Arginine eine ungeordnete Sekundärstruktur ein [11]. Interaktionssimulationen von D3 mit dem A β 42-Monomer zeigten, dass es zu einer, auf elektrostatischen Interaktionen beruhenden, favorisierten Bindung an das A β 42-Monomer, im Gegensatz zu dem A β 42-Pentamer, kommt [18]. Dabei sollen Interaktionen im N-terminalen Bereich des A β 42-Monomers und den positivgeladenen Argininen entscheidend sein. Der übergeordnete Effekt von D3 auf A β 42 besteht in einer signifikanten Verringerung des β -Faltblattanteils und des α -helikalen Anteils des A β 42-Monomers, zu Gunsten einer mehr ungeordneten Struktur [11, 18].

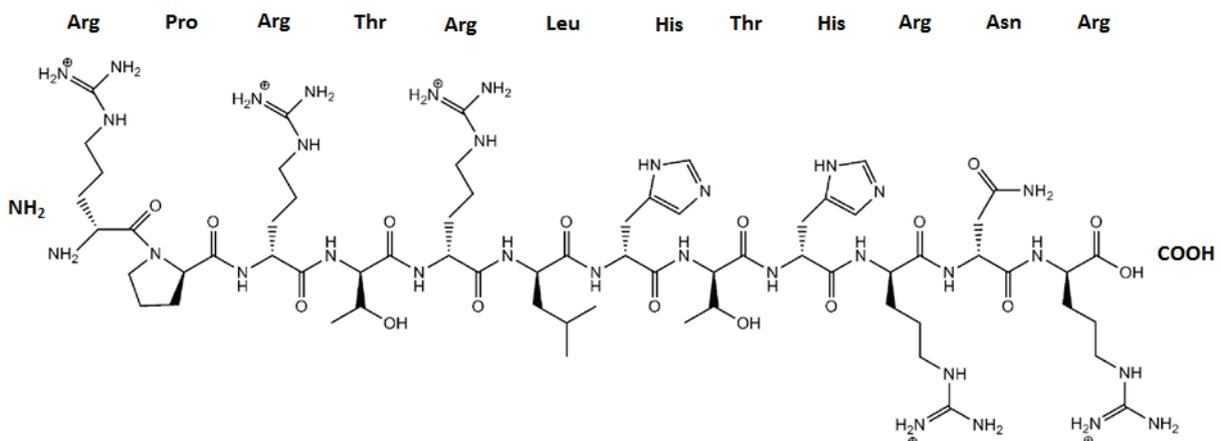


Abbildung 1.3: Lewis Struktur des D-enantiomeren D3-Peptids (modifiziert nach [19]).

1.4 Therapeutisch wirksame Nanopartikel

Als Nanopartikel (NP) werden Partikel klassifiziert, deren Längenausdehnung in zwei oder drei ihrer Dimensionen im Bereich zwischen 1 – 100 nm liegen, unabhängig, ob sie organischen oder anorganischen Ursprungs sind [21]. Dies führt dazu, dass NP im Verhältnis zu ihrem Volumen eine sehr große Oberfläche und damit verbunden eine hohe Oberflächenreaktivität und –kapazität aufweisen. Das große Oberflächen-zu-Volumenverhältnis führt dazu, dass NP ein signifikant anderes chemisches, physikalisches und biologisches Verhalten aufweisen, als ihre korrespondierenden Makrosubstanzen mit denselben Zusammensetzungen und Eigenschaften. So verlieren z.B. ferromagnetische Eisenoxide bei einer Größe von unter 30 nm ihren permanenten Magnetismus. Aufgrund dieser deutlich unterschiedlichen Charakteristika zu ihren bekannten Makrosubstanzen werden NP als „neue“ Materialien angesehen und eröffnen eine breite Fülle von Anwendungsmöglichkeiten [22]. Anwendung finden sie bereits heute in den Bereichen Luftfahrt, Flugzeugtechnik, Architektur, Chemie, Bekleidungsindustrie, Umweltschutz, Computertechnik, Konsumgüter und dem Gesundheitssektor [23]. Die ausgeprägte dynamische Natur von NP mit ihren geringen Größen und hohen Reaktivitäten bzw. Instabilitäten und den gleichzeitig immer weiter in das alltägliche Leben der Menschen hineinreichenden Anwendungen, rücken die potentiellen Risiken der breitgefächerten Nanopartikelanwendung immer mehr in den Fokus der Wissenschaft [22, 24].

1.4.1 Charakteristika von Nanopartikel

Unabhängig der zugrundeliegenden Makrosubstanz oder dem Ursprung der NP, vereint alle NP ihre geringe Größe und das damit einhergehende große Oberflächen-zu-Volumenverhältnis. Dieses große Oberflächen-zu-Volumenverhältnis führt zu hohen Oberflächenenergien der NP, deren Resultat ausgeprägte und dynamische Interaktionen der NP mit ihrer Umgebung und damit automatisch einhergehenden Oberflächenmodifikationen sind. Diese Oberflächenmodifikationen bestimmen letztlich die nach außen erscheinenden Charakteristika der NP [23]. Man unterscheidet zwischen den intrinsischen Eigenschaften der NP und den durch Umweltinteraktionen und Oberflächenmodifikationen hervorgerufenen extrinsischen Charakteristika. Als intrinsische Eigenschaften sind neben der Größe, die Form, die Oberflächenladung und die Hydrophobizität zu nennen. Basierend auf diesen intrinsischen Eigenschaften weisen NP ein unterschiedliches Agglomerations- und Degradationsverhalten auf. Eine direkte Beeinflussung dieser intrinsischen Eigenschaften kann über die Variation der Polarität, des pH-Werts, der Viskosität, der Temperatur und der Ionenstärke des umgebenden Mediums erfolgen [23]. Extrinsische Charakteristika von NP sind stark von den individuellen Eigenschaften der Oberflächenmodifikationsbestandteilen abhängig.

1 | Einleitung

Mit Blick auf den thematischen Hintergrund dieser Dissertation in Kapitel 1.3 und 1.6 sind bezüglich der Oberflächenmodifikation und -interaktion von NP besonders Proteine hervorzuheben. Diese Interaktionen basieren von Seiten der Proteine auf deren Form, Größe und Oberflächenladungen und –hydrophobizität, die wiederum auf deren individueller Aminosäuresequenz, bei gegebenen Lösungsmittelbedingungen (z.B. pH-Wert) zurückzuführen sind. Seitens der NP sind zusätzlich noch deren Fähigkeiten zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zu nennen, was zur kovalenten Bindung der Proteine an die Oberfläche der NP führen kann [23]. Die Adsorption von Proteinen an die Oberfläche von NP führt zu einer sogenannten Proteincorona. Die Bildungsgeschwindigkeit und die Zusammensetzung dieser Proteincorona, sowie die sich daraus ergebenden extrinsischen Charakteristika der NP hängen stark von dem biologischen System ab, in welchem sich die NP befinden (z.B. humanes Blut oder Cytosol) [25]. So hat eine, sich durch die Bildung der Proteincorona, ergebende Größenvariation und eine Änderung der physikochemischen Stabilität der NP, direkten Einfluss auf deren Beweglichkeit und damit einhergehende biologische Verfügbarkeit [24]. Ebenso führt die Bildung einer Corona, unabhängig vom organischen oder anorganischen Ursprung deren Bestandteile, zu einer erheblichen Dichtevariation der NP, was deren physikalisch korrekte Bestimmung erschwert, da eine Messung direkt im entsprechenden Medium erfolgen muss [26].

1.4.2 Nanopartikel als Transportsysteme in der Biomedizin

Entsprechend ihrer Größe bewegen sich NP in der Größenordnung von zellulären Strukturen, wie z.B. Kernmembranporen mit einem Durchmesser von 9 nm oder Rezeptoren. Diese Ähnlichkeit in der räumlichen Ausdehnung ermöglicht ihnen die Überwindung von biologischen Barrieren, damit verbunden eine freiere Beweglichkeit im Organismus und die räumlich enge Interaktion mit biologischen Makromolekülen. Das gleichzeitig hohe Oberflächen-zu-Volumenverhältnis ermöglicht eine starke räumliche Akkumulation von Therapeutika oder Kontrastmitteln auf deren Oberfläche und damit verbunden eine lokale Konzentrationserhöhung dieser an ihrem Zielort. Zur Optimierung der gewünschten Charakteristika der NP kann gleichzeitig eine Veränderung ihrer Größe und Form erfolgen. Die Kopplung weiterer chemischer oder biologischer Komponenten auf ihrer Oberfläche kann zu einer zielgerichteten Beweglichkeit der NP durch den Körper genutzt werden [27]. Mit Blick auf die vorgestellte Amyloid-Hypothese und die periphere Sinkhypothese bei der Alzheimerschen Demenz (1.2), können NP als funktionalisierte Transportsysteme in der Peripherie eingesetzt werden, um eine Reduktion der A β -Peptidkonzentration im peripheren Kreislauf mittels der Aktivierung phagozytotischer Prozesse zu erreichen. Darüber hinaus ist auch bekannt, dass es eine Reihe von NP gibt, die die Bluthirnschranke überwinden können und auch im Hirn eine Aktivierung der mikroglialen Phagozytose induzieren können und es direkt im Hirn zu einer A β -Konzentrationsreduktion kommt [28].

1 | Einleitung

Neben den Vorteilen, die der Einsatz von NP in der Biomedizin als Transportsysteme mit sich bringt, verschärft sich gleichzeitig die Frage nach deren Toxizität, besonders im Hinblick auf Langzeitfolgen von Akkumulationsprozessen im menschlichen Körper. Die Verwendung von proteinbasierten NP (z.B. Albumine, Gelatine) umgeht in weiten Teilen diese Problematik. Auf humanem Serumalbumin basierende NP sind bereits heute in klinischer Anwendung (Albunex, Abraxane) und weisen eine hohe humanbiologische Toleranz auf, die in direktem Zusammenhang mit ihrer im menschlichen Körper ablaufenden Biodegradation steht. Die albuminbasierten NP selbst, als auch ihre Abbauprodukte, rufen keine toxischen Wirkungen hervor und sind nicht immunogen. Darüber hinaus sind sie im industriellen Maßstab mit hoher Reinheit herstellbar und ermöglichen aufgrund ihrer definierten Struktur und dem hohen Anteil an geladenen Aminosäureresten eine Vielzahl verschiedener Ligandenmodifikationen. Über den Einsatz der NP in der Biomedizin hinaus, finden sie auch im Bereich der Proteinbiochemie Anwendung. Dabei ermöglicht die Anwesenheit von NP in Proteinlösungen die Stabilisierung dieser und damit eine längere Lagerungsdauer. Darüber hinaus können sie entweder als Aggregationsinhibitor oder -induktor fungieren, je nach ihren eigenen Charakteristika oder der der Proteine [29]. Umgekehrt können sie aber auch zur Resolubilisierung und Rückfaltung von Proteinen, z.B. aus ihrer Lagerungskonformation als Amyloid, eingesetzt werden [30].

1.5 Multimodale Anwendung der Analytischen Ultrazentrifugation

Grundlage der quantitativen Analyse von Makromolekülen in der Analytischen Ultrazentrifugation (AUZ) ist deren Sedimentationsverhalten, das von deren hydrodynamischen Eigenschaften, wie Größe bzw. Masse, Form und Dichte abhängt. Es handelt sich um eine in einem Einphasensystem ablaufende Absolutmethode, ohne Beteiligung von Matrixwechselwirkungen, da die Analyse vollständig im gewählten Lösungsmittel abläuft und die zu analysierenden Partikel zu Beginn der Messung homogenverteilt in Lösung vorliegen [31]. Im Vergleich zu anderen Methoden, weist die AUZ eine hohe Sensitivität mit einer gleichzeitigen Speziesauflösung im Angströmbereich auf [32]. Der Einsatz des Fluoreszenzdetektionssystems erlaubt dabei die Analyse von Makromolekülen im nanomolaren Konzentrationsbereich und darunter [33]. Neben einer sehr hohen Auflösung, ermöglicht es die AUZ wie keine andere in Lösung ablaufende Messmethode einen Molekulargewichtsbereich von einigen Hundert bis zu mehreren Hundertmillionen Dalton der zu analysierenden Partikel abzudecken. Dabei müssen die zu analysierenden Partikel drei grundsätzliche Voraussetzungen erfüllen. Sie müssen optisch detektierbar sein bzw. sich in einem Partikelgemisch optisch von anderen Bestandteilen unterscheiden lassen. Sie müssen eine chemische Kompatibilität mit den Messzellenbestandteilen und den Detektionssystemen aufweisen und im minimal bzw. maximal erzeugbaren Gravitationsfeld ein ausreichendes Bewegungsverhalten aufweisen.

1 | Einleitung

Dabei können neben Sedimentations- auch Flotationsprozesse qualitativ und quantitativ analysiert werden [34]. Diese grundsätzlichen Eigenschaften der AUZ ermöglichen es umfangreiche Analysen von Makromolekülen in Lösung durchzuführen. Dabei ermöglicht die AUZ die Analyse von biologischen Makromolekülen in deren nativem Zustand, unter gleichzeitig biologisch relevanten Bedingungen und kann Informationen über deren Sedimentationskoeffizienten, Masse, Form, Diffusionskoeffizienten und Dichte liefern. Die Charakterisierung von Partikelmischungen und darin ablaufenden Interaktionsprozessen sind ebenfalls möglich. Im Gegensatz zu anderen häufig genutzten biophysikalischen Methoden zur Analyse von Proteininteraktionen, ermöglicht die AUZ auch die Untersuchung von Homooligomerisationsprozessen [35]. Im Bereich der Nanopartikelanalyse findet sie sowohl bei der Analyse von organischen, als auch anorganischen, NP Anwendung und kann aufgrund ihrer Sensitivität bezüglich der hydrodynamischen Eigenschaften der zu analysierenden Partikel, zur Bestimmung der Dichte und damit verbunden zur Untersuchung der Oberflächenbeschaffenheit dieser angewendet werden. Darüber hinaus ermöglicht sie auch hier die Untersuchung von Agglomerations- bzw. Zerfallsprozessen, der Probenhomogenität, die Analyse des Schwellungsgrades der Partikel und damit verbunden den osmotischen Druck und den Schwellungsdruck in Lösung auf die Partikel [36].

1.6 Ziele der Arbeit

Basierend auf den breiten Anwendungsmöglichkeiten der Analytischen Ultrazentrifugation und den vorhandenen Absorptions- und Fluoreszenzdetektionssystemen, wurde in dieser Arbeit sowohl im Bereich der Proteinanalytik, als auch im Bereich der Nanopartikelanalyse gearbeitet.

Dabei bestanden die Ziele im Bereich der Nanopartikelanalyse darin, grundlegend ein Vorgehen zur Charakterisierung der Größenverteilung und Homogenität von NP in Lösung mittels der Analytischen Ultrazentrifugation zu etablieren. Dafür sollten verschiedene Zentrifugations- und Lösungsmittelbedingungen auf ihre Eignung hin untersucht werden. Darauf aufbauend sollen Aussagen bezüglich der Qualität und Stabilität der Größenverteilungen von Nanopartikelpräparationen ermöglicht werden. Außerdem sollte ein Quantifizierungsverfahren standardisiert werden, das exakte Aussagen über den Umfang von Oberflächenmodifikationen von NP mit Liganden, basierend auf einer vorangegangenen erfolgreichen Größencharakterisierung in der AUZ, ermöglicht. Für diese Verfahrensetablierung sollte, bezüglich der Qualität und Stabilität der Größenverteilungen, ein geeignetes Nanopartikelmodell gewählt werden und dieses vorab ohne Oberflächenmodifikationen durch Liganden charakterisiert werden. Im darauffolgenden Schritt sollten die Wahl geeigneter Ligandenmodelle und die finale Quantifizierung der Oberflächenmodifikationen des gewählten Nanopartikelmodells mit den Liganden erfolgen.

1 | Einleitung

Im Bereich der Proteinanalytik standen Protein-Ligandenwechselwirkungen im Fokus dieser Arbeit. Auf Basis vorangegangener Studien mit anderen biophysikalischen Methoden, sollte erstmals mittels der Analytischen Ultrazentrifugation, als Absolutmethode, frei in Lösung eine A β 42-Monomerbindung durch Spiegelbild-Phagen-Display-selektierte D-Peptide nachgewiesen werden. Ziel war es dabei mittels der Anwendung des Fluoreszenzdetektionssystems und eines durchzuführenden Optimierungsprozesses bezüglich der Zentrifugations- und Lösungsmittelbedingungen, einen Bindungsnachweis bis in den mikromolaren Bereich der Interaktionspartner nachzuweisen.

2 Materialien

2.1 Puffer

10 mM Natriumphosphat-Puffer in H₂O, pH 7,4 (10 mM NaP_i)

8,1 mM Na₂HPO₄

1,9 mM NaH₂PO₄

50 mM Natriumphosphat-Puffer in H₂O, pH 7,4 (50 mM NaP_i)

40,5 mM Na₂HPO₄

9,5 mM NaH₂PO₄

Dulbecco's PBS in H₂O, pH 7,4 (PBS)

2,7 mM KCl

1,5 mM KH₂PO₄

136,9 mM NaCl

8,1 mM Na₂HPO₄ (wasserfrei)

10 mM HEPES-Puffer, 0,01 % Tween 20 in H₂O, pH 7,4 mit 0 – 500 mM NaCl

Tabelle 2.1: SEDNTERP berechnete Fitparameter für 10 mM HEPES, 0,01 % Tween 20, pH 7,4 mit 0 - 500 mM NaCl bei 30 °C.

NaCl-Konzentration (mM)	Dichte (g/cm ³)	Viskosität (cPoise)
0	0,99645	0,8043
50	0,99854	0,8088
137	1,0021	0,8149
300	1,0087	0,8267
500	1,0168	0,8417

2 | Materialien

Tabelle 2.2: SEDNTERP berechnete Fitparameter für die genutzten Puffer bei pH 7,4.

Puffer	Temperatur (°C)	Dichte (g/cm ³)	Viskosität (cPoise)
10 mM NaP _i	10	1,0011	1,311
10 mM NaP _i	20	0,9996	1,005
50 mM NaP _i	20	1,0048	1,026
PBS	20	1,0053	1,019
10 mM HEPES, 137 mM NaCl, 0,01 % Tween 20	20	1,0047	1,023
10 mM HEPES, 137 mM NaCl, 0,01 % Tween 20	10	1,0062	1,33

2.2 Chemikalien

Wasser (pyrogen- und nukleasefrei, Reinstwasser Typ I) aus Milli-Q Advantage Wasseraufbereitungssystem

Natriumlaurylsulfat (Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland)

Goldnanopartikel - 5 nm Durchmesser, stabilisiert in 0,1 mM PBS (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Goldnanopartikel - 10 nm Durchmesser, stabilisiert in 0,1 mM PBS (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Guanidiniumhydrochlorid, > 99,5 % (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Propan-2-ol 99,96 % (Fisher Chemical, Loughborough, UK)

1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-isopropanol, > 99 % (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

2.3 Proteine

Amyloid-β 42 (Aβ42) (Bachem, Weil am Rhein, Deutschland)

FITC-β-Ala-Amyloid-β 42 (FITC-Aβ42) (Bachem, Weil am Rhein, Deutschland)

Bovines Serumalbumin > 98 % (BSA) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

D3 - rprtrlhthrr (peptides&elephants, Potsdam, Deutschland)

D3-Dy405 - rprtrlhthrr-c(Dy405)-NH₂ (peptides&elephants, Potsdam, Deutschland)

FITC-D3 - rprtrlhthrr-Lys(FAM)-NH₂ (JPT Peptide Technologies, Berlin, Deutschland)

Humanes Serumalbumin, fettsäurefrei und globulinfrei (HSA) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Tabelle 2.3: SEDNTERP berechnete Fitparameter für die untersuchten Proteine bzw. Proteinkomplexe.

Proteine/ Proteinkomplexe	Temperatur (°C)	partiell spezifische Volumen (cm ³ /g)	Dichte (g/cm ³)
D3	20	0,705	1,418
Aβ42	10	0,734	1,362
Aβ42	20	0,7382	1,355
Aβ42-D3	20	0,7317	1,367
BSA	10	0,7245	1,38
BSA	20	0,7287	1,372
Aβ42-BSA	20	0,7296	1,371

2.4 Geräte

Beckman Optima XL-A Analytische Ultrazentrifuge (Beckman Coulter, Indianapolis, USA)

Beckman ProteomLab XL-A Analytische Ultrazentrifuge (Beckman Coulter, Indianapolis, USA)

Fluoreszenzdetektionssystem für Analytische Ultrazentrifuge (Aviv Biomedical Inc., Lakewood, USA)

Rotor für Analytische Ultrazentrifuge AnTi50 (8-Loch) (Beckman Coulter, Indianapolis, USA)

Rotor für Analytische Ultrazentrifuge AnTi60 (4-Loch) (Beckman Coulter, Indianapolis, USA)

Messzellen für Analytische Ultrazentrifuge Aluminium mit 12-mm-Doppelsektormittelstücken (Beckman Coulter, Indianapolis, USA)

Messzellen für Analytische Ultrazentrifuge Titan mit 3-mm- Doppelsektormittelstücken (Nanolytics, Potsdam, Germany)

Milli-Q Advantage Wasseraufbereitungssystem mit BioPak Endfilter (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Eppendorf-Pipetten (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland)

Eppendorf-Spitzen (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland)

Eppendorf-Gefäße, Protein LoBind (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland)

Konische Pfeifenreiniger mit Bürste (Blitz System, Schweiz)

HETOVAC VR-1 Rotorkammer mit CT 110 Kühlfalle (Heto Lab Equipment, Alleröd, Dänemark) und Pumpsystem Pfeifer Balzers PK D20 704 A1P9984A (Deutschland)

2 | Materialien

2.5 Software

SEDANAL Version v5.85.5229 (<http://www.sedanal.org/>)

SEDFIT Version 144d (<http://www.analyticalultracentrifugation.com/default.htm>)

SEDNTERP Version 20111201BETA (http://bitcwiki.sr.unh.edu/index.php/Main_Page)

GUSSE Version 1.0.8d (<http://biophysics.swmed.edu/MBR/software.html>)

UltraScan II Version 9.9 (<http://www.ultrascan.uthscsa.edu/>)

UltraScan III Version 3.3 (<http://www.ultrascan3.uthscsa.edu/>)

3 Methoden

3.1 A β 42 - Probenherstellung

Die in Festphasensynthese hergestellten und sich in Gegenwart von Trifluoroacetatsalz befindlichen A β 42 – Peptide wurden in Form von jeweils 1 mg Trockensubstanz von dem Hersteller Bachem erhalten. Zur Vorbereitung der damit durchgeführten Experimente wurde das Peptid aliquotiert. Basis dafür war die Lösung von je 1 mg Trockensubstanz in 700 μ l 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-isopropanol (HFIP) mit einer anschließenden über Nacht Inkubation bei Raumtemperatur in einem fest verschlossenen Gefäß zur Vermeidung der HFIP-Verdunstung, um eine möglichst vollständige Monomerisierung des Ausgangsmaterials sicher zu stellen. Am darauffolgenden Tag wurden die Peptidlösungen auf Eis und bei 4 °C für 1 h heruntergekühlt, um eine Verdunstung des stark flüchtigen HFIP während der Pipettierschritte zu minimieren. Die Aliquotierung erfolgte in Protein-LoBind 1,5 ml Eppendorfgefäße. Die anschließende Lyophilisation wurde in der HETOVAC VR-1 Rotorkammer mit einer CT 110 Kühlfalle durchgeführt. Die Lagerung der Aliquots nach der Lyophilisation erfolgte bei – 80 °C. Im Fall des FITC-A β 42 wurde, aufgrund der geringen notwendigen Peptidmenge je Experiment, eine Mehrfachaliquotierung der 1 mg Trockensubstanz durchgeführt. Die Herstellung der final genutzten 0,5 μ g Aliquots erfolgte aus einer 25 μ g/ml Peptidlösung. Die Lagerung der Aliquots nach der Lyophilisation erfolgte bei – 20 °C.

3.2 Analytische Ultrazentrifugation

Bei der Analytischen Ultrazentrifugation handelt es sich um eine Analysemethode, die es auf Grundlage der optischen Detektion sich in einem Zentrifugalfeld in Lösung befindlicher Partikel ermöglicht, physikalische Eigenschaften dieser zu bestimmen. Zu dem kann eine exakte Bestimmung des Molekulargewichts eines Partikels durchgeführt werden [31]. Dabei wird der Zentrifugationsprozess solange durchgeführt bis sich die Sedimentation des Partikels und seine Rückdiffusion im Gleichgewicht befinden und es zu keiner Nettobewegung der Partikel mehr kommt. In der Regel werden solche Gleichgewichtsläufe bei deutlich geringeren Drehzahlen durchgeführt als die Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe, die der reinen Bestimmung des *s*-Werts dienen und nehmen von daher sehr viel Zeit in Anspruch. Ebenfalls kann mit selbstformenden Dichtegradientenmaterialien ein Dichtegradientenlauf in der AUZ zur Bestimmung der Schwebedichte von Makromolekülen durchgeführt werden. Da in dieser Arbeit weder Molekulargewichtsläufe noch Dichtegradientenläufe durchgeführt wurden, wird auf eine detaillierte Erläuterung der mathematischen Zusammenhänge verzichtet.

3.2.1 Technische Grundlagen

Für die technische Durchführung eines AUZ-Experiments ist ein spezieller instrumenteller Aufbau erforderlich. Neben den klassischen Bestandteilen einer Zentrifuge, müssen eine optische Detektionseinheit und spezielle Messzellen vorhanden sein, die es während des Zentrifugationsprozesses ermöglichen, die Sedimentation der Partikel zu detektieren. Technisch wird dies durch zwei Komponenten umgesetzt. Zum einen Messzellen, die das Probevolumen von zwei Seiten mit Fenstern umschließen, so dass eine ungehinderte Aus- bzw. Durchleuchtung der Probe ermöglicht wird. Zum anderen eine in der Rotorkammer installierbare Optik, die räumlich ober- bzw. unterhalb des Rotors angeordnet ist. Die Messzellen bestehen, neben den beiden Fenstern, aus einem Mittelstück, in dem sich die Proben befinden und von den beiden Fenstern nach oben und unten verschlossen werden. Die Fenster sind sowohl aus Saphir- als auch aus Quarzglas zu erhalten. Die Mittelstücke können, entsprechend des durchzuführenden Experiments, eine variable Anzahl an Probensektoren enthalten und u.a. aus Aluminium, Titan oder Epon gefertigt sein. Entsprechend der Sektorenanzahl variiert deren Geometrie und Schichtdicke, die hier 3 mm oder 12 mm betrug. In Kombination mit der im Folgenden erläuterten Absorptionsoptik wurden ausschließlich 12 mm Aluminiummittelstücke mit zwei Probensektoren und Quarzfenstern verwendet. Der sektorförmige Schnitt der Probenkammern dient dazu, eine konvektionsfreie Sedimentation der Partikel entlang des Rotorradius zu gewährleisten (3.2.2). Aufgrund der geringeren Sensitivität der Absorptionsdetektion, im Vergleich zu der Fluoreszenzdetektion, musste in dieser Arbeit mit 12 mm Mittelstücken gearbeitet werden, da diese ein bis zu 4-fach größeres Probevolumen fassen können. Entsprechend dem Aufbau eines klassischen Zweistrahlphotometers wurden immer ein Sektor mit der Referenzlösung und ein Sektor mit der Probe gefüllt. Für die Experimente mit dem Fluoreszenzdetektionssystem wurden 3 mm Titanmittelstücke und Quarzfenstern verwendet. Da bei einer Fluoreszenzmessung kein Referenzsektor benötigt wird, können für die Arbeiten mit der FDS-UZ beide Sektoren mit unterschiedlichen Proben gefüllt werden. Nach der Befüllung und dem Verschluss der Zellen, ist eine exakte Ausrichtung der Messzellen im Rotor von Bedeutung. Diese müssen mit ihrer horizontalen Achse in exakter Übereinstimmung mit dem Rotorradius ausgerichtet sein, so dass Konvektionseffekte während der Zentrifugation ausgeschlossen werden können. Abbildung 3.2.1.1 veranschaulicht den Aufbau einer UZ mit einer Absorptionsoptik, bei der über einen Monochromator Licht von oben in die Messzellen eingestrahlt wird, das Licht die Messzelle durchquert und im unteren Bereich der Rotorkammer auf ein Abbildungssystem mit Spaltblende und Photomultiplier trifft. Die Lichtquelle in Form einer Xenonblitzlichtlampe befindet sich ebenfalls unterhalb der Rotorkammer und kann Licht in einem Wellenlängenbereich zwischen 190 – 800 nm emittieren.

3 | Methoden

Der sich oberhalb des Rotors befindliche Monochromator dient dazu, Licht einer zuvor definierten Wellenlänge zwischen 200 – 800 nm auszuwählen und dieses in die Probe einzustrahlen. Die im Abbildungssystem befindliche 25 µm breite Spaltblende [37] ermöglicht mit einer Genauigkeit von 5 µm entlang des Rotorradius das Ausschneiden einer Sektorfläche, um mittels des Photomultipliers orts aufgelöst die Absorption der Probe zu detektieren und so die noch folgend erläuterten Sedimentationsprofile zu erhalten (3.2.2). Als physikalisches Grundprinzip dient, wie bei einer klassischen Absorptionsmessung, das Lambert Beer'sche Gesetz. Für eine korrekte Auswertung der Messdaten muss die gemessene Absorption zwischen 0,1 und 1,2 OD liegen, damit ein linearer Zusammenhang zwischen Absorption und Konzentration gewährleistet ist. Faktoren, die die Signalintensität am Detektor beeinflussen sind, neben der Lampenintensität bei der gewählten Wellenlänge, auch die Eigenabsorption des gewählten Lösungsmittels, in denen sich die Partikel befinden, wie auch der Extinktionskoeffizient der Partikel selbst. In allen Messungen, in denen mit Nanopartikeln gearbeitet wurde, wurde die radiale Auflösung der Spaltblende auf 50 µm festgelegt, um im Vergleich zu den mit Proteinen durchgeführten Experimenten mit 30 µm Auflösung, weniger Zeit pro aufgenommenem Konzentrationsprofil und Zelle zu benötigen.

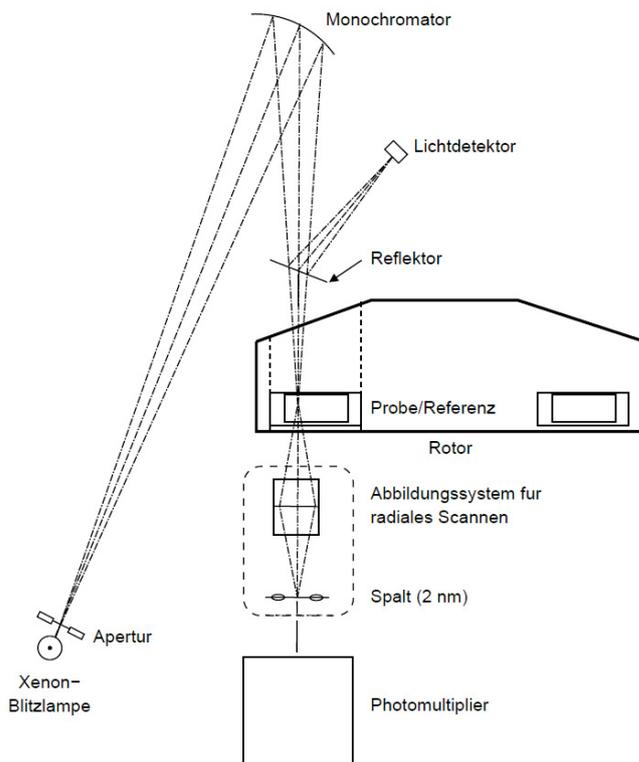


Abbildung 3.2.1.1: Schematischer Aufbau einer mit einer Absorptionsoptik ausgestatteten UZ. Veranschaulicht wird der Strahlengang von der Xenonblitzlichtlampe, über den Monochromator, den Probendurchtritt bis auf das Abbildungssystem mit dem Photomultiplier.

3 | Methoden

Im Fall des Fluoreszenzdetektionssystems befindet sich die komplette optische Detektionseinheit, schematisch in Abbildung 3.2.1.2 dargestellt, oberhalb des Rotors und wird durch einen Schrittmotor mit einer Auflösung von 20 μm in radialer Richtung über den Rotor bewegt. Diese Bewegung beansprucht etwa 1,5 min und stellt damit den limitierenden Faktor für die maximal mögliche Anzahl an registrierbaren Konzentrationsprofilen pro Zeiteinheit dar. Bei einer kompletten radialen Bewegung der Detektionseinheit vom Rotormittelpunkt zur Rotorflanke erfolgt eine komplette Aufnahme aller Probensektoren. Der Laser emittiert Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm, das über eine Reihe von Spiegeln und letztlich die Fokuslinse auf einen 10 μm großen Lichtpunkt innerhalb der Probe, kurz unterhalb des Fensters fokussiert wird. Zur optimalen Fluoreszenzmessung kann diese Fokuslinse global für den kompletten Rotor über einen Schrittmotor in der Höheneinstellung variiert werden. Darüber hinaus kann für jede Messzelle eine individuelle Einstellung des Signalverstärkungsfaktors am Detektor vorgenommen werden. Das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht wird über einen dichroiden Spiegel und einen Cut-Off-Filter von 505 nm auf den Detektor projiziert. Im Gegensatz zur Absorptionsoptik erfolgt bei einem Detektionsvorgang, an einer radialen Position, eine komplette 360° Aufnahme des Rotors. Dies erfolgt mit fünf Wiederholungen je radialer Position, deren Mittelung das letztendlich vom System abgespeicherte Fluoreszenzsignal darstellt.

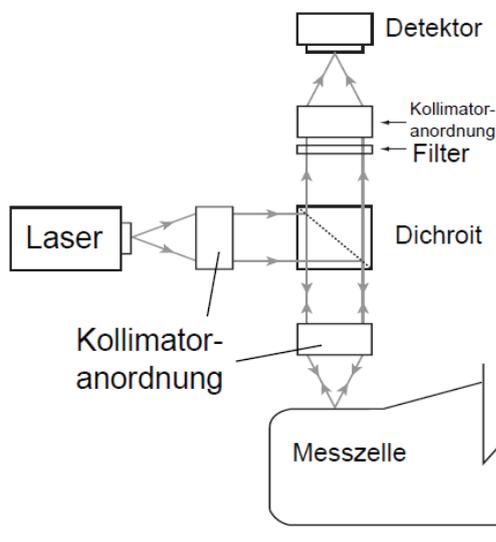


Abbildung 3.2.1.2: Schematischer Aufbau des Fluoreszenzdetektionssystems mit Laser und Detektor.

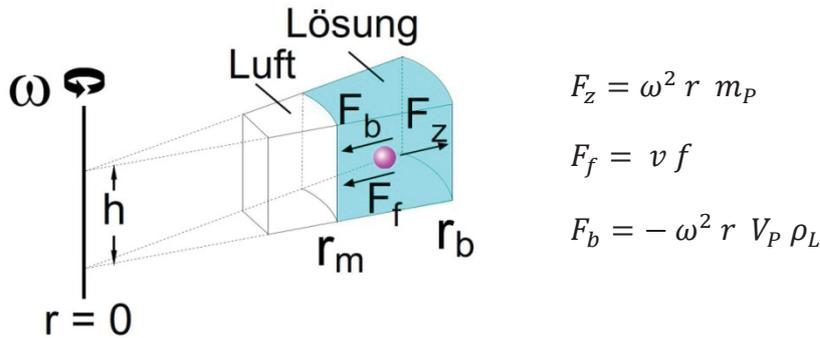
Neben der korrekten technischen Handhabung der Messzellen und der Detektionsoptiken, ist die Sauberkeit der einzelnen Messzellbestandteile von großer Bedeutung. Verunreinigungen entlang der Sektorwände können zu Konvektionen während des Sedimentationsprozesses und so zu nicht idealem Sedimentationsverhalten führen.

3 | Methoden

Eine Verunreinigung der Fenster mit daran anhaftenden Fluorophoren in der FDS-UZ führt zu Artefakten bei der Fluoreszenzdetektion, was zu nicht auswertbaren Sedimentationsprofilen führen kann. Das Fluoreszenzlicht der fluoreszierenden Verunreinigungen kann zu einer Überlagerung der Fluoreszenz des Probenfluorophors führen bzw. unspezifisches, hohes Rauschen der Messdaten erzeugen. Zudem besteht die Gefahr, dass sich Verunreinigungen während der Zentrifugation lösen und beginnen mit zu sedimentieren. Um derartige Artefakte zu verhindern, wurde speziell bei den in der FDS-UZ genutzten 3 mm Titanmittelstücken und den dazugehörigen Fenstern eine intensive Reinigung durchgeführt. Nach der Probenentnahme und der Zerlegung der Messzellen in ihre Einzelteile erfolgten zwei jeweils 45-minütige Inkubationen der Fenster und der Mittelstücke, jeweils separat in einem 50 ml Kunststoffgefäß. Die erste Inkubation erfolgte in 6 M Guanidiniumhydrochlorid, um noch eventuell anhaftende Reste fluoreszenzmarkierten Proteins zu entfernen. Danach folgten eine Spülung der Bestandteile unter fließendem Wasser und anschließend eine zweite Inkubation mit 2-prozentiger Natriumlaurylsulfatlösung. Am Ende der Natriumlaurylsulfatinkubation wurden die noch mit der Lösung benetzten Mittelstücke unter sanftem Druck mit konischen Pfeifenreinigern abgerieben, um eine mechanische Ablösung noch anhaftender Partikel zu erreichen. Es folgte eine letzte Spülung mit Wasser und, zwecks einer effizienteren Trocknung der Bestandteile, ein Abspülen mit einer unverdünnten Propan-2-ollösung. Bei Aluminiummittelstücken erfolgte lediglich die zweite Inkubation mit der 2-prozentigen Natriumlaurylsulfatlösung und dem anschließenden Reinigungsverfahren, da diese Mittelstücke nicht für Fluoreszenzmessungen genutzt wurden und auf Grund der Gefahr der Korrosion des Aluminiums nicht für die Reinigung mit Guanidiniumhydrochlorid geeignet sind.

3.2.2 Physikalische Grundlagen

Wie bereits kurz beschrieben, ermöglicht es die AUZ physikalische Parameter sich frei in Lösung befindlicher Partikel zu bestimmen. Technische Grundlage dessen ist die unter 3.2.1 erläuterte optische Detektion der sich bewegenden Partikel. Es handelt sich um eine in einem Einphasensystem ablaufende Absolutmethode, wobei die Auftrennung der Partikel auf Basis ihres Sedimentationsverhaltens in einer zu Beginn der Zentrifugation homogenverteilten Lösung erfolgt. Die potentielle Wechselwirkung mit fluiden Matrizen ist somit ausgeschlossen [31]. Abbildung 3.2.2.1 veranschaulicht die während einer Zentrifugation auf einen Partikel wirkenden Kräfte. Während der Zentrifugation wirkt auf jedes Teilchen die Zentrifugalkraft (F_z), die stets von der Rotorachse nach außen wirkt und eine Bewegung des Teilchens Richtung Zellboden bewirkt. Es besteht ein proportionaler Zusammenhang zwischen der Zentrifugalkraft, der Entfernung des Partikels von der Rotorachse (r), dessen Masse (m_p) und der Winkelgeschwindigkeit des Rotors (ω).



$$F_z = \omega^2 r m_p$$

$$F_f = v f$$

$$F_b = -\omega^2 r V_p \rho_L$$

Abbildung 3.2.2.1: Schematische Darstellung, der in einem Gravitationsfeld wirkenden Kräfte auf einen sich in Lösung befindenden Partikel. r_m : Radiusposition des Meniskus, r_b : Radiusposition des Bodens, r : Rotorachse, h : Füllhöhe der Lösung, F_z : Zentrifugalkraft, F_f : Reibung, F_b : Auftrieb, ω : Winkelgeschwindigkeit, r : Radius, m_p : Masse Partikel, v : Geschwindigkeit, f : Reibungskoeffizient, V_p : Volumen Partikel, ρ_L : Dichte Lösungsmittel.

Der Beschleunigung, die ein Teilchen durch die Zentrifugalkraft erfährt, wirkt die Reibung (F_f) entgegen. Mit größer werdender Beschleunigung bzw. Zentrifugalkraft, die auf den Partikel wirkt, nimmt gleichzeitig der Reibungswiderstand in Lösung zu. Zurückzuführen ist die Reibung zwischen dem Partikel und dem Lösungsmittel auf die Kohäsion und dem Zusammenstoßen von Partikeln untereinander. Die Reibung ist proportional zur Geschwindigkeit (v) und dem Reibungskoeffizienten (f), wobei der Reibungskoeffizient durch das Stokesche Gesetz beschrieben wird:

$$f = 6 \pi \eta r_H$$

Da es sich bei der Reibung um einen Oberflächeneffekt handelt und eine Kugel den kleinstmöglichen Reibungskoeffizienten f_0 aufweist, werden alle anderen Formen als Verhältnis von f/f_0 dargestellt. Damit erfolgt eine Normierung, die einen Vergleich der Form von Makromolekülen erlaubt, die unabhängig von der Masse jedes einzelnen Makromoleküls ist. Es besteht ein proportionaler Zusammenhang zwischen dem hydrodynamischen Radius des Partikels (r_H) und der Viskosität des Lösungsmittels (η). Als dritte Kraft wirkt der Auftrieb (F_b). Dieser entspricht der Gewichtskraft des durch den Partikel verdrängten Lösungsmittels, wobei das Produkt aus dem Volumen des Partikels (V_p) und der Dichte des Lösungsmittels (ρ_L) die Masse (m_L) des verdrängten Lösungsmittels darstellt [31]. Befinden sich Zentrifugalkraft, Reibung und Auftrieb im Gleichgewicht stellt sich eine konstante Geschwindigkeit ein, mit der sich der Partikel im Zentrifugalfeld bewegt. Dieser Gleichgewichtszustand wird bereits wenige Mikrosekunden nach Beginn der Zentrifugation erreicht. Resultiert aus der Summe der drei Kräfte eine positive Kraft so erfolgt eine Sedimentation Richtung Zellboden. Bei einer negativen Kraft kommt es zu einer Flotation Richtung Meniskus der Probelösung. In beiden Fällen lässt sich die Mobilität der untersuchten Partikel unter dem Einfluss der Zentrifugalkraft mithilfe des s -Werts oder Sedimentationskoeffizientens charakterisieren, der durch die Svedberg-Gleichung [38] beschrieben wird und die Einheit Svedberg, $1 \text{ S} = 10^{-13}$ Sekunden hat:

$$s = \frac{v}{\omega^2 r} = \frac{m_p (1 - \bar{v}_p \rho_L)}{f}$$

Der Sedimentationskoeffizient s steht im proportionalen Zusammenhang mit der auftriebskorrigierten Masse des sedimentierenden Partikels und im antiproportionalen Zusammenhang mit dem Reibungskoeffizienten f . Die auftriebskorrigierte Masse des sedimentierenden Partikels setzt sich aus dem Produkt der Masse des Partikels (m_p) und einem von der Dichte des Lösungsmittels (ρ_L) und dem partiell spezifischen Volumen des Partikels (\bar{v}_p) abhängigen Faktor zusammen [31]. Während des Zentrifugationsprozesses wird in der Probe entlang des Rotorradius in regelmäßigen Zeitintervallen ein ortsauflösendes Konzentrationsprofil gemessen und damit die Sedimentation der Partikel aufgezeichnet.

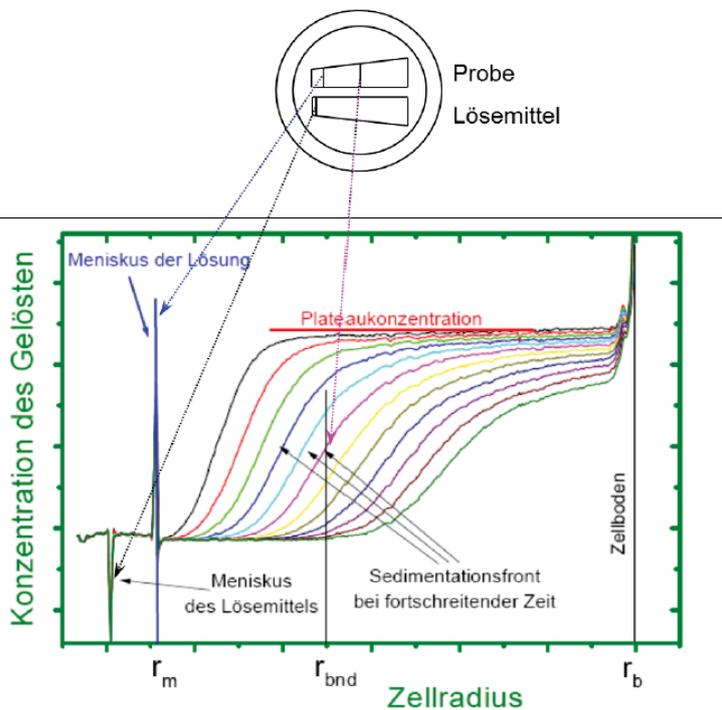


Abbildung 3.2.2.2: Schematische Darstellung eines Sedimentationsgeschwindigkeitslaufes. Die Sedimentationsfronten bewegen sich mit zunehmender Zeit Richtung Zellboden. Durch die radiale Verdünnung nimmt die Konzentration im Plateau ab. r_m : Radius Meniskus, r_{bnd} : Wendepunkt der Sedimentationsfront, r_b : Radius des Boden.

Abbildung 3.2.2.2 veranschaulicht den Sedimentationsprozess eines Partikels während eines Sedimentationsgeschwindigkeitslaufes. Bei jeder Messung wird die Absorption der sich im Probensektor befindlichen Partikel, im Vergleich zu einer Referenzlösung, in Abhängigkeit vom Abstand zur Rotorachse gemessen. Die zu Beginn der Messung gleichmäßig verteilten Partikel beginnen zu sedimentieren und wandern in Abhängigkeit von der Rotorgeschwindigkeit Richtung Zellboden. Die unterschiedlichen Detektionszeitpunkte sind durch die unterschiedliche farbige Markierung der gemessenen Konzentrationsprofile gekennzeichnet.

3 | Methoden

Mit zunehmender Sedimentationszeit und der Bewegung der Sedimentationsfront durch die Probenkammer kommt es zu einem Verdünnungseffekt, der daran zu erkennen ist, dass die Konzentration des untersuchten Partikels im Plateau kontinuierlich abnimmt (radiale Verdünnung). Dies ist auf die sektorförmigen Schnitte der Probenkammern zurückzuführen. Die sektorförmige Form der beiden Kammern in der Messzelle (Abbildung 3.2.2.2 oben) dient der konvektionsfreien Bewegung der Teilchen entlang des Radius des Rotors. Neben den in Abbildung 3.2.2.1 beschriebenen Kräften, die während einer Zentrifugation auf die sedimentierenden Partikel wirken, spielen ungerichtete und gerichtete Diffusionsprozesse der Partikel im Lösungsmittel eine Rolle. Bei den ungerichteten Diffusionsprozessen handelt es sich um Brownsche Molekularbewegungen. Die gerichtete Diffusion ist auf das sich während der Zentrifugation ausbildende Konzentrationsgefälle der sedimentierenden Partikel zurückzuführen. Diese Diffusionsprozesse bewirken eine Verbreiterung der Sedimentationsfronten während der Zentrifugation, was in Abbildung 3.2.2.2 in Form der sigmoidalen Kurven zu erkennen ist. Ohne diese Diffusionsprozesse wären keine sigmoidalen Verläufe zu erwarten, sondern klare senkrechte Sedimentationsfronten. Die vollständige mathematische Beschreibung der Sedimentation eines Partikels frei in Lösung durch die Lamm-Gleichung setzt sich somit aus der gerichteten Bewegung des Partikels im Zentrifugalfeld und der daraus resultierenden Diffusion zusammen [39]. Die Lamm-Gleichung beschreibt die zeitliche (dt) Konzentrationsänderung (dc) eines in einer sektorförmigen Messzelle sedimentierenden Partikels in Abhängigkeit von dessen Abstand zur Rotorachse (r) und der Winkelgeschwindigkeit (ω) des Rotors.

$$\frac{dc}{dt} = -\frac{1}{r} \frac{d}{dr} \left(s \omega^2 r^2 c - D r \frac{dc}{dr} \right)$$

Die Lösung der Lammschen Differentialgleichung für aufgenommene Messdaten eines Sedimentationsgeschwindigkeitslaufes, softwarebasiert durch einen Fitprozess (3.2.3), bei gegebenen Versuchsbedingungen, führt zum Erhalt des apparenten s -Werts (s_{app}) und zum Diffusionskoeffizienten des sedimentierenden Partikels. Zwecks der Vergleichbarkeit von Ergebnissen erfolgt eine Normierung dieser apparenten s -Werte auf definierte Standardbedingungen von Wasser als Lösungsmittel und 20 °C als Temperatur ($s_{20,w}$ -Wert). Neben den dem Partikel intrinsischen Eigenschaften, hängt das apparente Sedimentationsverhalten direkt mit den gegebenen Lösungsmitelegenschaften zusammen. Es muss von daher eine Korrektur der apparenten Dichte ($\rho_{T,L}$) und Viskosität ($\eta_{T,L}$) des Lösungsmittels auf diese Standardbedingungen erfolgen ($\eta_{20,w}, \rho_{20,w}$) [31].

$$s_{20,w} = s_{T,L} \frac{\eta_{T,L}}{\eta_{20,w}} \frac{(1 - \bar{v} \rho_{20,w})}{(1 - \bar{v} \rho_{T,L})}$$

3 | Methoden

Mithilfe eines Sedimentationsgeschwindigkeitslaufes kann nicht nur der Sedimentationskoeffizient eines Partikels, seine Form und sein Diffusionskoeffizient bestimmt werden, sondern es können auch Partikelmischungen bezüglich Menge und Art der vorhandenen Partikelspezies charakterisiert werden. Außerdem lassen sich Assoziationskonstanten bestehender Reaktionsgleichgewichte bestimmen. Da die Sedimentation zweier Interaktionspartner immer in Gegenwart des jeweilig anderen erfolgt und beide Interaktionspartner zu Beginn der Messung homogen verteilt vorliegen, können schnelle Interaktionen analysiert werden, da es im Verlauf der Sedimentation nicht zu einem Zerfall eines Komplexes bzw. Dissoziation aufgrund von Wechselwirkungen mit einer Matrix und einer daraus resultierenden Abtrennung einer sich neugebildeten Spezies oder eines der Interaktionspartner kommt.

3.2.3 Softwarebasierte Datenauswertung

Die während eines AUZ-Experiments aufgenommenen Daten werden softwarebasiert ausgewertet. Elektronische Messdaten enthalten immer auch nicht probenspezifische Signale bzw. technische Artefakte, die als Rauschen oder „Noise“ zusammengefasst werden und die Auswertbarkeit der Messdaten beeinträchtigen können. Zum Rauschen tragen z.B. die Dunkelzählrate von spannungsgesteuerten Photomultipliern oder Verunreinigungen der Messaufbauten bei. Bei der Bestimmung des Rauschanteils der gemessenen Signale wird zwischen zeitunabhängigem Rauschen („time invariant“ oder Ti-Noise) und radialunabhängigem Rauschen („radial invariant“ oder Ri-Noise) unterschieden. Bei zeitunabhängigem Rauschen handelt es sich um unspezifische Signale, die in Abhängigkeit von der radialen Position auftreten, aber allen Sedimentationsfronten zugrunde liegen, z.B. Kratzer in den Messzellenfenstern. Bei radialunabhängigem Rauschen handelt es sich in der Regel um elektronisches Rauschen. Beide Arten von Rauschen können per Software weitestgehend bestimmt und von den Messdaten subtrahiert werden, wodurch sich das Signal-Rausch-Verhältnis erhöhen lässt.

3.2.3.1 SEDNTERP

Bei SEDNTERP handelt es sich um ein nicht kommerzielles Softwarepaket, mit dessen Hilfe die Parameter Dichte und Viskosität für verschiedene häufig verwendete Lösungsmittel bei der im Experiment verwendeten Temperatur anhand von hinterlegten Tabellen kalkuliert werden können. Das Programm erlaubt außerdem die Berechnung des partiell spezifischen Volumens für Proteine mit bekannter Primärsequenz, ebenfalls in Abhängigkeit von der verwendeten Temperatur. Diese Parameter sind Grundlage für eine korrekte Auswertung und der daran anschließenden Interpretation der Messdaten, insbesondere der Normierung erhaltener Sedimentationskoeffizienten auf Normbedingungen, Lösungsmittel Wasser und 20 °C [40].

Die Viskositätsberechnung einer Gesamtlösung basiert auf der Interpolation von in einer Datenbank hinterlegten Einzelviskositätswerten von monomolekularen Analytlösungen bei 20 °C. Um eine temperaturkorrigierte Viskosität zu berechnen, wird standardmäßig ein Temperaturkorrekturfaktor verwendet, der auf der Annahme basiert, dass das in der Lösung enthaltene Wasser den größten Anteil zur temperaturabhängigen Viskositätsänderung beiträgt. Anzumerken ist, dass die Viskosität eines Lösungsmittels, nicht nur von der Temperatur, sondern auch von den darin gelösten Molekülen abhängt. Entscheidend ist neben deren Konzentration auch deren Asymmetrie. Grundlage für die in der Software implementierte Dichteberechnung ist die Berechnung der Dichte der Lösung bei 20 °C und eine Reihe an tabellierten Werten von Dichten verschiedenkonzentrierter, monomolekularer Analytlösungen. Wie bereits bei der Viskosität gilt auch hier die Annahme, dass die Änderung der Lösungsmitteldichte hauptsächlich durch die Änderung der Dichte des enthaltenen Wassers zu Stande kommt und standardmäßig ein Temperaturkorrekturfaktor verwendet wird. Bei hochmolaren Konzentrationen an gelösten Analyten und alkoholbasierten Lösungen kann dieses Vorgehen jedoch nicht mehr als korrekt angesehen werden. Das partiell spezifische Volumen eines Proteins ist die Volumenänderung, die durch Zugabe eines Gramms Protein zu dem Lösungsmittel erfolgt. Eine experimentelle Bestimmung mit ausreichender Genauigkeit ist aber aufgrund des hohen Proteinverbrauchs nicht praktikabel. Alternativ kann bei bekannter Primärsequenz des Proteins die Berechnung in SEDNTERP durch die Interpolation von Werten des partiell spezifischen Volumens, die bei 25 °C berechnet und auf einen Temperaturbereich von 4 – 45 °C interpoliert werden, erfolgen. Basis dieser Berechnung ist das Molekulargewicht, die Menge und das partiell spezifische Volumen jeder einzelnen Aminosäure, auf deren Grundlage das gesamt partiell spezifische Volumen des Proteins berechnet wird [41]. Die Parameter jeder einzelnen Aminosäure sind tabellarisch in der Datenbank hinterlegt. Im Vergleich zu real gemessenen Werten des partiell spezifischen Volumens kann von einer durchschnittlichen Abweichung von weniger als 1 % ausgegangen werden.

3.2.3.2 SEDANAL

Bei SEDANAL handelt es sich um ein weiteres Softwarepaket zur Analyse von Rohdaten von AUZ-Experimenten. Neben der Analyse von Sedimentationsgeschwindigkeits- und Gleichgewichtsläufen ermöglicht die Software auch die Bestimmung von in homogenen Lösungen ablaufenden chemischen und kinetischen Gleichgewichten. SEDANAL wurde hier für die Auswertung von mehrstufigen Sedimentationsgeschwindigkeitsläufen (MSV-Lauf) mit proteinbasierten Nanopartikeln genutzt. Bei dieser Art von SV-Läufen wird ein Geschwindigkeitsprofil von mehreren direkt aufeinanderfolgenden Zentrifugationsgeschwindigkeiten genutzt, ohne dass es zu einer Unterbrechung oder einer Beendigung der Zentrifugation kommt.

3 | Methoden

Vorteil dieses Verfahrens ist es, dass ein extrem breites Spektrum an Sedimentationskoeffizienten von 1 S bis zu 250.000 S in einem Experiment analysiert werden kann. Entsprechend der gewählten Geschwindigkeit sedimentieren bei niedrigen Drehzahlen zunächst sehr große Partikel, während bei hohen Drehzahlen später die in der Lösung befindlichen, kleineren Komponenten sedimentieren [42, 43]. Die Auswertung der so erhaltenen Messdaten erfolgt global für alle Drehzahlen auf Grundlage einer einzelnen kontinuierlichen Verteilungsfunktion. Mit dieser wird, spezifisch für jede gewählte Sedimentationsgeschwindigkeit und radiale Position, die zeitliche Konzentrationsänderung der unter diesen Bedingungen sedimentierenden Komponente berechnet und daraus eine s -Wertverteilung erhalten, die die komplette Probe widerspiegelt [42]. Mathematisch basiert diese Auswertung eines MSV-Laufs auf der apparenten Verteilungsfunktion $g(s^*)$ und der dc/dt -Methode und liefert eine apparente s -Wertverteilung, gekennzeichnet durch „ s^* “. Dabei gibt die Verteilungsfunktion $g(s^*)$ das Integral unter einer s -Wertverteilung an. Spezifisch für jede radiale Position erfolgt die Subtraktion von kontinuierlich aufeinanderfolgenden Paaren an Konzentrationsprofilen, die die zeitabhängige Konzentrationsänderung der Grenzschicht widerspiegeln. Die daraus resultierenden zeitlichen Konzentrationsdifferenzen (dc/dt) werden gegen den Radius aufgetragen und anschließend durch eine Transformation der Radiusposition in den apparanten s^* -Wert umgewandelt. Bei einer sehr breiten Verteilung erfolgt zwecks der Übersichtlichkeit die logarithmische Skalierung der s -Werte $\ln(s^*)$ [42]. Vorteil dieser Vorgehensweise ist, dass zeitunabhängiges Rauschen von den Messdaten subtrahiert wird. Die Nichtberücksichtigung der Diffusion führt zu einer Verbreiterung der erhaltenen s -Wertverteilung und setzt für eine korrekte Auswertung entweder einen sehr kleinen Sedimentationsbereich, mit ausreichend hoher Dichte an Konzentrationsprofilen voraus, in dem Diffusionsprozesse als vernachlässigbar angesehen werden können oder aber die entsprechende Partikelbeschaffenheit, wie sehr große oder dichte Partikel (z.B. kolloidale Nanopartikel), bei denen Diffusionsprozesse aufgrund der chemisch-physikalischen Eigenschaften als vernachlässigbar klein angesehen werden können [44]. Zusätzlich kann durch Erhöhung der Lösungsmittelviskosität die Diffusion der Partikel eingeschränkt werden. Bei der praktischen Datenauswertung mit der Software erfolgt zunächst im Untermenü „Preprocess centrifuge data“ eine Prozessierung der Messdaten. Im Rahmen der Prozessierung wurden alle radialen Messpunkte der aufgenommenen Konzentrationsprofile einer jeweiligen Geschwindigkeit analysiert und individuell für alle Konzentrationsprofile einer Geschwindigkeit der Meniskus, die Bodenposition und der auszuwertende radiale Bereich für die anschließende Auswertung mit der dc/dt -Methode festgelegt. Die Anzahl der aufgenommenen Konzentrationsprofile je Geschwindigkeit variierte zwischen 20 - 60 global für alle Proben eines AUZ-Laufes, abhängig der Anzahl zu analysierenden Proben und der Anzahl an gewählten Geschwindigkeitsstufen.

3 | Methoden

In der sich der Prozessierung anschließenden dc/dt -Auswertung wird auf Grundlage der prozessierten Rohdaten die s -Wertverteilung berechnet und entsprechend der gewählten Radiusposition dargestellt. Dabei wurden bei den folgend präsentierten Experimenten immer alle Geschwindigkeiten analysiert und ein Glättungsgrad von 4 – 7 % global für alle Geschwindigkeiten einer Probe verwendet.

3.2.3.3 SEDFIT

Für die Datenauswertung im Bereich der Proteinanalytik wurde das Softwarepaket SEDFIT und die darin implementierte $c(s)$ -Methode verwendet, die auf der numerischen Lösung der Lamm-Gleichung beruht. Darüber hinaus wurde die Software auch zur Analyse von Messdaten mit Nanopartikeln verwendet, allerdings nur für SV-Läufe mit einer Zentrifugationsgeschwindigkeit unter gleichzeitiger Diffusionsvernachlässigung. Dies erfolgt mit der apparenten $ls-g^*(s)$ -Verteilung. Dabei setzt sich die Verteilung mathematisch aus zwei Komponenten zusammen. Zum einen aus dem apparenten s -Wertverteilungsmodell ($g^*(s)$) selbst und zum anderen aus der Anwendung der Methode der kleinsten Quadrate („least squares“ oder ls) [44]. Die $g^*(s)$ -Analyse basiert, wie die Verteilungsfunktion $g(s^*)$ in SEDANAL, auf dem Prinzip der dc/dt -Methode. Es erfolgt also auch hier die Berechnung einer apparenten s -Wertverteilung auf Basis der zeitlichen Änderung der Konzentrationsverteilung des sedimentierenden Partikels spezifisch für einen betrachteten radialen Punkt. Im Gegensatz zu der $g(s^*)$ -Verteilung in SEDANAL erfolgt im letzten Schritt aber keine Transformation der radialen Variable in einen apparenten s -Wert. Aufgrund der Vernachlässigung von Diffusionsprozessen wird in beiden Modellen von apparenten s -Wertverteilungen gesprochen. Bei der Methode der kleinsten Quadrate handelt es sich um ein mathematisches Regularisierungsprinzip, das zum Ziel hat, die den Messdaten angenäherte Modellfunktion so zu optimieren, dass diese die zugrundeliegenden Daten möglichst exakt widerspiegelt. Dabei erfolgt solange ein fortlaufender Näherungsprozess der Modellfunktion an die Messdaten, bis ein Minimum der quadratischen Abweichung der gewählten Fitparameter zu den Messdaten erreicht wird. Im Vergleich zu der $g(s^*)$ -Verteilung führt dieser Fitoptimierungsprozess bei $ls-g^*(s)$ zu einem deutlich präziseren Fitergebnis, was sich in einer geringeren Verbreiterung der erhaltenen s -Wertverteilung widerspiegelt. Damit werden die Nachteile der reinen dc/dt -Methodenanwendung ohne Regularisierung, wie sie unter 3.2.3.2 aufgeführt wurden, reduziert [44]. Im Gegensatz zu der Datenprozessierung- und auswertung von MSV-Läufen in SEDANAL, setzt die Auswertung mittels der apparenten $ls-g^*(s)$ -Verteilung vom Nutzer einen vorzugebenden s -Wertbereich, die s -Wertauflösung und das Konfidenzintervall voraus. Für den Meniskusfit durch die Software muss eine grafische Vorbestimmung der Meniskusposition erfolgen. Als Konfidenzintervall wurde in allen folgend präsentierten Experimenten 0,95 gewählt.

3 | Methoden

Ebenso wird von der Software die Baseline und das Ri- und Ti-Noise gefittet. Neben der $ls-g^*(s)$ -Verteilung wurde auch die in SEDFIT implementierte $c(s)$ -Verteilung genutzt [45]. Im Gegensatz zu den beiden bisher vorgestellten Verteilungsmodellen werden bei der $c(s)$ -Verteilung die Diffusion und die damit einhergehende Verbreiterung der s -Wertverteilung berücksichtigt. Die korrekte Anwendung dieses Modells setzt ein nicht interagierendes, ideal sedimentierendes Verhalten der Probenmoleküle voraus. Zerfalls- und Aggregationsprozesse müssen somit während des Zentrifugationsvorganges ausgeschlossen sein bzw. diese Prozesse müssen so langsam von statten gehen, dass sie die Stabilität der s -Wertverteilung nicht beeinflussen. Als Basis für dieses Modell wird zudem ein für alle in der Lösung befindlichen Partikel einheitlicher Formparameter f/f_0 angenommen. Dies führt dazu, dass der mit diesem Modell abdeckbare s -Wertbereich bedeutend kleiner ist, als dies bei den beiden apparenten Verteilungsmodellen der Fall ist. Aufgrund der Bedingungen, die dieses Modell an die Probenzusammensetzung stellt, wurde das $c(s)$ -Modell nur für die Datenauswertung von AUZ-Experimenten mit Proteinen und deren Mischungen verwendet [45]. Mathematische Grundlage für die Auswertung von Messdaten mit dem $c(s)$ -Modell ist eine numerische Lösung der Lamm-Gleichung und die Anwendung der Methode der kleinsten Quadrate. Wie unter 3.2.2 dargestellt, beschreibt die Lamm-Gleichung die zeitabhängige Konzentrationsänderung der sedimentierenden Partikel in Abhängigkeit der Rotorgeschwindigkeit bzw. den wirkenden Zentrifugalkräften, unter der Berücksichtigung gleichzeitig ablaufender Diffusionseffekte. Die direkte Anwendung der Lamm-Gleichung als Grundlage für die Berechnung der vorliegenden s -Wertverteilung hat somit, im Vergleich zu den beiden zuvor vorgestellten apparenten s -Wertmodellen den Vorteil, dass Diffusionsprozesse im Modell miteinbezogen sind und somit eine Proben unabhängige, bedeutend schmalere und präzisere s -Wertverteilung erhalten wird. Die so erhaltene Verteilung kann damit als ein optimierter Abgleich des gemessenen Sedimentationsmusters mit der bestmöglichen Kombination aus Sedimentationsmustern von verschieden großen, einzeln sedimentierenden Partikeln verstanden werden. Vereinfacht kann ein Maximum in der $c(s)$ -Verteilung als eine mathematische Lösung für einen in der Probe sedimentierenden Partikel mit dem bestimmten s -Wert angesehen werden. Eine zusätzliche Integration unter der Peakfläche gibt die Konzentration des Probenanteils an, der durch diese mathematische Lösung dargestellt wird. Finden keinerlei Diffusionsprozesse statt, liefert die Integration zwischen zwei s -Werten der $c(s)$ -Verteilung das mathematische gleiche Ergebnis, wie das $ls-g^*(s)$ -Modell, bei der modellbasiert eine direkte Integration erfolgt [44, 46]. Wie auch bei dem $ls-g^*(s)$ -Modell muss bei der Datenauswertung ein s -Wertbereich, die s -Wertauflösung, das Konfidenzintervall und ein grafisch vorbestimmter Meniskus eingegeben werden. Es erfolgt ebenfalls ein Fit der Baseline und des Ri- und Ti-Noise mit einem verwendeten Konfidenzintervall von 0,95.

3 | Methoden

Auf Grund der Tatsache, dass Diffusionseffekte berücksichtigt werden, erfolgt zudem der Fit der Bodenposition. Zur Einbeziehung von Diffusionseffekten sind die Kenntnisse der Dichte und Viskosität des Lösungsmittels, als auch das partiell spezifische Volumen der untersuchten Partikel notwendig. Speziell für die Auswertung von Fluoreszenzdaten in der AUZ gibt es eine Reihe fluoreszenzspezifischer Korrekturfaktoren, die ebenfalls in SEDFIT hinterlegt sind. Diese Korrekturfaktoren sind im direkten Zusammenhang mit dem konfokalen Aufbau der Fluoreszenzoptik, den individuellen spektroskopischen Eigenschaften des gewählten Fluorophors und den allgemeinen physikalischen Effekten, die bei der Fluoreszenz zu beobachten sind, zu sehen. Es ist möglich eine Korrektur für die folgenden Effekte vorzunehmen: zeitabhängige Intensitätsänderungen durch Instabilität des Lasers, Nichtlinearität der Fluoreszenzintensität des Fluorophors durch eventuell auftretende Innerfiltereffekte, räumliche Änderungen der Signalintensitäten durch Bewegungen des optischen Aufbaus entlang des zu detektierenden radialen Bereiches, Abschattungseffekte bei Exzitation und Emission in Bodennähe der Messzelle und die mit zunehmender Zentrifugationszeit abnehmende Plateauhöhe des Signals durch die radiale Verdünnung in Folge der sektorförmigen Geometrie der Messzellen. Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten AUZ-Analysen mit der Fluoreszenzoptik wurden für diese FDS-spezifischen Korrekturfaktoren mit den folgend aufgelisteten Startparameter gearbeitet [33]:

Tabelle 3.2.3.3: Startparameter der FDS-spezifischen Korrekturfaktoren während eines Fitprozesses mit SEDFIT.

FDS-spezifische Korrekturfaktoren	Startparameter
nichtlineare Detektion	1,0 power coefficient $d[\log(a)]/dc$ 0,0 baseline for transform
Exzitationsschatten	0,02 cm
Nichtlinearität durch radiale Bewegung des FDS	0,02 cm calculate Gaussian within # std 2,00
Radialer Verdünnungseffekt	1,00 $1+da/dr$

3.2.3.4 GUSI

Neben den drei erläuterten Softwarepaketen, die der Auswertung der Messdaten dienen bzw. zur Berechnung dafür nötiger physikalischer Parameter genutzt wurden, wurde als vierte Software GUSI verwendet. Bei GUSI handelt es sich um eine Software, die zur grafischen Darstellung der mittels SEDFIT erhaltenen s -Wertverteilungen und der gefitteten Messrohdaten, verwendet wird. Technisch besteht eine direkte Verknüpfung zwischen SEDFIT und GUSI, so dass ein direkter Datentransfer innerhalb der Softwarepakete ermöglicht wird und so eine schnelle und nutzerfreundliche grafische Bearbeitung und Darstellung der Daten aus SEDFIT erfolgen kann, ohne eines möglichen Datenverlusts oder Kompatibilitätsproblemen zwischen Dateiformaten [47]. Bei dieser Arbeit wurde neben der rein grafischen Darstellung der Messrohdaten und der dazugehörigen Residual mittels des `svdfr`-Moduls, das `cofs`-Modul zur Aufarbeitung der s -Wertverteilungen genutzt. Dabei erfolgt, abhängig von der zu treffenden Aussage der dargestellten Ergebnisse, eine vergleichende Darstellung von s -Wertverteilungen verschiedener Proben. Es kann entweder für alle in einem Diagramm dargestellten s -Wertverteilungen eine Normierung dieser auf ihren individuell maximalen Modellwert erfolgen oder eine Normierung auf die integrierte Fläche der Verteilungen. In beiden Fällen wird vom Nutzer zuvor der zu normierende s -Wertbereich global für alle im Diagramm dargestellten Verteilungen festgelegt. Es kann keine Normierung einzelner Verteilungen innerhalb eines Diagramms erfolgen, in dem mehrere Verteilungen dargestellt werden. Bei der Normierung auf den maximalen Modellwert erfolgt eine Division aller in einer Verteilung aufgetragenen Modellwerte durch den maximalen Modellwert der Verteilung, was den maximal möglichen Wert von eins (1) ergibt. Bei der Normierung auf die Fläche erfolgt zuerst eine Integration aller Flächen, der in einem Diagramm dargestellten Verteilungen. Danach erfolgt eine Division der einzelnen Modellwerte der dargestellten Verteilungen durch diese Gesamtfläche [47].

4 Charakterisierungen der A β 42-Speziesverteilung

Im Bereich der Proteinanalytik spielt der Einsatz eines geeigneten Puffersystems eine entscheidende Rolle. Die Hauptfunktionen stellen die Stabilisierung des pH-Werts und bei Salzzugabe ein Ladungsausgleich oder -abschirmung von sich im Puffer befindlichen Proteinen dar [48]. Vor Beginn jeder Messung wurde eine Temperaturequilibration der Zentrifuge mit enthaltenen Proben durchgeführt, um temperaturbedingte Konvektionen während der Zentrifugation auszuschließen. Zudem wurde bei der Verwendung des FDS individuell für jede Zelle der Verstärkungsfaktor, in Form der am Detektor anliegenden Spannung, eingestellt. Der Verstärkungsfaktor wurde so gewählt, dass die Signalintensität zu Beginn zwischen 800 - 4.000 RFU lag. Bei allen in diesem Kapitel vorgestellten Experimenten erfolgte immer eine ca. 20-stündige Vorinkubation der jeweiligen Proben bei RT, in Ruhe, um eine vollständige Lösung des Peptids und eine Equilibrierung der Aggregatspeziesverteilung zu erreichen. Zudem wurde, wenn nicht anders erwähnt, bei 20 °C mit 60.000 rpm zentrifugiert. Dem Fit für das verwendete $c(s)$ -Modell wurde eine Auflösung von 0,02 S zugrunde gelegt.

4.1 Einfluss verschiedener Puffersysteme auf die A β 42-Speziesverteilung

Im Rahmen der folgenden Interaktionsstudien von A β 42 mit D-Peptiden und Goldnanopartikeln wurde mit verschiedenen Puffersystemen gearbeitet. Dabei wurde für diese Experimente die Charakterisierung von 1 μ M FITC-A β 42 in 10 mM NaP_i, PBS und 10 mM HEPES, 137 mM NaCl, 0,01 % Tween 20, jeweils pH 7,4 durchgeführt.

Abbildung 4.1 A zeigt die $s_{20,w}$ -Wertverteilungen von 1 μ M FITC-A β 42 in 10 mM NaP_i (violett), in PBS (blau) und in 10 mM HEPES, 137 mM NaCl, 0,01 % Tween 20, (cyan) jeweils pH 7,4. Es sind zwei Peakbereiche in der Abbildung zu erkennen. Im Bereich zwischen 0,7 – 1,1 S befindet sich der Peak des FITC-A β 42-Monomers. Ein zweiter deutlich kleinerer Peakbereich befindet sich bei ca. 2 S. Im PBS-Puffer sind beide Peaks deutlich ausgeprägt, wobei der Peak um 2 S, anteilig zum Monomerpeak und im Vergleich zu den anderen beiden Puffern, einen relativ großen Anteil der Gesamtfläche in Anspruch nimmt. Die schmalste Verteilung und der schärfste Monomerpeak sind in dem HEPES-Puffer zu messen. Der 2 S Peak ist im Vergleich zu dem sehr ausgeprägten Monomerpeak und im Vergleich zu dem deutlich ausgeprägten 2 S Peak im PBS-Puffer sehr klein. In dem Natriumphosphat-Puffer hingegen ist der 2 S Peak kaum ausgeprägt und der kleinste und breiteste Monomerpeak zu erkennen, was auf eine reduzierte Löslichkeit des FITC-A β 42 in diesem Puffer schließen lässt. Diese reduzierte Löslichkeit und das daraus resultierende schlechte Signal-Rausch-Verhältnis führen zu einem ausgeprägten Basisliniendekonvolutionsproblem, auf das in Kapitel 7.1 eingegangen wird und das die Monomerpeakbreite erklärt.

4 | Charakterisierungen der A β 42-Speziesverteilung

Der Vergleich der Abbildung 4.1 B, C und D, die die Sedimentationsprofile des FITC-A β 42 in den drei verwendeten Puffern darstellen, veranschaulichen das unterschiedliche Sedimentationsverhalten des FITC-A β 42 in den Puffern.

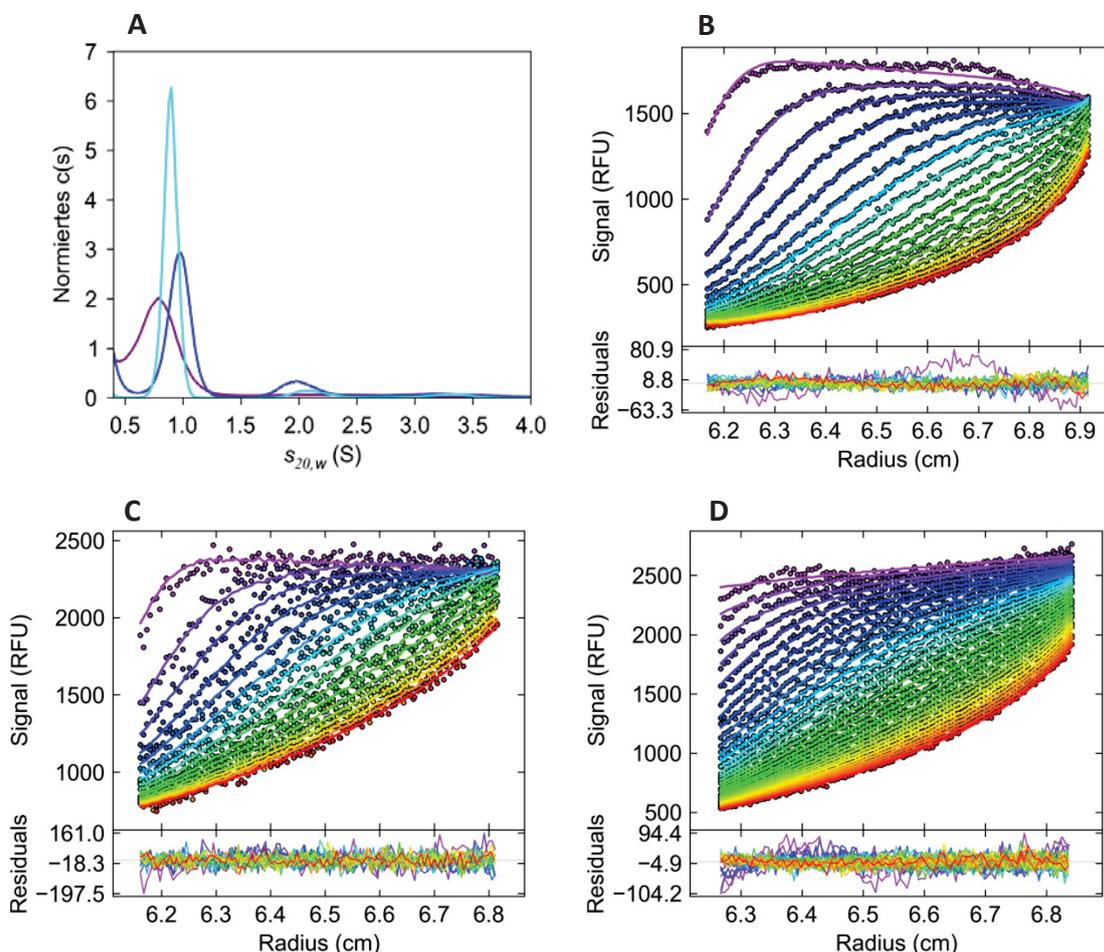


Abbildung 4.1: Einfluss verschiedener Puffersysteme auf die Ausprägung des FITC-A β 42-Monomerpeaks. In A werden die unterschiedlichen Ausprägungen des Monomerpeaks von 1 μ M FITC-A β 42 in 10 mM NaPi, pH 7,4 (violett), in PBS pH 7,4 (blau) und 10 mM HEPES, 137 mM NaCl, 0,01 % Tween 20, pH 7,4 (cyan) dargestellt. Die Normierung der Verteilungen erfolgte auf die Fläche. Im verwendeten HEPES-Puffer (cyan) zeigt sich das beste Löseverhalten von FITC-A β 42. B, C und D zeigen die Sedimentationsprofile von 1 μ M FITC-A β 42 in 10 mM HEPES, 137 mM NaCl, 0,01 % Tween 20, pH 7,4 (B), 10 mM NaPi, pH 7,4 (C) und in PBS pH 7,4 (D).

Die Mittelwerte aus mindestens vier Experimenten für den $s_{20,w}$ -Wert von 1 μ M FITC-A β 42 in den drei untersuchten Puffern sind in Tabelle 4.1 aufgeführt. Der Vergleich dieser zeigt, unter Berücksichtigung der Standardabweichungen, dass zwischen dem Natriumphosphat-Puffer und dem PBS-Puffer ein Unterschied von 0,01 S besteht. Hinsichtlich noch folgender Interaktionsstudien des FITC-A β 42-Monomers mit Liganden ist neben der Bestimmung eines exakten s -Wertes für dieses ein bestmögliches Löslichkeitsverhalten erstrebenswert, das in dem HEPES-Puffer erzielt wird.

4 | Charakterisierungen der A β 42-Speziesverteilung

Tabelle 4.1: Statistisch ausgewertete $s_{20,w}$ -Werte von 1 μ M FITC-A β 42 in 10 mM NaP_i pH 7,4, in PBS pH 7,4 und in 10 mM HEPES, 137 mM NaCl, 0,01 % Tween 20, pH 7,4.

Puffer	gemittelter $s_{20,w}$ -Wert (S)	Standardabweichung $s_{20,w}$ -Wert (S)	$s_{20,w}$ -Wertbereich (S)
10 mM NaP _i pH 7,4	0,86	0,04	0,82 – 0,90
PBS pH 7,4	0,94	0,03	0,91 – 0,96
10 mM HEPES, 137 mM NaCl, 0,01 % Tween 20, pH 7,4	0,9	0,05	0,85 – 0,95

4.2 Einfluss steigender Salzkonzentrationen auf die A β 42-Speziesverteilung

Wie in Kapitel 4.1 deutlich wurde, kann im Vergleich mit den beiden Natriumphosphat- und PBS-Puffern im HEPES-Puffer die höchste Konzentration an gelöstem FITC-A β 42-Monomer erzielt werden. Im Hinblick auf die Interaktionsuntersuchungen von A β 42 mit Liganden ist es wichtig, besonders bei Interaktionsuntersuchungen im mikromolaren Konzentrationsbereich, die gewünschte A β 42-Monomerkonzentration in den Proben vorliegen zu haben. Beeinflusst wird diese durch die Ionenstärke des Puffers, die einen Einfluss auf die Konformation der Proteine und die elektrostatische Abstoßung von gleichgeladenen Peptiden in Bodennähe der Messzelle hat. Demzufolge wurde in diesem HEPES-Puffer eine NaCl-Konzentrationsreihe von 0 mM bis zu 500 mM NaCl durchgeführt.

Abbildung 4.2.1 stellt die daraus resultierenden s -Wertverteilungen dar, wobei links die s_{app} -Wertverteilungen und rechts die $s_{20,w}$ -Wertverteilungen aufgetragen sind. Wie bereits im Methodenteil erläutert, erfolgt beim $s_{20,w}$ -Wert eine Korrektur der Viskositäts- und Dichtewerte einer Lösung auf die Standardbedingungen von Wasser als Lösungsmittel und 20 °C als Temperatur. Die hier verwendeten Dichte- und Viskositätswerte für die verschiedenenkonzentrierten HEPES-Pufferlösungen sind in Kapitel 2.1 aufgeführt. Die Zentrifugation erfolgte bei 30 °C. Im direkten Vergleich der apparenten und $s_{20,w}$ -Werte sind keine signifikanten Unterschiede bezüglich der s -Wertverteilungen in Abhängigkeit der NaCl-Konzentrationen zu erkennen. Dies lässt schlussfolgern, dass die beobachteten Unterschiede zwischen den s -Wertverteilungen innerhalb der NaCl-Konzentrationsreihe auf Veränderungen des FITC-A β 42 in Anwesenheit unterschiedlicher NaCl-Konzentrationen beruhen und nicht durch Dichte – oder Viskositätsunterschiede der Puffer zu Stande kommen. Im Vergleich der fünf getesteten NaCl-Konzentrationen ist, mit zunehmender NaCl-Zugabe, ein Absinken des Monomerpeaks bei ca. 0,9 S zu erkennen, der ohne NaCl-Zugabe am schmalsten ist (violett).

4 | Charakterisierungen der A β 42-Speziesverteilung

Die Zugabe von 50 mM NaCl (blau) führt bereits zu einer deutlichen Verringerung des Monomerpeaks und im Vergleich zu allen weiteren NaCl-Erhöhungen und den damit einhergehenden Verringerungen, ist hier der Effekt anteilig am stärksten zu erkennen. Die Zugabe von 137 mM NaCl (cyan) und 300 mM NaCl (grün) führen zu einer weiteren Verringerung der Monomerkonzentration. Gleichzeitig wird bereits bei 137 mM NaCl eine Verbreiterung des Monomerpeaks erkennbar. Eine weitere NaCl-Erhöhung auf 500 mM (orange) beeinflusst nur noch die Peakbreite und die Lokalisation des Peaks bezüglich des s -Werts, nicht aber mehr die Höhe des Peaks. Es kommt zu einer leichten s -Wertverschiebung zu einem kleineren s -Wert.

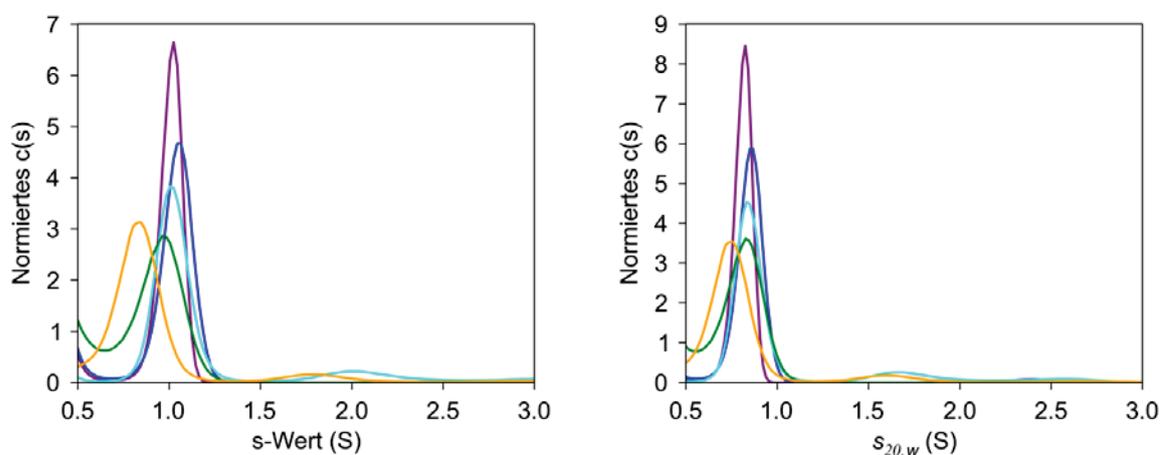


Abbildung 4.2.1: Einfluss steigender NaCl-Konzentrationen auf die Ausprägung des FITC-A β 42-Monomerpeaks in 10 mM HEPES, 0,01 % Tween 20, pH 7,4. Dem HEPES-Puffer wurden steigende NaCl-Konzentrationen zugesetzt: 0 mM (violett), 50 mM (blau), 137 mM (cyan), 300 mM (grün) und 500 mM (orange). Links wird die s_{app} -Wertverteilung und rechts die $s_{20,w}$ -Wertverteilung dargestellt. Die Zentrifugation erfolgte bei 30 °C. Die Normierung der Verteilungen erfolgte auf die Fläche. Es ist zu erkennen, dass mit zunehmender NaCl-Konzentration die Ausprägung des Monomerpeaks abnimmt und es zu einer deutlichen Peakverbreiterung kommt.

Im Bereich zwischen 1,5 S und 3 S sind bei 137 mM und 500 mM NaCl kleine Anreicherungen von FITC-A β 42-Aggregaten zu erkennen. Im Rahmen der hier durchgeführten SV-Läufe können aber keine weiteren Aussagen über diese s -Wertspezies gemacht werden. Die anhand des Vergleiches der s -Wertverteilungen zu erkennenden Veränderungen sind auf ein unterschiedliches Löseverhalten von A β 42 und mögliche Aggregationsprozesse während der 20-stündigen Vorinkubation in Anwesenheit der verschiedenen NaCl-Konzentrationen zu erklären. Mit steigender NaCl-Konzentration sinkt die Löslichkeit des FITC-A β 42. Es kommt zu einem Aussalzeffekt [48]. Die mit steigender Salzkonzentration einhergehenden Veränderungen können auch deutlich an den in Abbildung 4.2.2 dargestellten Sedimentationsprofilen erkannt werden. Eine der auffälligsten Veränderungen innerhalb der Muster der Sedimentationsfronten ist die unterschiedliche Lokalisation der Schnittpunkte entlang des Radius mit steigender NaCl-Zugabe. In einem NaCl-Konzentrationsbereich von 0 – 137 mM NaCl ist ein klarer Zusammenhang zwischen der NaCl-Konzentration und der Schnittpunktlokalisierung zu erkennen.

4 | Charakterisierungen der A β 42-Speziesverteilung

Der Schnittpunkt bewegt sich von ca. 6,7 cm ohne NaCl (Abbildung 4.2.2 A) bis zu ca. 7 cm bei 137 mM NaCl (Abbildung 4.2.2 C). Dieser Trend spiegelt sich auch in den Formparametern von FITC-A β 42 bei steigender NaCl-Konzentration wider (Tabelle 4.2). Der Formparameter stellt einen gemittelten Formfaktor über alle in der Verteilung enthaltenen s-Wertspezies dar. Mit zunehmender NaCl-Zugabe wird der Formparameter stets größer, wobei er bei 137 mM NaCl mit 1,58 seinen höchsten Wert erreicht und sich bei weiterer Zugabe bei ca. 1,45 stabilisiert. Insgesamt werden die beiden höchsten Werte bei 137 mM und 500 mM NaCl erreicht. Anzumerken ist hier, dass bei diesen beiden NaCl-Konzentrationen auch im Bereich von 1,5 – 3 S eine Anreicherung einer FITC-A β 42-Spezies zu erkennen ist (Abbildung 4.2.1). Faktoren, die die Schnittpunktlokalisierung der Sedimentationsfronten beeinflussen können, sind die Füllhöhe der Messzellen und damit die Meniskusposition, die Startkonzentration zu Beginn des Sedimentationsprozesses, Rückdiffusionsprozesse, das Molekulargewicht und optische Artefakte, wie die Änderung des Brechungsindex der Lösung mit steigender Salzkonzentration.

Tabelle 4.2: Formparameter von 1 μ M FITC-A β 42 bei steigender NaCl-Konzentration in 10 mM HEPES, 0,01 % Tween 20, pH 7,4.

NaCl-Konzentration (mM)	Formparameter f/f_0
0	1,2
50	1,32
137	1,58
300	1,4
500	1,48

Der beobachtete Effekt der NaCl-Konzentration auf die s-Wertverteilungen und die Sedimentationsprofile lassen den Schluss zu, dass es einen Sättigungspunkt bezüglich des Einflusses von NaCl auf die Löslichkeit des FITC-A β 42 gibt. Ab einer Konzentration von 300 mM NaCl ist der Anteil an gelösten FITC-A β 42 so gering, dass durch die weitere Erhöhung der NaCl-Konzentration keine deutlichen Veränderungen der FITC-A β 42-Konzentration mehr festzustellen sind.

4 | Charakterisierungen der A β 42-Speziesverteilung

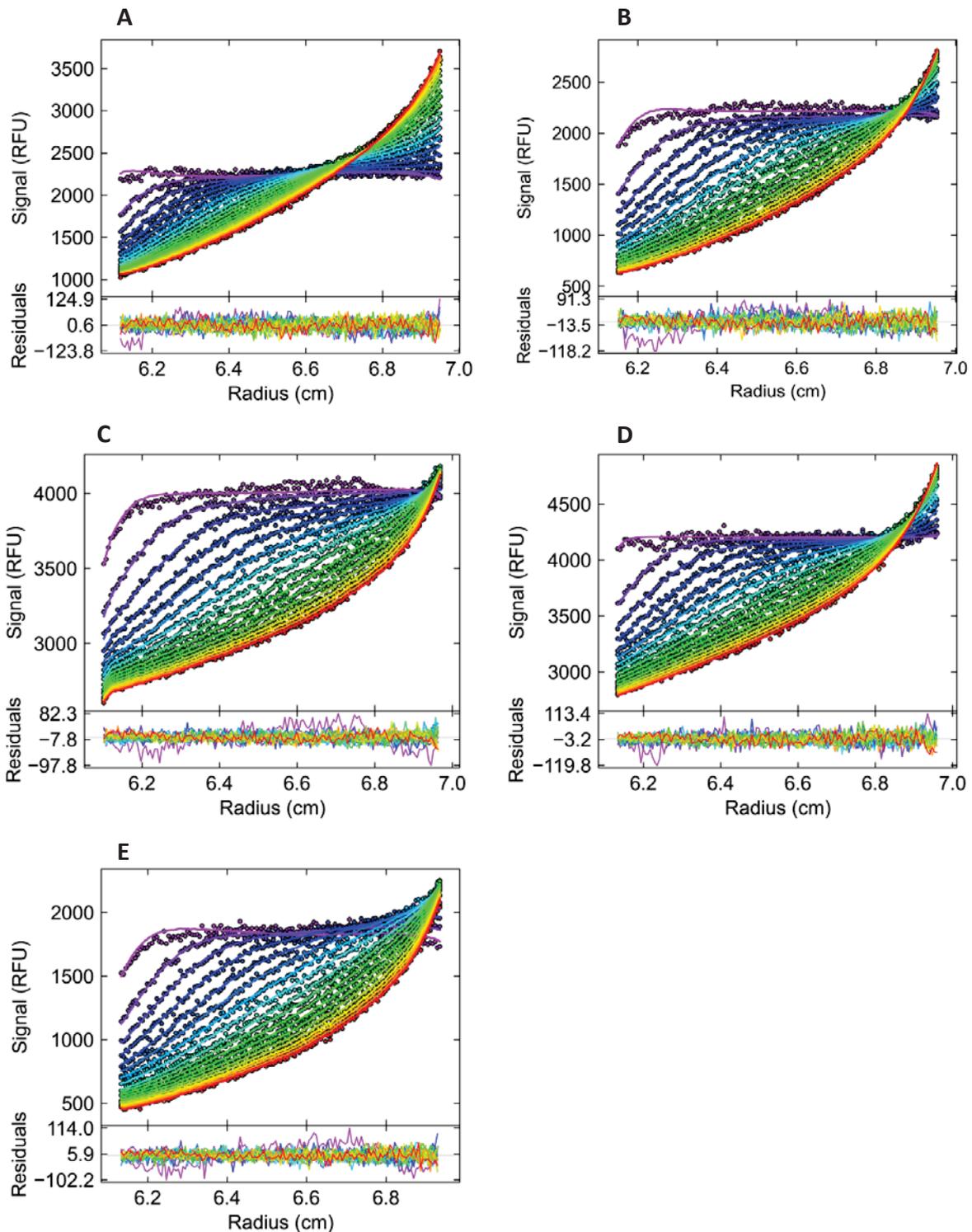


Abbildung 4.2.2: Sedimentationsprofile von 1 μ M FITC-A β 42 in 10 mM HEPES, 0,01 % Tween 20, pH 7,4 mit steigender NaCl-Konzentration. Dem HEPES-Puffer wurden steigende NaCl-Konzentrationen zu gesetzt: 0 mM (A), 50 mM (B), 137 mM (C), 300 mM (D) und 500 mM (E). Die Zentrifugation erfolgte bei 30 °C. In Abhängigkeit der NaCl-Konzentration kommt es zu deutlich unterschiedlichen Mustern der Sedimentationsfronten, wobei sich der Schnittpunkt in den Sedimentationsprofilen entlang des Radius in seiner Lokalisation ändert.

4 | Charakterisierungen der A β 42-Speziesverteilung

4.3 Einfluss der Zentrifugationstemperatur auf die A β 42-Speziesverteilung

Ein weiterer wichtiger Versuchsparameter, der im Zusammenhang mit AUZ-Analysen zu berücksichtigen ist, ist die Wahl der Zentrifugationstemperatur. Mögliche Effekte der Temperatur auf das Sedimentationsverhalten der zu untersuchenden Partikel und mögliche temperaturbedingte Veränderungen der dadurch in der Probe stattfindenden oder ausgelösten Prozesse müssen berücksichtigt werden. Durch Erhöhung der Temperatur kann die Viskosität des Lösungsmittels verringert und dadurch die Sedimentationsgeschwindigkeit erhöht werden. Bei sehr kleinen Analyten mit niedrigen s -Werten ist das von Vorteil. Ebenso wie die Viskosität des Lösungsmittels wird auch dessen Dichte und die Dichte bzw. das partiell spezifische Volumen des Analyten durch die gewählte Temperatur beeinflusst. Bei der Transformation des apparenten s -Werts in den $s_{20,w}$ -Wert erfolgt deswegen eine Korrektur auf alle drei Parameter.

Abbildung 4.3 zeigt die Ergebnisse zweier FDS-UZ-Läufe von 1 μ M FITC-A β 42 in 10 mM HEPES, 137 mM NaCl, 0,01 % Tween 20, pH 7,4 bei 20 °C (A und B violett, C) und 30 °C (A und B blau, D) Zentrifugationstemperatur, wobei Abbildung 4.3 C und Abbildung 4.3 D die Sedimentationsprofile veranschaulichen. In Abbildung 4.3 A wird das apparente Sedimentationsverhalten in Form der s_{app} -Werte und in Abbildung 4.3 B die transformierten $s_{20,w}$ -Werte dargestellt. Beim direkten Vergleich der s_{app} -Wertverteilungen (Abbildung 4.3 A) ist zu erkennen, dass der FITC-A β 42-Monomerpeak bei 30 °C (blau) mit ca. 1,1 S deutlich größer ist, als der s_{app} -Wert bei 20 °C mit ca. 0,8 S (violett). Ein zweiter Peak bei ca. 2 S ist beiden Verteilungen gemeinsam. Der Mittelwert von mindestens vier Experimenten bei gegebenen Zentrifugationstemperaturen liefert für 1 μ M FITC-A β 42-Monomer die folgenden s_{app} -Werte:

Tabelle 4.3: Statistisch ausgewertete s_{app} -Werte von 1 μ M FITC-A β 42-Monomer bei 20 °C und 30 °C Zentrifugationstemperatur.

Temperatur (°C)	gemittelter s_{app} -Wert (S)	Standardabweichung s_{app} -Wert (S)	s_{app} -Wertbereich (S)
20	0,81	0,05	0,76 – 0,86
30	1,04	0,02	1,02 – 1,06

Ein Vergleich der beiden Sedimentationsprofile in Abbildung 4.3 C und Abbildung 4.3 D verdeutlicht das unterschiedliche Sedimentationsverhalten. Dieses visuell unterschiedliche Sedimentationsverhalten spiegelt sich auch in den Formparametern wider, wie das in Kapitel 4.2 der Fall war. Bei 20 °C liegt dieser bei 1,25 und deutet auf eine eher kugelartigere Form hin, wohingegen er bei 30 °C bei 1,58 liegt, was auf eine eher elongierte Form des Monomers hindeutet.

4 | Charakterisierungen der A β 42-Speziesverteilung

Anzumerken ist, dass eine $s_{20,w}$ -Transformation erst nach dem eigentlichen Fitprozess mit den apparenten Versuchsparametern erfolgt. Diese $s_{20,w}$ -Transformation führt im Fall der 30 °C-Verteilung bezüglich dieses zweiten Peaks zu einer Verschiebung von ursprünglich 2 S auf 1,7 S. Auch der Monomerpeak verschiebt sich deutlich zu einem $s_{20,w}$ -Wert, der in direkter Nähe zum Monomerpeak der 20 °C-Verteilung liegt (Abbildung 4.3 B).

Mit Blick auf die Theorie und die parameterbasierte Korrektur wäre zu erwarten, dass die beiden $s_{20,w}$ -Verteilungen homogen übereinander liegen. Dass dies nicht der Fall ist, kann wie bereits zu Beginn erläutert wurde, dadurch erklärt werden, dass die Temperatur sowohl einen Einfluss auf das Lösungsmittel, als auch auf den zu analysierenden Partikel hat. Diese beiden Prozesse wirken sich hier gegenläufig auf das Sedimentationsverhalten des untersuchten FITC-A β 42 aus. Die Temperaturerhöhung um 10 °C führt zur Verringerung der Viskosität des Lösungsmittels. Dies führt dazu, dass das FITC-A β 42 aufgrund der geringeren Reibung schneller sedimentiert, was anhand der s_{app} -Wertverteilungen in Abbildung 4.3 A zu erkennen ist. Gleichzeitig führt diese Temperaturerhöhung möglicherweise aber auch zu einer elongierteren Form des FITC-A β 42, was anhand des größeren Formparameters zu erkennen ist, weswegen es einen formbedingt größeren Reibungswiderstand während der Sedimentation erfährt. Bei einer $s_{20,w}$ -Transformation erfolgt eine Korrektur der Lösungsmittelparameter auf die Dichte- und Viskositätswerte von Wasser bei 20 °C. Es erfolgt allerdings keine Korrektur auf die apparente Form. Dieser Einfluss der Form kann hier eine Erklärung für die Abweichungen zwischen den beiden $s_{20,w}$ -Verteilungen geben.

Am Ende dieses Kapitels können die Schlussfolgerungen gezogen werden, dass sich für Interaktionsuntersuchungen von A β 42 mit Liganden der 10 mM HEPES-Puffer mit 0,01 % Tween 20, pH 7,4 bezüglich der A β 42-Monomerlöslichkeit am besten eignet. Eine Erhöhung der Zentrifugationstemperatur von 20 °C auf 30 °C führt zudem zu einer schnelleren Sedimentation und damit zu einer besseren Auswertung des Sedimentationsverhaltens des A β 42-Monomers.

4 | Charakterisierungen der A β 42-Speziesverteilung

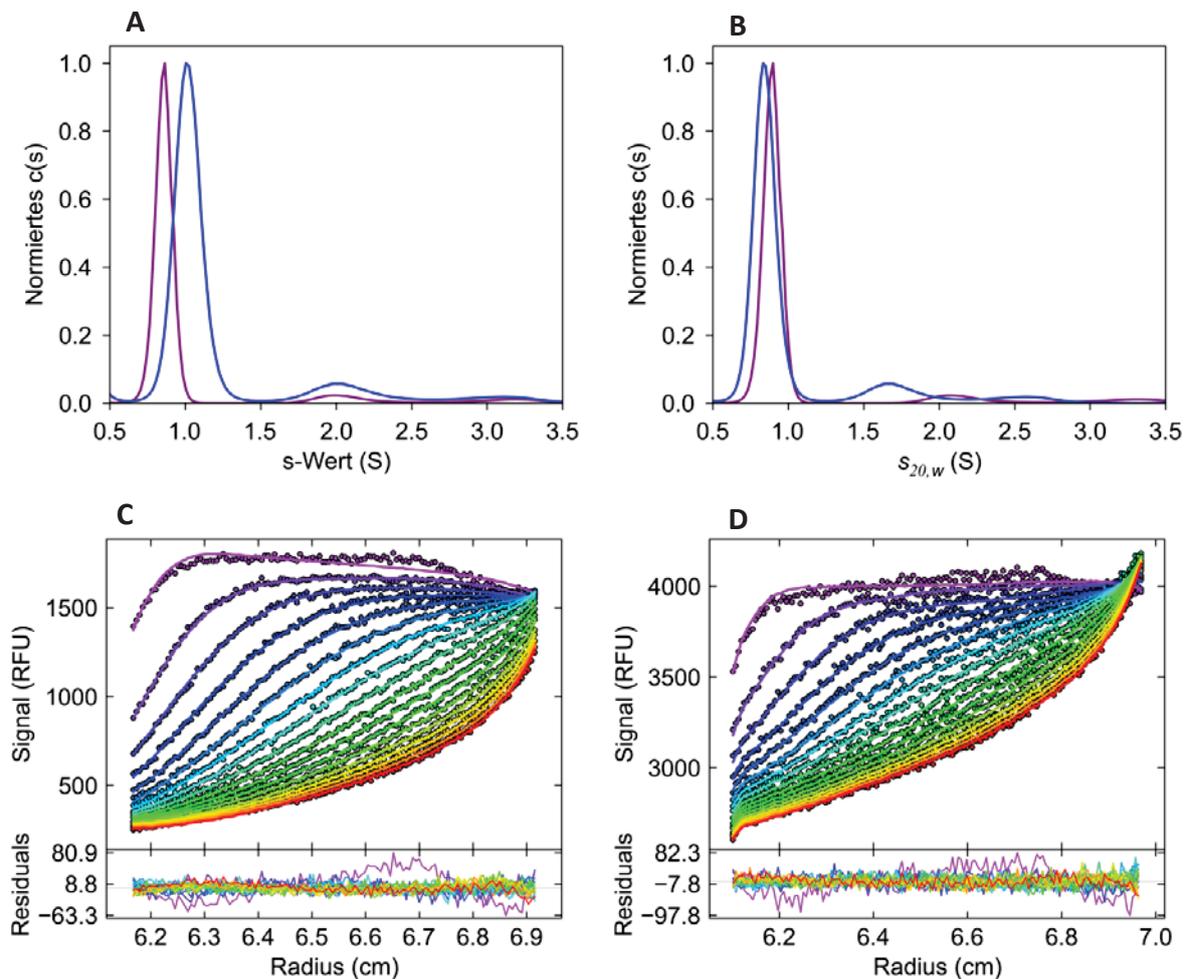


Abbildung 4.3: Einfluss der Zentrifugationstemperatur auf den s-Wert des FITC-A β 42-Monomers. Die Zentrifugationen in der FDS-UZ erfolgten bei 20 °C (A und B violett, C) und 30 °C (A und B blau, D) in 10 mM HEPES, 137 mM NaCl, 0,01 % Tween 20, pH 7,4. Das unterschiedliche Muster der Sedimentationsfronten in Abhängigkeit der Temperatur ist besonders am Ergebnis der s_{app} -Wertverteilung (A) zu erkennen, bei denen die Monomerpeaks deutlich getrennt voneinander vorliegen. B zeigt die auf die Standardbedingungen korrigierten $s_{20,w}$ -Verteilungen. Die Normierung der Verteilungen erfolgte auf ihren maximalen Wert.

5 A β 42-Ligandenwechselwirkungsstudien

5.1 A β 42-HSA-Wechselwirkung

Wie in der Einleitung unter 1.4.2 erläutert, bietet der Einsatz von peptidbasierten Nanopartikeln in der humanmedizinischen Anwendung den Vorteil, dass es zu einer deutlich reduzierten, bis hin zu keiner immunologischen Antwort des humanen Organismus auf die Anwesenheit derartiger Partikel kommt, da diese nicht als zu eliminierende Fremdkörper vom Immunsystem erkannt werden. Es erfolgt stattdessen eine immunologisch normale Phagozytose durch Makrophagen. Aus diesem Grund ist es für die Etablierung eines nanopartikelbasierten Medikaments in der Humantherapie und hier speziell in der Alzheimer Therapie naheliegend, humanes Serumalbumin als Grundstoff für die Herstellung solcher Partikel zu testen. Da am Ende des Herstellungsprozesses der Partikel das Vorhandensein einzelner, noch freier HSA-Monomere nicht ausgeschlossen werden kann bzw. es zu Degradationsprozessen der Partikel kommen könnte, an deren Ende ebenfalls freies HSA-Monomer in der Probe vorliegen würde, wurde im Rahmen der hier vorgestellten Dissertation die Wechselwirkung von freiem HSA-Monomer mit A β 42 getestet. Darüber hinaus stellt HSA im menschlichen Blutkreislauf und in der Zerebrospinalflüssigkeit eines die häufigsten Proteine dar.

Für diese Studie wurde mittels des Einsatzes der FDS-UZ und fluoreszenzmarkiertem A β 42 bzw. HSA eine mögliche Wechselwirkung im submikromolaren Konzentrationsbereich der beiden potentiellen Interaktionspartner untersucht. Werden folgend keine anderen Angaben gemacht, wurden die Zentrifugationen bei 20 °C und 60.000 rpm, nach einer 1-stündigen Inkubation der gesamten Probe bei RT und in Ruhe, durchgeführt. Als Puffersystem wurde 10 mM HEPES, 137 mM NaCl, 0,01% Tween 20, pH 7,4 verwendet. Für den Fitprozess des hier verwendeten $c(s)$ -Modells wurde eine s -Wertauflösung von 0,02 S gewählt. Zum submikromolaren Interaktionsnachweis von A β 42 und HSA wurden 1 μ M bis 5 μ M HSA zu 1 μ M FITC-A β 42 hinzugegeben. Die daraus resultierenden $s_{20,w}$ -Wertverteilungen sind in Abbildung 5.1.1 dargestellt und wurden zwecks Vergleichbarkeit auf die Fläche zwischen 0,5 bis 4,9 S normiert. Zu erkennen ist, dass es mit zunehmender Konzentration an HSA zu einer Verringerung der Peakhöhe des FITC-A β 42-Monomerpeaks (violett) kommt. Bei einer Konzentration von 3 μ M (grün) bzw. 5 μ M (orange) HSA überlagern sich die Peaks in diesem Bereich fast komplett, was die Schlussfolgerung zulässt, dass eine weitere Zugabe von HSA keine weitere signifikante Verringerung dieses Peaks zur Folge hat. Simultan zur Verringerung der Peakhöhe des FITC-A β 42-Monomerpeaks um die 0,8 S, kommt es im Bereich zwischen 1,4 und 2,0 S zu einer HSA-konzentrationsabhängigen Peakverschiebung. Während im Fall der 1 μ M FITC-A β 42 dieser Peak noch bei 2 S lokalisiert ist, beginnt dieser mit zunehmender HSA-Konzentration sich zu einem kleineren $s_{20,w}$ -Wert zu bewegen.

5.1 | A β 42-HSA-Wechselwirkung

Auch im Bereich um die 4,4 S ist eine Änderung der Peakhöhe mit zunehmender HSA-Konzentration zu erkennen, wobei dieser Peak bei 5 μ M HSA am deutlichsten hervortritt.

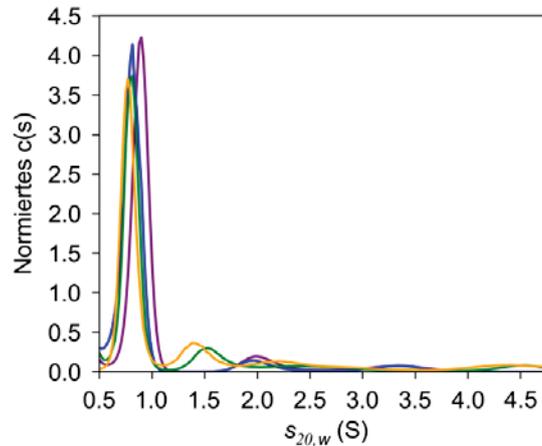


Abbildung 5.1.1: HSA-Zugaben zu 1 μ M FITC-A β 42. Es erfolgten HSA-Zugaben von 1 μ M (blau), 3 μ M (grün) und 5 μ M (orange) HSA zu 1 μ M FITC-A β 42 (violett). Die Normierung der Verteilungen erfolgte auf die Fläche. Bis zu einer hinzugegebenen Konzentration von 5 μ M HSA sinkt der Monomerpeak des FITC-A β 42 kontinuierlich mit hinzugegebener HSA-Menge ab. Der Peak bei ca. 4,4 S nimmt mit zunehmender HSA-Konzentration zu.

Zur besseren Veranschaulichung der im Rahmen der HSA-Zugaben stattfindenden Interaktionsprozesse werden in Abbildung 5.1.2 nur die Verteilungen von 1 μ M FITC-A β 42 alleine (violett) und mit 5 μ M HSA (blau) dargestellt. In Abbildung 5.1.2 A wird der komplette *s*-Wertbereich, wie in Abbildung 5.1.1 gezeigt, wohingegen Abbildung 5.1.2 B einen Ausschnitt zwischen 3,8 und 4,8 S darstellt. Wie bereits zu Abbildung 5.1.1 beschrieben, erfolgen mit einer Zugabe von HSA drei deutliche Veränderungen in der *s*-Wertverteilung, wobei alle drei Effekte bei 5 μ M HSA am deutlichsten hervortreten. In Folge der HSA-Zugabe kommt es zu einer signifikanten Verringerung des A β 42-Monomerpeaks bei ca. 0,8 S, einhergehend mit einer Verschiebung des ursprünglich 2 S Peaks zu 1,4 S und zu der Ausprägung des, für das HSA-Monomer, charakteristischen Peaks im Bereich um die 4,4 S. Aus entsprechender Literatur [49] bzw. noch folgend präsentierten, eigenen AUZ-Messungen (Abbildung 5.1.3) ist bekannt, dass das HSA-Monomer einen *s*_{20,w}-Wert von 4,6 S hat. Die mit steigender HSA-Zugabe beobachtete Zunahme des Peaks um diesen *s*_{20,w}-Wert lässt die Schlussfolgerung zu, dass es zu einer direkten Bindung des FITC-A β 42-Monomers an das HSA-Monomer kommt. Aufgrund der geringen A β 42-Konzentration wären kein A β 42-Aggregat oberhalb von 4 S und auch keine fluoreszierende HSA-Spezies zu erwarten. Die gleichzeitige Abnahme des Monomerpeaks untermauert diese Schlussfolgerung, da sich ein Teil des FITC-markierten A β 42 an das sonst nicht fluoreszierende HSA anlagert und dadurch einen deutlich höheren *s*-Wert hat. Die zudem deutlich zu beobachtende *s*-Wertverschiebung einer *s*_{20,w}-Wertspezies mit 2 S, ohne Anwesenheit von HSA, zu 1,4 S bei Zugabe von HSA, könnte durch ein verändertes Aggregationsverhalten des FITC-A β 42 in Gegenwart von HSA erklärt werden.

5.1 | A β 42-HSA-Wechselwirkung

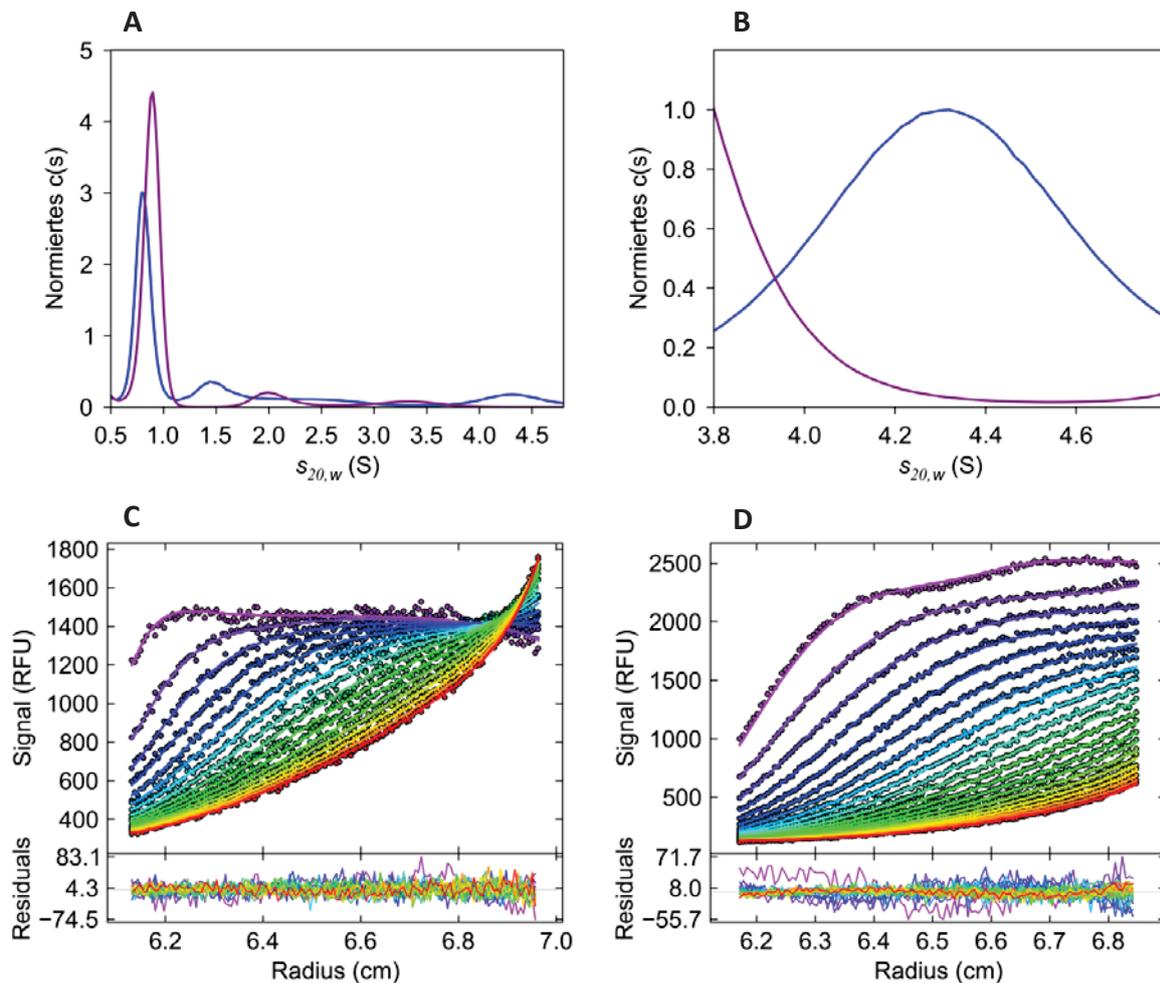


Abbildung 5.1.2: Wechselwirkungsnachweis von 1 μ M FITC-A β 42 (violett, A, B) mit 5 μ M HSA (blau, A, B). Die Normierung der Verteilungen erfolgte auf die Fläche. Eine Wechselwirkung wird anhand der Verringerung des Monomerpeaks des FITC-A β 42 (A) und der Erhöhung des Peaks um 4,4 S deutlich (A, B). C und D zeigen die Sedimentationsprofile von 1 μ M FITC-A β 42 alleine (C) bzw. mit 5 μ M HSA (D).

Auch hier können Wechselwirkungen vonstattengehen, bei denen es zu unspezifischen, zeitlich sehr kurzen Zusammenlagerungen des HSA-Monomers mit FITC-A β 42 kommt, die sich nicht in Form des sich neu ausprägenden 4,4 S Peaks bemerkbar machen, da sie vom Konzentrationsanteil in der Gesamtlösung und auf der Zeitskala deutlich unterrepräsentiert sind. Die Anlagerung eines Teils des freien FITC-A β 42-Monomers an HSA könnte auch dazu führen, dass es zu Gleichgewichtsverschiebungen in der Lösung kommt und diese sich neubildende 1,4 S Spezies eine bevorzugte Aggregatspezies bei den sich neuinstellenden Konzentrationsverhältnissen der Interaktionspartner ist. Über präzise stöchiometrische Verhältnisse dieser Spezies können anhand der durchgeführten SV-Läufe allerdings keine Aussage gemacht werden. Die signifikanten Unterschiede in den $s_{20,w}$ -Wertverteilungen des 1 μ M FITC-A β 42 mit und ohne 5 μ M HSA sind besonders in den ersten gezeigten Sedimentationsfronten der beiden Sedimentationsprofile in Abbildung 5.1.2 C bzw. D deutlich zu erkennen.

5.1 | A β 42-HSA-Wechselwirkung

Abbildung 5.1.2 D untermauert die Anwesenheit von größeren s -Wertspezies in der Probe, die allerdings bei einer Zentrifugationsgeschwindigkeit von 60.000 rpm sehr schnell zum Boden der Messzelle sedimentieren. Zudem kommt es zu einer signifikanten Erhöhung des Formparameters f/f_0 von 1,39 ohne HSA zu 1,7 mit HSA.

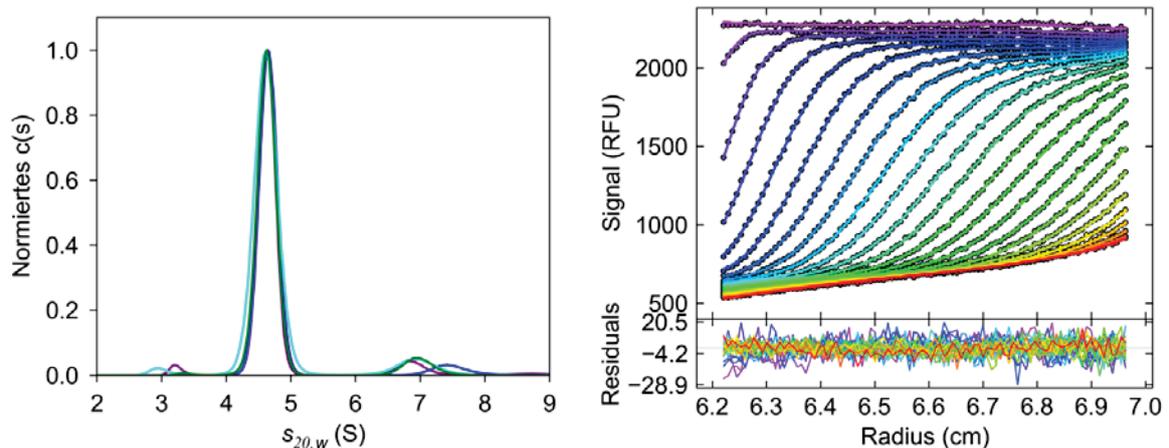


Abbildung 5.1.3: A β 42-Zugaben zu 1 μ M HSA. Es erfolgten A β 42-Zugaben von 3 μ M (blau), 5 μ M (cyan) und 8 μ M (grün) A β 42 zu 1 μ M HSA (violett)(links). Die Proben enthielt 500 nM Alexa488-markiertes HSA und 500 nM unmarkiertes HSA. Die Zentrifugation erfolgte bei 40.000 rpm. Die Normierung der Verteilungen erfolgte auf ihren maximalen Wert. Es ist keine nennenswerte Änderung der $s_{20,w}$ -Wertverteilung bei Zugabe von 3-8 μ M A β 42 zu erkennen. Rechts wird repräsentativ das Sedimentationsprofil von 1 μ M HSA dargestellt.

Des Weiteren wurde untersucht, ob die zu Abbildung 5.1.1 und 5.1.2 erläuterte Bindung des FITC-A β 42 an HSA-Monomere auch zu detektieren ist, wenn sich der zu detektierende Fluorophor am HSA befindet und damit das Sedimentationsverhalten spezifisch vom HSA aufgezeichnet wird. Für diese Versuchsreihe wurden A β 42-Zugaben von 3 μ M (blau), 5 μ M (cyan) bis 8 μ M (grün) A β 42 zu 1 μ M HSA Gesamtkonzentration (violett) durchgeführt (Abbildung 5.1.3). Dabei setzten sich die 1 μ M HSA-Gesamtkonzentration aus 500 nM Alexa488-markiertem HSA und 500 nM nichtmarkiertem HSA zusammen. Da in diesen SV-Läufen das Sedimentationsverhalten des HSA-Monomers untersucht werden sollte und das Sedimentationsverhalten des A β 42 selbst nicht detektiert wird, wurde eine Zentrifugationsgeschwindigkeit von 40.000 rpm gewählt. Repräsentativ wird in Abbildung 5.1.3 (rechts) das Sedimentationsprofil von 1 μ M HSA dargestellt. Abbildung 5.1.3 links veranschaulicht die resultierenden $s_{20,w}$ -Wertverteilungen der durchgeführten Zugaben. Es ist ein Hauptpeak bei ca. 4,6 S zu erkennen, der dem HSA-Monomer zugeordnet werden kann [49]. Unabhängig von der hinzugegebenen A β 42-Menge kommt es bezüglich des $s_{20,w}$ -Werts dieses Peaks zu keiner Veränderung. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass die Massenzunahme durch eine potentielle Anlagerung von A β 42-Peptiden so klein ist, dass sie im Vergleich zur Gesamtmasse eines HSA-Monomers (67 kDa [50]) nicht zum Tragen kommt. Des Weiteren ist ein zweiter, deutlich kleinerer Peak bei ca. 6,8 S zu erkennen, der dem HSA-Dimer zugeordnet werden kann.

5.1 | A β 42-HSA-Wechselwirkung

Mit Blick auf diesen Peak ist im Fall der Zugabe von 3 μ M A β 42 eine kleine $s_{20,w}$ -Wertverschiebung zu erkennen, bei der es sich um einen Komplex aus HSA und A β 42 handeln könnte. Aufgrund der vorliegenden Datenlage ist, ähnlich wie bei dem 2 S Peak in den beiden vorherigen Abbildungen erläutert, keine strukturbiochemische oder stöchiometrische Aussage über Eigenschaften dieser $s_{20,w}$ -Wertspezies machbar. Studien, die mit anderen biophysikalischen Methoden durchgeführt wurden und in denen ebenfalls die Bindung des freien HSA-Monomers an A β -Peptide untersucht wurden, legten nahe, dass eine Bindung im submikromolaren Bereich der beiden Interaktionspartner zu vermuten ist [50, 51]. Allerdings wurde in diesen Studien entweder keine Absolutmethode verwendet [51], wie es die Analytische Ultrazentrifugation mit sich frei in Lösung befindlichen Partikeln darstellt oder es wurde nicht das von seinen Aggregationseigenschaften her mit am schwierigsten zu handhabende A β 42-Peptid verwendet, sondern nur verkürzte Varianten [50], die aufgrund der geringeren Aggregationsneigung in der Handhabung reproduzierbarer sind.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es mit dem Einsatz der FDS-UZ erfolgreich gelungen ist, die Interaktion des monomeren A β 42-Peptids mit HSA frei in Lösung im submikromolaren Bereich nachzuweisen. Bei einem ca. 4 - fachen Konzentrationsüberschuss des HSA zu A β 42 konnte eine direkte Bindung des mit Fluoreszein markierten A β 42 an das HSA-Monomer nachgewiesen werden. Entsprechende Veröffentlichungen untermauern das hier erzielte Ergebnis und zeigen, dass die Analytische Ultrazentrifugation, mit der Nutzung der Fluoreszenzdetektionsoptik, eine hochauflösende und verlässliche Methode darstellt, um die Wechselwirkungen von Interaktionspartnern im submikromolaren Bereich zu studieren und erfolgreich nachzuweisen.

5.2 | A β 42-D-Peptid-Wechselwirkung

5.2 A β 42-D-Peptid-Wechselwirkung

Neben der Arbeit mit peptidbasierten und kolloidalen Nanopartikeln, lag der Fokus der Arbeit auf der Untersuchung von Protein-Liganden-Interaktionen in der AUZ, wie sie unter 5.1 bereits mit A β 42 und HSA vorgestellt wurden. Ein Ziel der Arbeit war die Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen A β 42-Monomeren und dem D3-Peptid (D3) in der AUZ im mikromolaren Konzentrationsbereich der beiden Interaktionspartner. Wie bereits in der Einleitung vorgestellt, existieren bereits Interaktionsstudien von A β 42 mit D3 [18, 19, 20]. Bisherige experimentelle Studien konnten zwar eine Veränderung des Aggregationsverhaltens von A β 42 und auch eine Bindung an A β 42 zeigen, konnten aber nie explizit die Monomer-Bindung belegen. Im Rahmen dieser A β 42-D-Peptid-Interaktionsstudie wurde sowohl mit der Absorptionsoptik mit zwei verschiedenen Versuchsaufbauten als auch mit der Fluoreszenzoptik gearbeitet. Bei allen in diesem Kapitel vorgestellten Experimenten erfolgte vor der entsprechenden Zentrifugation immer eine ca. 20-stündige Vorinkubation der jeweiligen Proben bei RT, in Ruhe, um eine Equilibrierung der Aggregatspeziesverteilung zu erreichen und eine damit verbundene Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Zudem erfolgten die Zentrifugationen, wenn nicht anders erwähnt, bei 20 °C mit 60.000 rpm. Die *s*-Wertauflösung beim Fit des verwendeten *c(s)*-Modells lag, wenn keine anderen Angaben erfolgen, bei 0,02 S.

5.2.1 Wechselwirkungsuntersuchung mittels Absorptionsdetektion

Zu Beginn der Untersuchung der Wechselwirkung zwischen A β 42 und D3 wurden Messungen mit der Absorptionsoptik mit einer Mindestkonzentration von 20 μ M A β 42 durchgeführt. Der Einsatz einer geringeren A β 42-Konzentration ist aufgrund der begrenzten Sensitivität der Absorptionsoptik und dem niedrigen Extinktionskoeffizienten von A β 42, mit einem gleichzeitig niedrigen Signal-Rausch-Verhältnis, nicht möglich. Neben der Detektion der Absorption des A β 42 bei 220 – 230 nm kann auch die Absorption eines hinzugegebenen Liganden bei einer anderen, für diesen spezifischen, Wellenlänge gemessen werden. Die Detektion der Konzentrationsprofile kann auch in einem Experiment gleichzeitig bei zwei Wellenlängen, im Folgenden als Zweiwellenlängendetektionsmodus bezeichnet, erfolgen. Abbildung 5.2.1.1 stellt die Ergebnisse eines äquimolaren SV-Laufs von 20 μ M A β 42 mit D3 im Einwellenlängendetektionsmodus bei 225 nm dar. Abbildung 5.2.1.1 A und B zeigen die $s_{20,w}$ -Verteilung von 20 μ M A β 42 alleine (violett) und äquimolar dazu mit D3 (blau) in 50 mM NaP_i pH 7,4. Abbildung 5.2.1.1 C und D zeigen die Sedimentationsprofile von 20 μ M A β 42 alleine bzw. in Anwesenheit der äquimolaren Menge an D3.

5.2 | A β 42-D-Peptid-Wechselwirkung

Die *s*-Wertauflösung des Fits liegt bei beiden Proben bei 0,05 S. In der Probe ohne D3-Zugabe wird eine relativ große Bandbreite an verschiedenen *s*-Wertspezies gemessen. Angefangen von einem deutlichen Monomerpeak bei ca. 0,7 S, der in Abbildung 5.2.1.1.B vergrößert dargestellt ist (violett), gefolgt von einer sehr heterogen verteilten *s*-Wertspeziesverteilung von 4 S bis 18 S, wobei sich im Bereich zwischen 6 S bis 11 S das Maximum der Verteilung befindet. Das Vorhandensein von Aggregaten ist bereits an den gemessenen Rohdaten zu erkennen (Abbildung 5.2.1.1 C). Die ersten Sedimentationsfronten weisen schnell sedimentierende Anteile von etwa 0,3 Absorptionseinheiten auf, welche A β 42-Aggregaten entsprechen. Die verbleibenden 0,4 Absorptionseinheiten können dem A β 42-Monomer oder in der Probe enthaltenen sehr kleinen Aggregaten zu geschrieben werden, die bei 60.000 rpm deutlich langsamer sedimentieren als die größeren Aggregate im Bereich der Grenzschicht oberhalb von 0,4 OD. Vergleicht man diese Probe mit einer, die äquimolar D3 enthielt (Abbildung 5.2.1.1 D), fällt auf, dass sich keine größeren Aggregate im Bereich zwischen 4 bis 18 S nachweisen lassen. Dies spiegelt sich auch in der *s*-Wertverteilung in Abbildung 5.2.1.1 A (blaue Kurve) wider. Ein Vergleich der in beiden Proben vorhandenen *s*-Wertspezies bei 0,7 S zeigt eine deutliche Übereinstimmung (Abbildung 5.2.1.1 B). Wie bereits erörtert, erfolgt ein Interaktionsnachweis zwischen zwei Interaktionspartnern in der AUZ mittels des Auftretens einer neuen *s*-Wertspezies, die dem Komplex zu geordnet werden kann. Demzufolge kann anhand dieses Experiments keine Aussage über eine Bindung des D3 an das A β 42-Monomer erfolgen. Es kann lediglich die Aussage getroffen werden, dass keine A β 42-Aggregate in der Probe mehr gemessen werden. Möglich wäre, dass D3 zum Zeitpunkt der Probenherstellung direkt an einige in der Lösung vorliegende größere A β 42-Aggregate bindet und diese komplett ausfällt. Dies würde ebenfalls dazu führen, dass nur noch der Monomeranteil der Probe gemessen wird, der mangels Nukleationskeime, die durch D3-Zugabe ausgefällt wurden, über den Zeitraum der 20-stündigen Vorinkubation stabil in Lösung bleiben. Aufgrund der kleinen Differenz der Absorptionen, die in den beiden Sedimentationsprofilen um 0,4 OD zu erkennen ist, nach dem bei 20 μ M A β 42 alleine alle großen Aggregate zu Boden sedimentiert sind und die Absorption leicht unter 0,4 OD liegt, könnte geschlossen werden, dass diese Differenz zur Probe, die zusätzlich 20 μ M D3 enthielt, auf das sich noch in der Lösung befindlich D3 zurückzuführen ist. Mangels einer konkreten Aussagemöglichkeit bezüglich einer A β 42-D3-Komplexbildung im vorangegangenen Experiment, kam in einem weiteren Experiment der Zweiwellenlängendetektionsmodus in der AUZ zum Einsatz. Hierfür wurde an den N-Terminus von D3 der Farbstoff Dy405 gekoppelt (D3Dy405). Das Anregungsmaximum dieses Farbstoffs wird bei 400 nm angegeben. Das korrespondierende Emissionsmaximum liegt bei 423 nm.

5.2 | A β 42-D-Peptid-Wechselwirkung

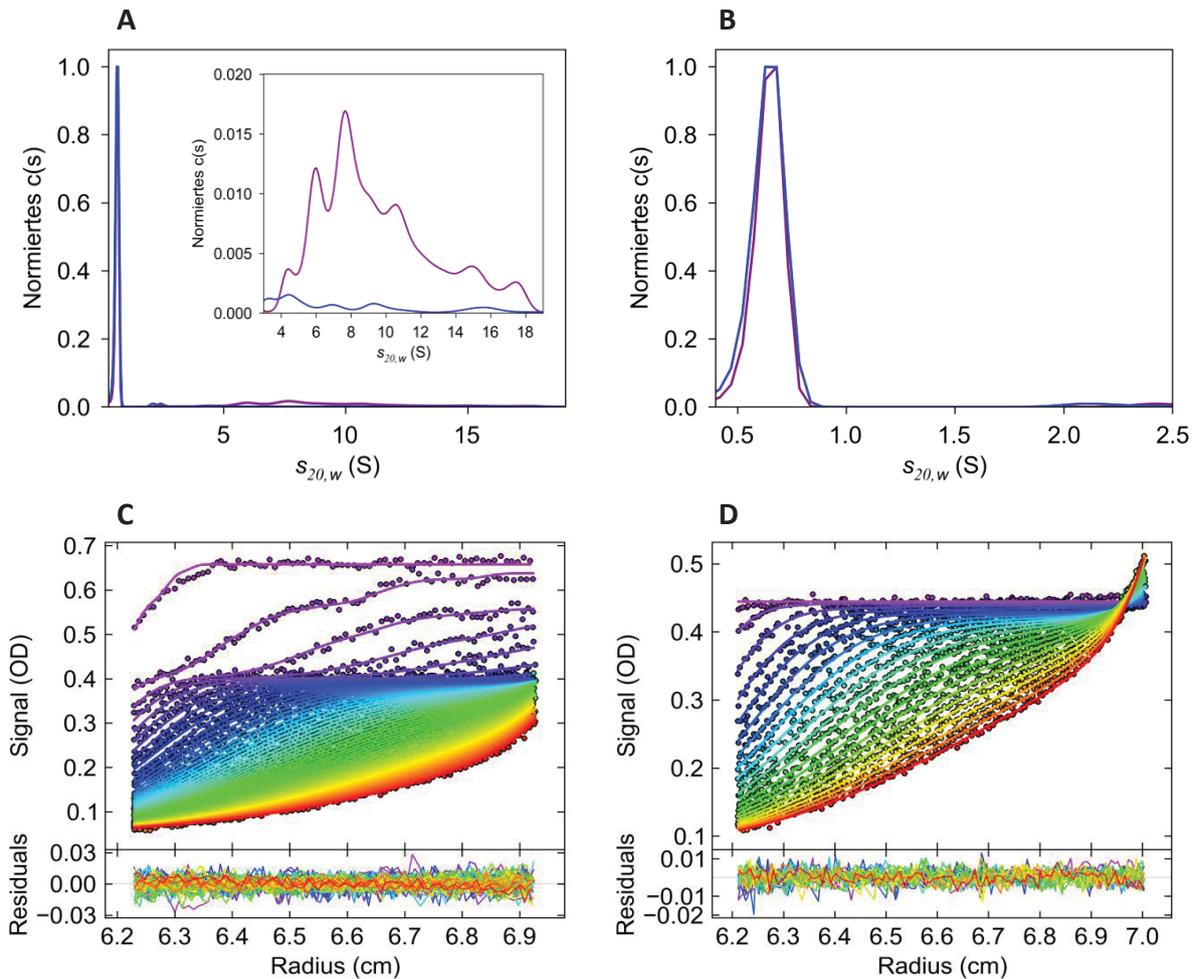


Abbildung 5.2.1.1: Äquimolarer SV-Lauf von 20 μM A β 42 mit D3 im Einwellenlängendetektionsmodus bei 225 nm. A und B zeigen die $s_{20,w}$ -Verteilung von 20 μM A β 42 alleine (violett) und äquimolar dazu mit D3 (blau) in 50 mM NaPi pH 7,4. Die Normierung der Verteilungen erfolgte auf ihre maximalen Werte. Für den Fitprozess wurde eine s -Wertaufösung von 0,05 S gewählt. C und D zeigen die Sedimentationsprofile von 20 μM A β 42 alleine bzw. in Anwesenheit der äquimolaren Menge an D3. Die Zugabe von D3 führt dazu, dass keine Sedimentationsfronten von größeren Aggregatspezies mehr detektiert werden, was sich in einer veränderten s -Wertverteilung im Bereich ab 3 S bemerkbar macht (A).

Die Probenherstellung und der Versuchsablauf entsprachen dem im Einwellenlängendetektionsmodus in Abbildung 5.2.1.1, allerdings erfolgte sowohl bei 230 nm, als auch bei 400 nm eine Absorptionsdetektion während der Zentrifugation. Da sich der Fluoreszenzmarker Dy405 nur am D3 befindet, wird dem entsprechend bei einer Wellenlänge von 400 nm nur das Sedimentationsverhalten des D3Dy405 gemessen, wohingegen bei 230 nm das Absorptionssignal von A β 42 und D3Dy405 detektiert wird. In Abbildung 5.2.1.2 werden die Ergebnisse des äquimolaren SV-Laufs von 20 μM A β 42 mit D3Dy405 im Zweiwellenlängendetektionsmodus bei 230 nm und 400 nm in 50 mM NaPi pH 7,4 dargestellt. Tabelle 5.2.1 gibt eine Übersicht der $s_{20,w}$ -Werte mit den dazugehörigen Formparametern von 20 μM A β 42 alleine, mit äquimolar D3Dy405 und D3Dy405 alleine.

5.2 | A β 42-D-Peptid-Wechselwirkung

Tabelle 5.2.1: Übersicht der $s_{20,w}$ -Werte und f/f_0 -Werte von 20 μ M A β 42 mit äquimolar D3Dy405 im Zweiwellenlängendetektionsmodus bei 230 nm und 400 nm.

	$s_{20,w}$ -Wert (S)	f/f_0
A β 42-Monomer	0,7	1,49
A β 42-D3-Probe $\lambda = 230$ nm	0,7	1,39
A β 42-D3-Probe $\lambda = 400$ nm	1,1	1,18

Abbildung 5.2.1.2 A zeigt die $s_{20,w}$ -Verteilung von 20 μ M A β 42 alleine bei 230 nm Detektionswellenlänge und C das dazugehörige Sedimentationsprofil. Wie zuvor in Abbildung 5.2.1.1 A und C wird eine relativ große Bandbreite an verschiedenen s -Wertspezies gemessen. Angefangen von einem deutlichen Monomerpeak bei ca. 0,7 S, gefolgt von einer heterogen verteilten s -Wertspeziesverteilung bis 15 S. Auch hier sind in Abbildung 5.2.1.2 C die ersten Sedimentationsfronten auffällig, in denen sich große A β 42-Aggregate früh zum Zeitpunkt der Zentrifugation zum Boden der Messzelle bewegen und die Absorption der Grenzschicht von initial ca. 0,7 OD auf etwa 0,4 OD abfällt. Die folgenden Sedimentationsfronten können erneut dem A β 42-Monomer zu geordnet werden. Der Formparameter f/f_0 dieser Probe liegt bei 1,49. Abbildung 5.2.1.2 B zeigt die s -Wertverteilung der äquimolaren Probe aus 20 μ M A β 42 (violett, 230 nm) mit D3Dy405 (blau, 230 nm und cyan, 400 nm). Die deutlich abweichende Lokalisation des Peaks bei 400 nm mit ca. 1,1 S in Bezug zu den beiden Peaks bei 230 nm, bei ca. 0,7 S, belegt die Bindung des D3Dy405 an A β 42. Während bei 230 nm unabhängig einer Bindung das Signal von A β 42 und D3Dy405 gemessen wird (blau), erfolgt bei 400 nm die Absorptionsdetektion des Dy405. Nur bei einer direkten Bindung des D3Dy405 an A β 42 kann der s -Wert bei ca. 1,1 S liegen, da D3Dy405 alleine einen $s_{20,w}$ -Wert von 0,4 S aufweist. Zudem kommt es zu einer deutlichen Reduktion des Formparameters f/f_0 von 1,39 der äquimolaren Probe der beiden Peptide bei 230 nm zu einem f/f_0 -Wert von 1,18 der äquimolaren Probe bei 400 nm, was auf eine globulärere Form des Komplexes schließen lässt. Das in Abbildung 5.2.1.2 D gezeigte Sedimentationsprofil untermauert die Erhöhung des Monomerpeaks in der Probe mit äquimolar 20 μ M A β 42 und D3Dy405, da Dy405 ebenfalls bei 230 nm absorbiert und die Startabsorption bei 0,6 OD liegt. Neben dem prägnanten Monomerpeak und dem 400 nm Peak des Komplexes aus D3Dy405 und A β 42 sind im Bereich über 1,5 S einige kleine Peakbereiche zu erkennen, bei denen es sich vermutlich um kleine Zusammenlagerungen des A β 42 alleine oder zusammen mit D3Dy405 handeln könnte. Auf Basis der durchgeführten SV-Läufe kann diesbezüglich jedoch keine Aussage getroffen werden.

5.2 | A β 42-D-Peptid-Wechselwirkung

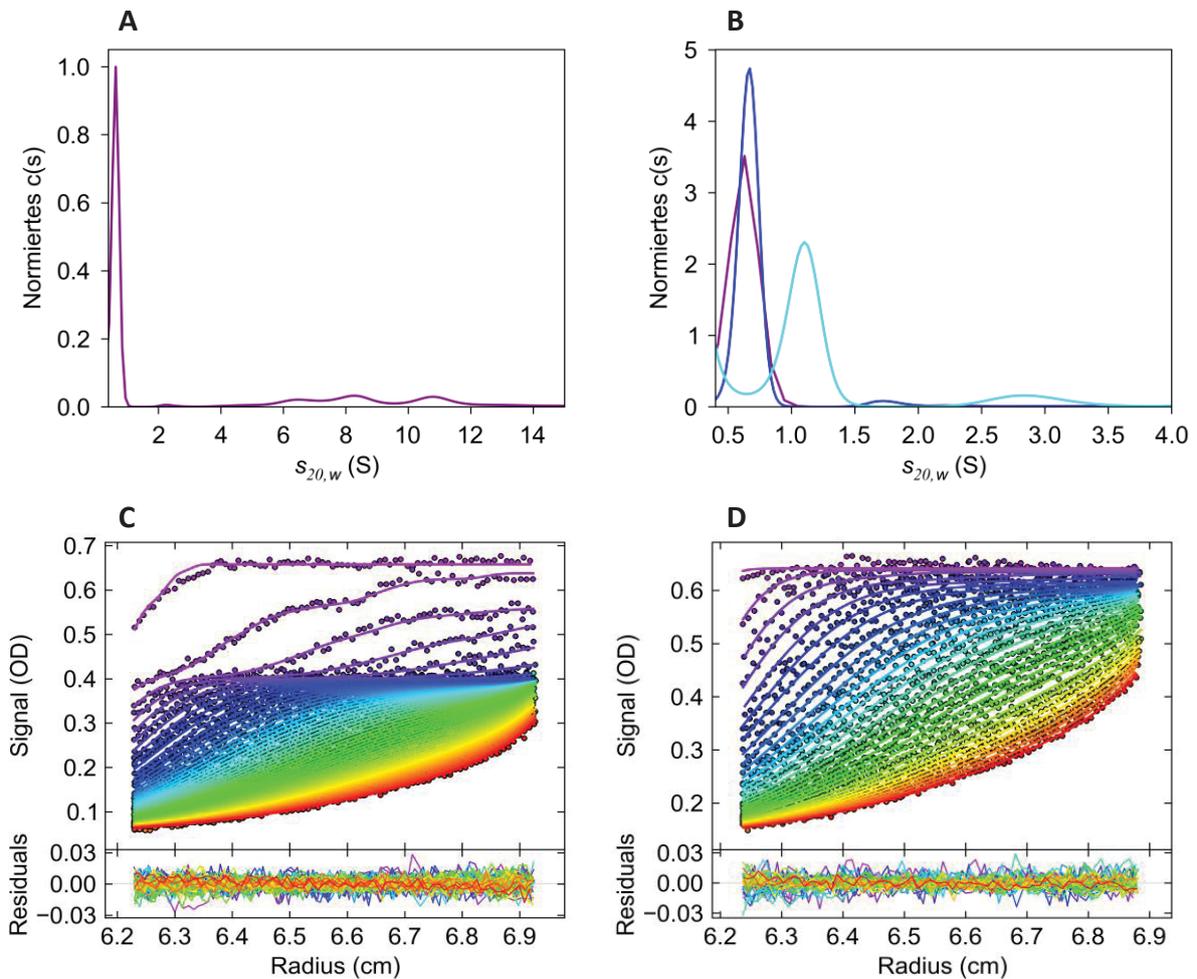


Abbildung 5.2.1.2: Äquimolarer SV-Lauf von 20 μ M A β 42 mit D3Dy405 im Zweiwellenlängen-detektionsmodus bei 230 nm und 400 nm in 50 mM NaPi, pH 7,4. A zeigt die auf den maximalen Wert normierte Verteilung von 20 μ M A β 42 alleine bei 230 nm Detektionswellenlänge und C das dazugehörige Sedimentationsprofil. Für den Fitprozess wurde eine s -Wertaufösung von 0,05 S gewählt. B zeigt die auf die Fläche normierte Verteilungen von 20 μ M A β 42 (violett, 230 nm) mit 20 μ M hinzugegebenem D3Dy405 (230 nm blau und 400 nm cyan). Bei 400 nm Detektionswellenlänge wird spezifisch nur das Signal des Fluoreszenzmarkers Dy405 gemessen. Die deutlich abweichende Lokalisation des Peaks bei 400 nm zu 230 nm belegt die Bindung des D3Dy405 an A β 42, da D3Dy405 alleine keinen s -Wert über 1 S hat. Das Sedimentationsprofil in D, gemessen bei 230 nm, untermauert eine Veränderung der s -Wertverteilung des A β 42 in äquimolarer Anwesenheit von D3Dy405.

5.2 | A β 42-D-Peptid-Wechselwirkung

5.2.2 Wechselwirkungsuntersuchung mittels Fluoreszenzdetektion

Durch die Herabsetzung der A β 42-Konzentration in einen Bereich, in dem nur Monomere vorliegen und damit Aggregationsprozesse minimiert werden, wurde folgend versucht, Konkurrenzreaktionen zu der A β 42-Monomerbindung durch D3 zu verhindern. Hierzu wird die Fluoreszenzdetektion in Kombination mit FITC-markiertem A β 42 und D3 verwendet. Die Verwendung der Fluoreszenzoptik in der AUZ ermöglicht die selektive Detektion von fluoreszenzmarkierten Makromolekülen bis in den nanomolaren Konzentrationsbereich. Werden folgend keine anderen Angaben gemacht, enthielten alle hier analysierten Proben 1 μ M FITC-A β 42.

Neben dem bisher verwendeten 50 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 7,4) wurden noch weitere Puffer getestet, um eine Komplexbildung von A β 42 und D3 zu favorisieren. Es wurden 10 μ M A β 42 Proben (1 μ M FITC-A β 42 mit 9 μ M A β 42) alleine und mit Zugabe von 10 μ M D3 analysiert (Abbildung 5.2.2.1). Die Zentrifugation erfolgte bei 50.000 rpm in 10 mM NaP, pH 7,4. Tabelle 5.2.2.1 gibt eine Übersicht der $s_{20,w}$ -Werte mit den dazugehörigen Formparametern und den Molekulargewichten der beiden analysierten Proben. Abbildung 5.2.2.1 A stellt die gemessenen $s_{20,w}$ -Verteilungen dar. Es ist ein deutlicher Unterschied zwischen der s -Wertverteilung des FITC-A β 42 alleine (violett) und bei äquimolarer Zugabe an D3 (blau) bezüglich des s -Wertes der Hauptspezies zu erkennen. In Gegenwart von D3 liegt der s -Wert der Hauptspezies bei ca. 1 S. Es erfolgte eine s -Wertverschiebung zu einem $s_{20,w}$ -Wert von ca. 0,7 S hinzu ca. 1 S, ähnlich wie er bereits in Abbildung 5.2.1.2 B bei der Verwendung von Dy405-markiertem D3 im Zweiwellenlängendetektionsmodus. Ebenfalls wie bei der Verwendung von D3Dy405 kommt es auch hier zu einer Verringerung des f/f_0 -Wertes von 1,4 ohne D3-Zugabe zu einem f/f_0 -Wert von 1,29 bei Zugabe von äquimolar 10 μ M D3 (Tabelle 5.2.2.1). Zudem kommt es in Anwesenheit von 10 μ M D3 zur Bildung einer größeren $s_{20,w}$ -Wertspezies von ca. 2,4 S. Wie bereits bei vorangegangenen Experimenten, könnte es sich hier um Zusammenlagerungen des A β 42 alleine oder mit D3 handeln. Abbildung 5.2.2.1 B zu C zeigen die unterschiedlichen Muster der Sedimentationsfronten ohne D3 (B) und mit D3 (C).

Tabelle 5.2.2.1: Übersicht der $s_{20,w}$ -Werte, Molekulargewichte (g/mol) und f/f_0 -Werte von insgesamt 10 μ M A β 42 mit äquimolar D3.

	$s_{20,w}$ -Wert (S)	Molekulargewicht (g/mol)	f/f_0
FITC-A β 42-Monomer	0,7	4656	1,4
FITC-A β 42-D3-Probe	1	6392	1,29

5.2 | A β 42-D-Peptid-Wechselwirkung

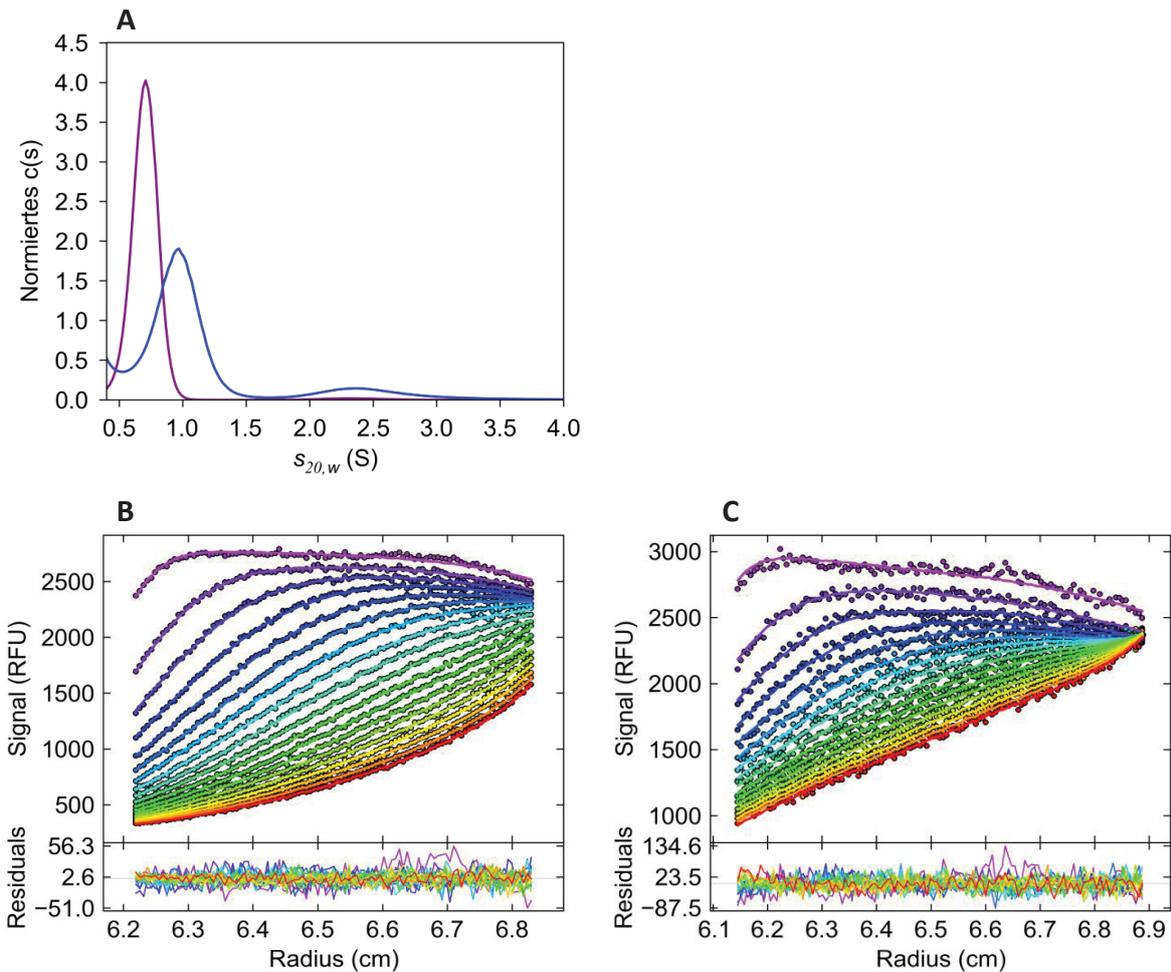


Abbildung 5.2.2.1: SV-Lauf mit Fluoreszenzdetektion von insgesamt 10 μ M A β 42 in äquimolarer Anwesenheit von D3. Die Zentrifugation erfolgte bei 50.000 rpm in 10 mM NaP_i pH 7,4. Es ist ein signifikanter Unterschied zwischen der $s_{20,w}$ -Wertverteilung des FITC-A β 42 alleine (violett) und der Peptidmischung (blau) bezüglich der Lokalisation des FITC-A β 42-Monomerpeaks zu erkennen. Es erfolgte eine $s_{20,w}$ -Wertverschiebung zu einem $s_{20,w}$ -Wert über 1 S. Zudem kommt es in Anwesenheit von 10 μ M D3 zur Bildung einer größeren $s_{20,w}$ -Wertspezies von ca. 2,4 S. Die Normierung der Verteilungen erfolgte auf die Fläche. B zu C zeigen die unterschiedlichen Muster der Sedimentationsfronten ohne D3 (B) und mit D3 (C).

Wie im Methodenteil bereits erwähnt, ermöglichen die hier verwendeten Softwarepakete nicht nur die Auswertung von AUZ-bezogenen Messdaten, sondern ermöglichen es auch, Simulationen von Messdaten durchzuführen. Dies wurde bei dem Bindungsnachweis von A β 42 mit dem D3-Peptid ebenfalls durchgeführt. Dafür wurde die Simulationsfunktion von UltraScan III verwendet und die in Tabelle 5.2.2.2 verwendeten Startparameter angegeben, auf deren Basis der Sedimentationskoeffizient von FITC-A β 42 alleine, D3 alleine und dem Komplex aus FITC-A β 42 und D3 simuliert wurde. Dabei wurde immer von der Form einer idealen Kugel ($f/f_0 = 1$), einer Eins-zu-Eins- bzw. Eins-zu-Zwei-Stöchiometrie von FITC-A β 42 zu D3 und von den Standardbedingungen von Wasser als Lösungsmittel und einer Temperatur von 20 °C ausgegangen.

5.2 | A β 42-D-Peptid-Wechselwirkung

Tabelle 5.2.2.2: Simulationsergebnisse einer FITC-A β 42-Monomer-D3-Komplexbildung mittels UltraScan III.

	Molekulargewicht (g/mol)	Partiell spezifische Volumen (cm ³ /g)	$s_{20,w}$ -Wert (S)
FITC-A β 42-Monomer	4904	0,738	1,01
D3	1599	0,705	0,55
FITC-A β 42-Monomer-D3-Komplex	6504	0,732	1,25
FITC-A β 42-Monomer-2xD3-Komplex	8101	0,719	1,52

Beim Vergleich der Tabellen 5.2.2.1 und 5.2.2.2 wird die Differenz zwischen dem simulierten und gemessenen $s_{20,w}$ -Wert für das FITC-A β 42-Monomer deutlich. Diese Differenz kann auf die zugrundeliegenden unterschiedlichen f/f_0 -Werte zugeführt werden. Im Fall der Simulation wird von einer idealen Kugel, mit kleinstmöglichem Reibungswiderstand ausgegangen, wobei der Fittprozess für das FITC-A β 42-Monomer ein f/f_0 -Wert von 1,4 ergab. Ein Vergleich der simulierten und gemessenen $s_{20,w}$ -Werte für einen Komplex aus dem FITC-A β 42-Monomer und D3 untermauert die Schlussfolgerung, dass es wie bereits bei der 20 μ M äquimolaren Probe aus A β 42 und D3Dy405 (Abbildung 5.2.1.2) auch hier zu einem erfolgreichen Komplexbildungsnachweis aus dem A β 42-Monomer und D3 kam. Bei der Betrachtung der simulierten s -Werte für einen Komplex mit einer Eins-zu-Eins- bzw. Eins-zu-Zwei-Stöchiometrie wurde ein $s_{20,w}$ -Wert von 1,25 S bzw. 1,52 S errechnet. Unter Beachtung der f/f_0 -Differenzen und dem daraus resultierenden Einfluss auf die s -Wertverteilung, kann auf eine Eins-zu-Eins-Stöchiometrie des Komplexes aus FITC-A β 42-Monomer und D3 geschlossen werden. Außerdem wurde mittels UltraScan II die Simulation eines SV-Laufs mit dem FITC-A β 42-Monomer und dem Komplex mit D3 mit den in Tabelle 5.2.2.3 aufgeführten Parametern durchgeführt. Dies sollte dem Nachweis dienen, dass es auf Basis einer anschließenden Auswertung mit dem $c(s)$ -Modell in SEDFIT möglich ist die beiden s -Wertspezies für das A β 42-Monomer und den Komplex aufzulösen, wenn diese beide in der Probe vorhanden sind. Die Simulation erfolgte auf Basis des Modells zweier idealer, nicht-interagierender Komponenten mit jeweils 0,5 OD Konzentration und den Standardbedingungen von Wasser als Lösungsmittel und einer Temperatur von 20 °C. Die simulierte Zentrifugation erfolgte bei 60.000 rpm für 20 h mit einer Aufnahme von 300 Scans und einer radialen Auflösung von 0,003 cm. Die Meniskus- bzw. Bodenposition wurden bei 5,9 bzw. 7,2 cm festgelegt und bei der anschließenden Auswertung mit dem $c(s)$ -Modell nicht gefittet.

5.2 | A β 42-D-Peptid-Wechselwirkung

Tabelle 5.2.2.3: Simulationsparameter für einen SV-Lauf mit dem FITC-A β 42-Monomer und dem FITC-A β 42-Monomer-D3-Komplex mit UltraScan II auf Basis des Modells zweier idealen, nicht-interagierender Komponenten mit jeweils 0,5 OD Startkonzentration.

	Molekulargewicht (g/mol)	Partiell spezifische Volumen (cm ³ /g)	$s_{20,w}$ -Wert (S)	f/f ₀
FITC-A β 42-Monomer	4900	0,738	0,69	1,46
FITC-A β 42-Monomer-D3-Komplex	6500	0,732	1,04	1,2

Abbildung 5.2.2.2 stellt die $s_{20,w}$ -Wertverteilung des simulierten SV-Laufs mit den in Tabelle 5.2.2.3 aufgeführten Parametern, ausgewertet auf Basis des $c(s)$ -Modells in SEDFIT, dar. Es ist eine klare Peaktrennung zwischen dem FITC-A β 42-Monomer zu zuordnenden Peak bei ca. 0,73 S und dem FITC-A β 42-Monomer-D3-Komplex zu zuordnenden Peak bei ca. 1,13 S zu erkennen. Die Auswertung der simulierten Daten ergab für den 0,73 S Peak eine Konzentration von 0,68 OD mit einem Molekulargewicht von 4,67 kDa. Für den 1,13 S Peak wurden 0,28 OD Konzentration und ein Molekulargewicht von 9,13 kDa berechnet. Dem zugrunde liegt ein f/f₀-Wert von 1,38.

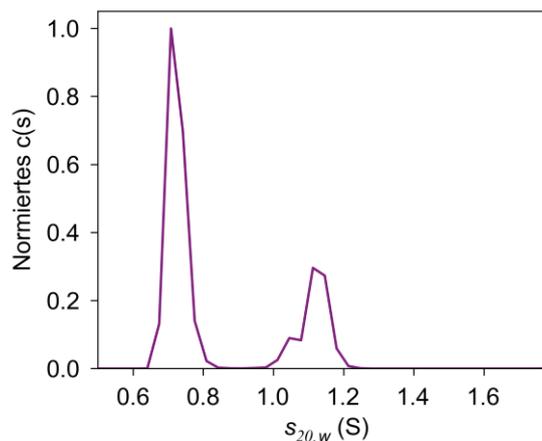


Abbildung 5.2.2.2: $s_{20,w}$ -Wertverteilung des simulierten SV-Laufs mit den in Tabelle 5.2.2.3 aufgeführten Parametern, ausgewertet auf Basis des $c(s)$ -Modells in SEDFIT. Dem Fit wurden die Standardbedingungen von Wasser als Lösungsmittel, 20 °C Temperatur, das partiell spezifische Volumen von 0,73 cm³/g und 0,03 S Auflösung zugrunde gelegt. Es ist eine signifikante Trennung zwischen der $s_{20,w}$ -Werte des simulierten FITC-A β 42-Monomer bei ca. 0,73 S und dem FITC-A β 42-Monomer-D3-Komplex mit ca. 1,13 S zu erkennen. Die Normierung der Verteilungen erfolgte auf den maximalen Wert.

Ein Vergleich mit den für die Simulation gewählten Parametern macht deutlich, dass es möglich ist die beiden simulierten s -Wertspezies mit einer anschließenden $c(s)$ -basierten Auswertung erneut zu fitten.

5.2 | A β 42-D-Peptid-Wechselwirkung

Abweichungen zwischen den initialen Parametern, besonders bei dem Molekulargewicht der beiden Spezies und den durch den Fit erhaltenen Werte können durch unterschiedliche f/f_0 -Werte erklärt werden, die für eine Simulation speziesspezifisch gewählt werden, bei der Auswertung mit dem $c(s)$ -Modell allerdings global für die komplette Probe erhalten wird. Darüber hinaus erfolgt eine konzentrationsbezogene Überbewertung des in der Probe enthaltenden FITC-A β 42-Monomers im Vergleich zu dem Komplex.

Zur Erhöhung der Komplexkonzentration wurde das Verhältnis von D3 zu A β 42 von 1:1 auf 10:1 im folgenden Experiment erhöht. Die A β 42-Gesamtkonzentration wurde auf 1 μ M FITC-A β 42 reduziert, die D3-Konzentration bei 10 μ M konstant gehalten. Die Zentrifugation erfolgte bei 50.000 rpm in PBS (Abbildung 5.2.2.3), statt zuvor in den beiden Natriumphosphat-Puffern. Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen den $s_{20,w}$ -Werten der Hauptspezies in beiden Proben messbar. Allerdings ist der s -Wert des A β 42-Monomers in der Probe ohne D3 in PBS bereits höher als in der Probe im Natriumphosphat-Puffer. Auffällig ist zudem ein Unterschied in der größeren s -Wertspezies, welche in der Probe ohne D3 (violette Kurve) auf ein Oligomer von A β 42 zurückzuführen ist und in der Probe mit D3 (blaue Kurve) auch D3 als Komponente enthalten könnte. Der Monomerpeak liegt hier um etwa 0,15 S höher, als in den $s_{20,w}$ -Wertverteilungen zuvor. Dies wurde bereits in Kapitel 4.1 erläutert. Betrachtet man die gesamte $s_{20,w}$ -Wertverteilung, erkennt man weitere kleine Aggregate, die sich, neben der relativ prägnanten 2 S Spezies, innerhalb der 20-stündigen Vorinkubation gebildet haben. Aus anderen AUZ-Experimenten ist bekannt, dass es sich bei PBS um einen aggregationsfördernden Puffer handelt. Allerdings kann hier aufgrund des f/f_0 -Wertes der Probe, der bei weniger heterogenen Verteilungen durchaus als Interpretationshilfe herangezogen werden kann, keine weiteren Aussagen gemacht werden, da dieser in Bezug auf die komplette s -Wertverteilung zu sehen ist.

Neben Interaktionsstudien mit FITC-markiertem A β 42 wurde auch FITC-markiertes D3-Peptid (FITC-D3) zum Komplexnachweis mit dem A β 42-Monomer getestet. Der Einsatz von FITC-D3 würde aufgrund eines größeren Molekulargewichtsunterschiedes zwischen freiem FITC-D3 und im Komplex gebundenem FITC-D3 zu deutlich größeren s -Wertdifferenzen führen. Abbildung 5.2.2.4 stellt, exemplarisch für alle mit FITC-D3 durchgeführten Experimente, die Messdaten eines SV-Laufs von 1 μ M FITC-D3 mit 2 μ M A β 42 bei 50.000 rpm in 10 mM HEPES, 137 mM NaCl, 0,01 % Tween 20, pH 7,4 dar. Aufgrund des nicht-idealen Sedimentationsverhaltens der Probestandteile kann, trotz Zugabe von 0,01 % Tween 20 zur Verringerung möglicher unspezifischer Oberflächenadsorptionsprozesse, keine Auswertung der Messdaten erfolgen und der Einsatz von FITC-markiertem D3 für einen Komplexbildungsnachweis mit dem A β 42-Monomer ist nicht geeignet.

5.2 | A β 42-D-Peptid-Wechselwirkung

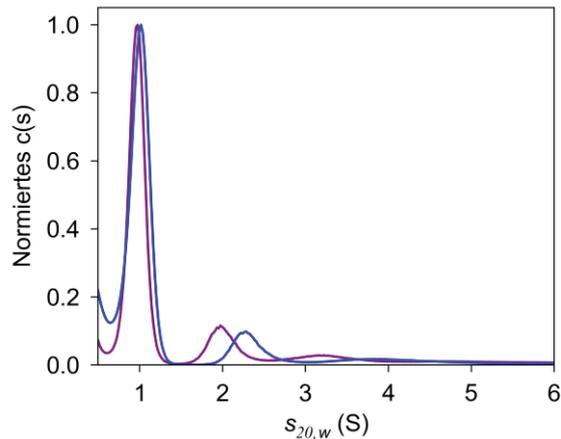


Abbildung 5.2.2.3: SV-Lauf mit Fluoreszenzdetektion von 1 μ M FITC-A β 42 mit 10-fachem Überschuss an D3. Die Zentrifugation erfolgte bei 50.000 rpm in PBS. Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen der $s_{20,w}$ -Wertverteilung des FITC-A β 42 alleine (violett) und der Peptidmischung (blau) bezüglich der Lokalisation des FITC-A β 42-Monomerpeaks zu erkennen. Lediglich die größere $s_{20,w}$ -Wertspezies verschiebt sich von ca. 2 S ohne D3 auf ca. 2,3 S bei Zugabe von D3. Die Normierung der Verteilungen erfolgte auf ihre maximalen Werte.

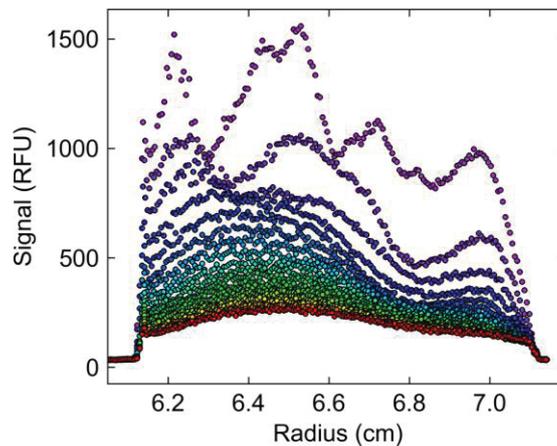


Abbildung 5.2.2.4: SV-Lauf mit Fluoreszenzdetektion von 1 μ M FITC-D3 mit 2 μ M A β 42. Die Zentrifugation erfolgte bei 50.000 rpm in 10 mM HEPES, 137 mM NaCl, 0,01 % Tween 20, pH 7,4. Aufgrund nicht-idealen Sedimentationsverhaltens der Probe kann keine Auswertung der Messdaten erfolgen.

Am Ende dieses Kapitels kann zusammengefasst werden, dass es mittels des Einsatzes der AUZ erfolgreich gelungen ist, frei in Lösung eine Monomerbindung von D3 an A β 42 bis in den zweistelligen mikromolaren Bereich nachzuweisen. Durch die Verwendung der Fluoreszenzoptik konnte eine A β 42-Monomerbindung von D3 bei einem äquimolaren Konzentrationsverhältnis von 10 μ M der beiden Peptide nachgewiesen werden.

6 Charakterisierung der Größenverteilung und Ligandenwechselwirkung von Nanopartikeln

6.1 Charakterisierung der Größenverteilung von HSA-Nanopartikeln

Nachdem in Kapitel 5.1 die Wechselwirkung von A β 42 mit monomerem HSA untersucht wurde, soll folgend die Charakterisierung der Größenverteilung von HSA-Nanopartikeln (HSA-NP) und deren Wechselwirkung mit A β 42 vorgestellt werden. Alle hier untersuchten HSA-NP-Lösungen wurden vom Arbeitskreis um Prof. Jörg Lahann, KIT, Institut für Funktionelle Grenzflächen, hergestellt [52]. Entgegen den bisherigen Ergebnissen handelt es sich, wenn nicht ausdrücklich anders erwähnt, bei den *s*-Wertverteilungen in diesem Kapitel immer um apparente *s*-Werte, da die zugrundeliegenden Fitmodelle apparente *s*-Werte liefern (3.2.3.2). Auf Basis der gemessenen *s*-Werte, der Annahme einer sphärischen Form der Partikel und der folgend aufgeführten Formel [53] kann zudem der Durchmesser (*d*) der HSA-NP berechnet werden. Dabei werden für die HSA-NP und daran bindende peptidbasierte Liganden eine Dichte von 1,36 g/cm³ angenommen. Zudem kann auf Basis der angenommenen Dichte von 1,36 g/cm³ eine Berechnung der *s*_{20,w}-Werte der NP erfolgen.

$$\text{Durchmesser } (d) \text{ (cm):} \quad d = \sqrt{\frac{18 \eta_{L\ddot{o}} s_{NP}}{\rho_{NP} - \rho_{L\ddot{o}}}}$$

mit: $\eta_{L\ddot{o}}$ = Viskosität des Lösungsmittels (g/cm sec)

ρ_{NP} = Dichte der HSA-NP (g/cm³)

$\rho_{L\ddot{o}}$ = Dichte des Lösungsmittels (g/cm³)

s_{NP} = Sedimentationskoeffizient der HSA-NP (10⁻¹³ s)

Zur ersten Charakterisierung der Größenverteilung der HSA-NP wurde ein SV-Lauf in einer 47-prozentigen Saccharoselösung bei 3.000 rpm und 20 °C durchgeführt, um die Sedimentation von sehr großen HSA-NP zu verlangsamen [54]. Dies eröffnet ein ausreichend großes Zeitfenster zur Detektion des Sedimentationsverhaltens der HSA-NP. Entgegen der in der Literatur beschriebenen Trübungsdetektion bei 420 nm [54] erfolgte hier die Detektion bei 230 nm, da die HSA-NP-Konzentration zu niedrig war und bei 420 nm keine ausreichende Signalintensität erreicht wurde. In Abbildung 6.1.1 (rechts) wird das Sedimentationsverhalten der HSA-NP anhand der aufgenommenen Sedimentationsfronten veranschaulicht. Links wird die zugehörige *Is-g*(s)*-Verteilung der HSA-NP dargestellt, die auf ihren maximalen Wert normiert ist. Es ist ein deutlicher Peak bei ca. 300 S zu erkennen, dem sich eine heterogen, niedrigkonzentrierte *s*-Wertspeziesverteilung bis zu 3.500 S anschließt.

6.1 | Charakterisierung des Größenverteilung von HSA-Nanopartikeln

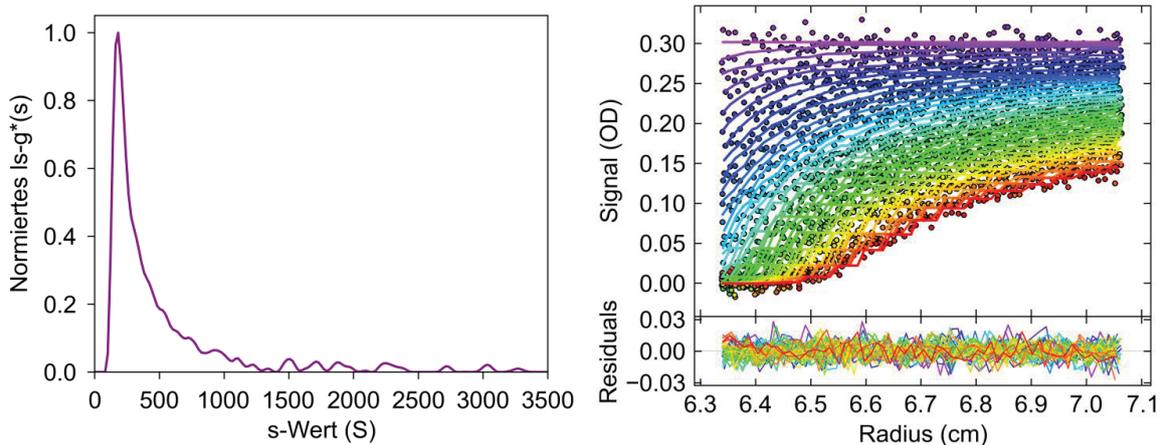


Abbildung 6.1.1: $Is-g^*(s)$ -Verteilung (links) und Sedimentationsprofile (rechts) von HSA-NP in einer 47-prozentigen Saccharoselösung. Die Zentrifugation erfolgte bei 20 °C und 3.000 rpm. Detektiert wurde die Absorption der HSA-NP bei 230 nm. Die $Is-g^*(s)$ -Verteilung wurde auf ihren maximalen Wert normiert. Der Hauptpeak der Verteilung liegt bei ca. 300 S mit einer sich anschließenden heterogen, niedrigkonzentrierten s -Wertspeziesverteilung bis zu 3.500 S.

Um eine größere Auflösung bezüglich des s -Wertes der in Abbildung 6.1.1 dargestellten s -Wertverteilung der HSA-NP zu erhalten, wurde ein mehrstufiger Sedimentationsgeschwindigkeitslauf (MSV-Lauf) analog zu dem vorherigen Experiment bei 20 °C in einer 47-prozentigen Saccharoselösung durchgeführt (Abbildung 6.1.2). Dafür wurden 5 Geschwindigkeitsstufen gewählt. Begonnen wurde für die Auflösung sehr großer s -Wertspezies mit 3.000 rpm (blau) und 1.500 rpm (orange), gefolgt von 6.000 rpm (violett) und 8.000 rpm (grün) und zum Schluss 13.000 rpm (rot). Detektiert wurde die Absorption der HSA-NP bei 235 nm. Aufgrund der sehr breiten s -Wertverteilung erfolgte eine Skalierung der s -Werte mittels einer logarithmischen Auftragung. Wie bereits in Abbildung 6.1.1 zu sehen ist, besitzt die Verteilung ein Maximum bei ca. 280 S ($\ln 280 = 5,6$). Die Durchführung des MSV-Laufs liefert im Vergleich zu dem normalen SV-Lauf zuvor, noch zusätzlich die Auflösung eines zweiten, kleineren Peaks bei ca. 3.400 S ($\ln 3.400 = 8,1$). Die Durchführung eines MSV-Laufs mit polydispersen HSA-NP-Präparationen liefert somit deutlich mehr Informationen über die in der Probe enthalten sehr unterschiedlichen s -Wertspezies, als dies ein SV-Lauf bei nur einer Geschwindigkeit, unter den sonst gleichen Versuchsbedingungen, leisten kann. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde im weiteren Verlauf der Arbeiten mit HSA-NP standardmäßig ein MSV-Lauf durchgeführt, um eine möglichst effektive und effiziente Charakterisierung der Probe durchzuführen. Zudem wurden für die drei markantesten s -Wertspezies in den Abbildungen 6.1.1 und 6.1.2 die Partikeldurchmesser berechnet (Tabelle 6.1.1).

6.1 | Charakterisierung der Größenverteilung von HSA-Nanopartikeln

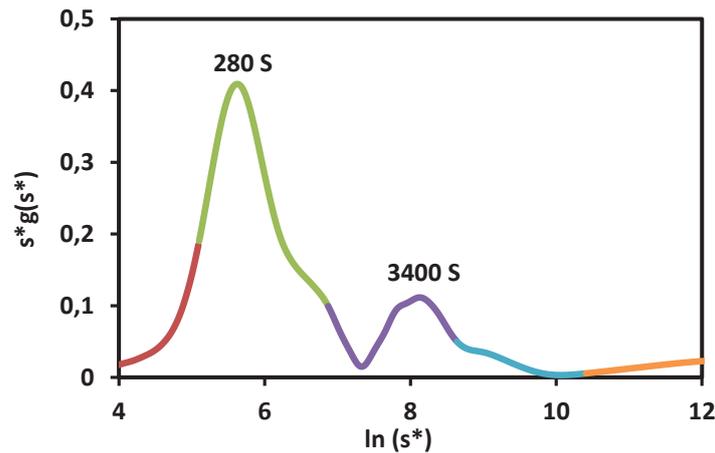


Abbildung 6.1.2: $s^*g(s^*)$ -Verteilung eines mehrstufigen Sedimentationsgeschwindigkeitslaufs (MSV-Lauf) von HSA-NP in einer 47-prozentigen Saccharoselösung bei einer radialen Position von 6,5 cm. Die Zentrifugation erfolgte bei 20 °C und den in der Grafik von links nach rechts folgenden Geschwindigkeitsstufen: 13.000 rpm (rot), 8.000 rpm (grün), 6.000 rpm (violett), 3.000 rpm (blau), 1.500 rpm (orange). Detektiert wurde die Absorption der HSA-NP bei 235 nm. Der Hauptpeak der Verteilung liegt bei ca. 280 S ($\ln 280 = 5,6$). Ein zweiter, kleinerer Peak liegt bei 3.400 S ($\ln 3.400 = 8,1$).

Tabelle 6.1.1: Berechnete HSA-NP-Durchmesser aus Abbildung 6.1.1 und 6.1.2 in jeweils 47-prozentiger Saccharoselösung bei 20 °C mit einer Dichte von 1,208 g/cm³ und einer Viskosität von 0,114 g/cm sec.

Abbildung	s-Wert (S)	$s_{20,w}$ -Wert (S)	Durchmesser (nm)
6.1.1	300	7.818	195
6.1.2	280	7.297	188
6.1.2	3.500	88.605	656

Wie bereits zu Beginn der Arbeit erläutert, war die Intention dieses Projekts die HSA-NP als Trägersystem für den Einsatz in der Alzheimer Therapie zu nutzen. Mithilfe der AUZ sollte zunächst eine größenspezifische Charakterisierung der HSA-NP-Präparationen durchgeführt werden, um anschließend eine spezifische Wechselwirkung mit A β 42 zu untersuchen. Um, analog zu dem HSA-Monomer in Kapitel 5.1, die Wechselwirkung der HSA-NP mit A β 42 auch im mikromolaren Konzentrationsbereich zu studieren, wurde eine Markierung der HSA-NP mit Fluoreszein (FITC-HSA-NP) initiiert. Auch hier wurde eine Größencharakterisierung der FITC-HSA-NP-Präparation mittels eines MSV-Laufs durchgeführt. Dieser erfolgte entsprechend der Fluoreszenzdetektion des FITC-Markers in der FDS-UZ bei 10 °C, um dadurch eine Erhöhung der Viskosität des 10 mM HEPES, 137 mM NaCl, 0,01 % Tween 20, pH 7,4 Puffers zu erreichen und eine damit einhergehende Verringerung der Sedimentationsgeschwindigkeit, ähnlich des Einsatzes der 47-prozentigen Saccharoselösung der nicht fluoreszenzmarkierten HSA-NP.

6.1 | Charakterisierung der Größenverteilung von HSA-Nanopartikeln

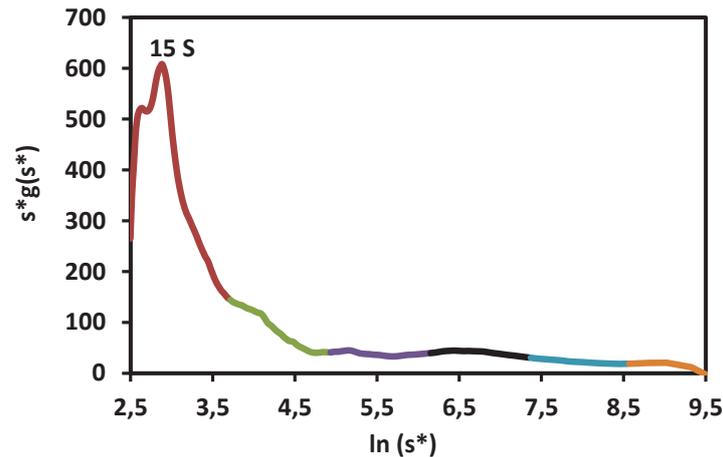


Abbildung 6.1.3: $s^*g(s^*)$ -Verteilung eines MSV-Laufs von FITC-markierten HSA-NP in 10 mM HEPES, 137 mM NaCl, 0,01 % Tween 20, pH 7,4 bei einer radialen Position von 6,5 cm. Die Zentrifugation erfolgte bei 10 °C in der FDS-UZ und den in der Grafik von links nach rechts folgenden Geschwindigkeitsstufen: 18.000 rpm (rot), 15.000 rpm (grün), 12.000 rpm (violett), 9.000 rpm (schwarz), 6.000 rpm (blau), 3.000 rpm (orange). Der Hauptpeak der Verteilung liegt bei ca. 15 S ($\ln 15 = 2,7$) mit einer sich anschließenden Verteilung von größeren s -Wertspezies ohne weiteren, distinkten Peak.

Es wurden, wie in Abbildung 6.1.3 dargestellt, 6 Geschwindigkeitsstufen gewählt: 18.000 rpm (rot), 15.000 rpm (grün), 12.000 rpm (violett), 9.000 rpm (schwarz), 6.000 rpm (blau) und 3.000 rpm (orange). Es ist ein sehr prägnanter Peak der Verteilung bei 18.000 rpm (rot) mit ca. 15 S ($\ln 15 = 2,7$) zu erkennen. Im Gegensatz zu den vorherigen MSV-Läufen wurden keine größeren s -Wertspezies gemessen. Nach der Charakterisierung der s -Wertverteilung der FITC-HSA-NP alleine, wurde die Wechselwirkung der Partikel mit A β 42 untersucht und dafür die in Abbildung 6.1.3 aufgeführten Geschwindigkeitsstufen genutzt. Den FITC-HSA-NP wurden steigende Konzentrationen an A β 42 hinzugegeben und vor Beginn der Zentrifugation eine 3-stündige Inkubation bei RT, in Ruhe durchgeführt, um zeitlich eine Wechselwirkung des A β 42 mit den FITC-HSA-NP zu ermöglichen. Diese Inkubation diente, wie bereits bei den A β 42-Ligandeninteraktionsstudien in Kapitel 5.1 und 5.2, einer Equilibrierung der sich neu bildenden s -Wertspezies aus den Interaktionspartnern. Abbildung 6.1.4 veranschaulicht die resultierenden s -Wertverteilungen bei einer Zugabe von 5 μ M A β 42 (gelbe, rechteckige Marker), 10 μ M (schwarze, dreieckige Marker) und 20 μ M (rote, kreisförmige Marker) A β 42 in 10 mM HEPES, 137 mM NaCl, 0,01 % Tween 20, pH 7,4. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die s -Wertverteilungen normiert und dafür das Maximum jeder Verteilung auf 100 % der mathematischen Lösung des Fitmodells gesetzt. Mit zunehmender A β 42-Konzentration ist eine kontinuierliche s -Wertverschiebung von 15 S ohne A β 42 (blaue Raute) nach 23 S bei Zugabe von 20 μ M A β 42 (roter Kreis) und eine Verbreiterung der Peaks zu erkennen (Abbildung 6.1.4 unten). Eine Anlagerung von A β 42 spiegelt sich zudem anhand der berechneten Durchmesser wider, die von 9,9 nm ohne A β 42-Zugabe auf 12 nm bei Zugabe von 20 μ M A β 42 ansteigen (Tabelle 6.1.2).

6.1 | Charakterisierung der Größenverteilung von HSA-Nanopartikeln

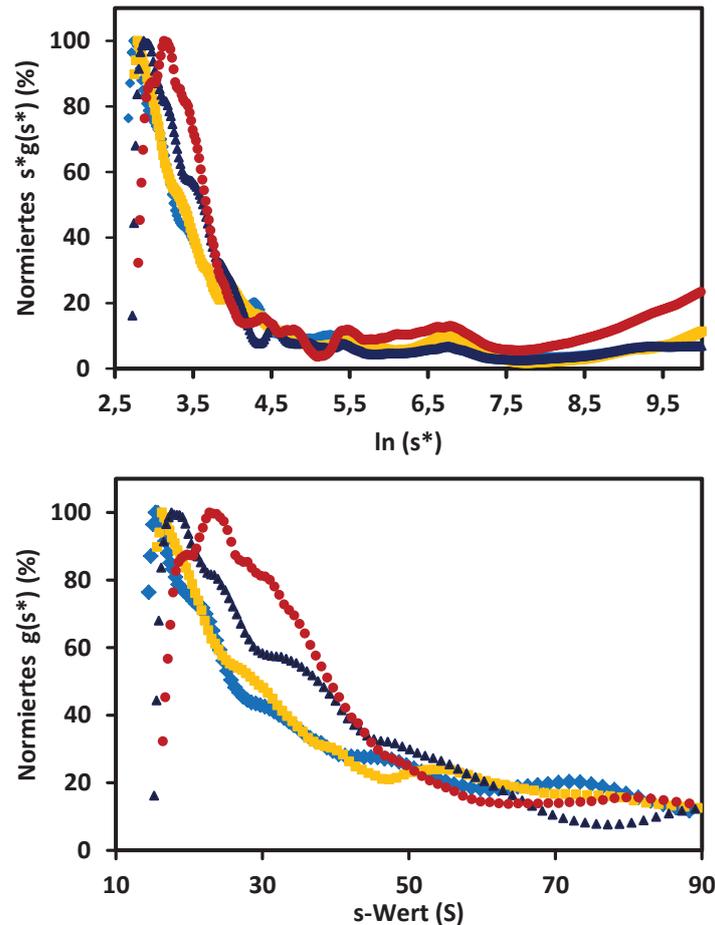


Abbildung 6.1.4: Wechselwirkungsnachweis für A β 42 mit FITC-markierten HSA-NP in einem MSV-Lauf bei einer radialen Position von 6,6 cm. Es erfolgte eine Zugabe von 5 μ M (gelbe, rechteckige Marker), 10 μ M (schwarze, dreieckige Marker) und 20 μ M (rote, kreisförmige Marker) A β 42 in 10 mM HEPES, 137 mM NaCl, 0,01 % Tween 20, pH 7,4 mit einer anschließenden Inkubation von 3 h, bei RT, in Ruhe. Die Zentrifugation erfolgte bei 10 °C und den in Abbildung 6.1.3 verwendeten Geschwindigkeitsstufen. Es wurde eine Normierung der Verteilungen auf ihren individuellen maximalen Wert durchgeführt. Mit steigender A β 42-Zugabe sind eine s -Wertverschiebung zu größeren s -Werten (unten) und eine Zunahme der Signalintensität bei s -Wertspezies im Bereich zwischen 245 – 22.000 S ($\ln 245 = 5,5$ bis $\ln 22.000 = 10$) zu erkennen (oben).

Im oberen Teil der Abbildung 6.1.4 wird der komplette analysierte s -Wertbereich in logarithmischer Skalierung dargestellt. Es ist besonders bei der Zugabe von 20 μ M A β 42 eine Erhöhung der Konzentration an s -Wertspezies im Bereich zwischen $\ln 5,5$ (245 S) und $\ln 10$ (22.000 S) zu erkennen, was die Schlussfolgerung erlaubt, dass eine Wechselwirkung von A β 42 nicht auf kleine HSA-NP beschränkt ist. Anzumerken ist jedoch, dass je größer ein Partikel in seiner ursprünglichen Form ist, desto mehr Ligand muss mit diesem Partikel interagieren, um eine Änderung des s -Werts messen zu können. Dies wurde bereits bei der Interaktionsstudie des HSA-Monomers mit A β 42 in Abbildung 5.1.3 erkennbar. Es ist also nicht ausgeschlossen, dass auch bei niedrigeren A β 42-Konzentrationen es zu einer Interaktion einzelner sehr großer FITC-HSA-NP mit A β 42 kommt, dies aber aufgrund einer Unterrepräsentation dieser sich neu gebildeten Spezies nicht messbar war.

6.1 | Charakterisierung der Größenverteilung von HSA-Nanopartikeln

Tabelle 6.1.2: Berechnete FITC-HSA-NP-Durchmesser der *s*-Wertverteilungspeaks bei steigender A β 42-Zugabe aus Abbildung 6.1.4 in 10 mM HEPES, 137 mM NaCl, 0,01 % Tween 20, pH 7,4 bei 10 °C mit einer Dichte von 1,0062 g/cm³ und einer Viskosität von 0,0133 g/cm sec.

A β 42-Konzentration (μ M)	<i>s</i> -Wert (S)	<i>s</i> _{20,w} -Wert (S)	Durchmesser (nm)
0	15	20	9,9
5	16	21,7	10,3
10	17	23	11
20	23	31	12

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass es mittels des Einsatzes der hier präsentierten mehrstufigen Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe und einer Erhöhung der Viskosität des Lösungsmittels, entweder durch eine Verringerung der Zentrifugationstemperatur oder dem Zusatz von Saccharose, erfolgreich gelungen ist, eine Charakterisierung von HSA-Nanopartikelpräparationen bezüglich ihrer Größenverteilung durchzuführen. Basierend auf den gemessenen *s*-Werten konnten zudem die Durchmesser von HSA-NP-Hauptspezies berechnet werden. Dieses erfolgreiche Charakterisierungsvorgehen zeigt, welche *s*-Wertbandbreite derartige HSA-NP-Präparationen abdecken können und lässt mit Blick auf die in der Einleitung (1.4.1) erörterte Problematik, des massiven Einflusses der Größe der NP selbst auf deren Eigenschaft, die Frage aufkommen, wie geeignet solch heterogene NP-Systeme für die Anwendung im humanmedizinischen Umfeld sind. Aber nicht nur mit Blick auf weitere Projekte mit solchen NP, sondern auch für die im Rahmen dieser Promotion zu legenden Grundsteine und Methodenetablierungen bei der Arbeit mit NP in der AUZ, muss kritisch hinterfragt werden, wie geeignet derartige NP sind. Nichts desto trotz konnte mit der erfolgreichen Etablierung der vorgestellten AUZ-basierten NP-Größencharakterisierung und dem Einsatz der Fluoreszenzdetektionsoptik erfolgreich eine im mikromolaren Bereich stattfindende Wechselwirkung der zuvor charakterisierten FITC-HSA-NP mit A β 42 nachgewiesen werden.

6.2 | Charakterisierung der Ligandenwechselwirkung mit Goldnanopartikeln

6.2 Charakterisierung der Ligandenwechselwirkung mit Goldnanopartikeln

Die beiden übergeordneten Ziele dieser Arbeit bestanden in einem AUZ-basierten Komplexbildungsnachweis aus A β 42 mit dem D3-Peptid und einer erfolgreichen Etablierung eines AUZ-basierten Mess- und Auswerteverfahrens zur quantitativen Bestimmung der Ligandenbindung an Nanopartikel.

Für die Etablierung dieser AUZ-basierten, quantitativen Charakterisierung ligandenmodifizierter NP wurde zusätzlich zu A β 42 BSA als Referenz-Ligand ausgewählt. Gründe für die Wahl von BSA waren: die umfangreiche allgemeine Charakterisierung von BSA als Standardprotein in der Wissenschaft [55, 56, 57] und eine bereits beschriebene aminosäurenvermittelte Bindung von BSA an Goldoberflächen [58], was als vereinfachtes Modell für eine Kopplung von Liganden an Goldnanopartikeloberflächen verstanden werden kann. Zudem besteht eine umfangreiche Homologie zwischen BSA und HSA, was zu einer breiten Akzeptanz von BSA als Modell für HSA führt [55]. A β 42 stellt, wie in allen anderen Teilen dieser Arbeit das übergeordnete Zielpeptid dar, da es im Rahmen der Entwicklung einer erfolgreichen Alzheimer Therapie als vielversprechender Angriffspunkt gilt (1.2). Als Nanopartikelmodell wurden Goldnanopartikel (AuNP) mit einem Durchmesser von 5 nm bzw. 10 nm von Sigma Aldrich verwendet, die sich in einer stabilisierenden, 0,1 mM PBS-Lösung befanden und deren Absorptionsmaximum im Bereich von 510 – 525 nm angegeben wurde. Auf den Zusatz „Durchmesser“ wird im folgenden Verlauf der Ergebnisdarstellung verzichtet. Die Verwendung von AuNP als Modellsystem bietet eine Reihe von Vorteilen. Sie stellen nicht nur ein verbreitetes Modellsystem dar [56, 57, 59], sondern sind zudem kommerziell erhältlich. Durch die vom Hersteller durchgeführte Qualitätskontrolle sind die Nanopartikel in gleichbleibender Qualität, reproduzierbar verfügbar. Außerdem werden sie in unterschiedlichen Größenverteilungen angeboten. Ein weiterer Vorteil ist, dass AuNP bereits humanmedizinische Anwendung finden, wie z.B. im Bereich der Krebstherapie, zu diagnostischen Zwecken bei bildgebenden Verfahren oder bei *in vitro* Diagnoseverfahren [21]. Werden folgend keine anderen Angaben gemacht, wurden alle Experimente mit den AuNPs und den beiden Liganden wie folgt durchgeführt: Alle folgenden SV-Läufe, in denen die *s*-Wertverteilung der AuNP bestimmt werden sollte, wurden bei 10 °C durchgeführt, um eine Viskositätserhöhung des verwendeten 10 mM Natriumphosphat-Puffers zu erreichen und so die Sedimentationsgeschwindigkeit der AuNPs zu verringern. Dies ermöglicht die Aufnahme von mehr Sedimentationsprofilen pro Zeiteinheit und damit eine Aufzeichnung des Sedimentationsverhaltens mit höherer Auflösung. Für den Fitprozess wurde eine *s*-Wertauflösung von 5 S gewählt. Die Absorptionsdetektion der AuNP erfolgt unabhängig von der Anwesenheit von Liganden bei 520 nm.

6.2 | Charakterisierung der Ligandenwechselwirkung mit Goldnanopartikeln

Vor Beginn der Zentrifugationen erfolgte immer eine ca. 1-stündige, gemeinsame Inkubation der AuNP mit den Liganden bzw. den Ligandenmischungen bei RT, um zeitlich eine Adsorption der Liganden an die Oberfläche der AuNP zu ermöglichen. Bei allen SV-Läufen mit der Absorptionsoptik wurden 200 μl der AuNP-Stammlösung verwendet und entsprechend der Zusätze auf 400 μl Volumen verdünnt. Beim Einsatz der Fluoreszenzdetektion wurde das Gesamtvolumen auf 100 μl reduziert, wobei hier 50 μl AuNP-Stammlösung waren. Im Fall der 5-nm-AuNP wurde mit einer Drehzahl von 9.000 rpm gearbeitet. Bei den 10-nm-AuNP wurde eine Drehzahl von 3.000 rpm gewählt. Wie zuvor in Kapitel 6.1 handelt es sich bei den *s*-Wertverteilungen auch hier um apparente *s*-Werte.

6.2.1 Quantifizierung der Ligandenwechselwirkung

Folgend werden die Ergebnisse der AUZ-Analysen der Ligandenwechselwirkungsstudien der 5-nm- bzw. 10-nm-AuNP mit steigenden Konzentrationen an A β 42 und BSA vorgestellt. Auf Basis dieser Experimente und den daraus ermittelten *s*-Werten kann zum einen eine qualitative Aussage über die Wechselwirkungen zwischen den gewählten Liganden und den AuNP gemacht werden. Es kann aber auch eine genaue Berechnung der an die Oberfläche der AuNP adsorbierenden Ligandenanzahl erfolgen.

Abbildung 6.2.1.1 zeigt die *s*-Wertverteilungen der Ligandenzugaben von A β 42 (links) und BSA (rechts) zu den 5-nm-AuNP. Es wurden Zugaben von 1 μM (blau), 3 μM (cyan) und 7 μM (grün) A β 42 zu den AuNP (violett) durchgeführt. Die Zugabe von 1 μM A β 42 führt zu einer Reduktion des *s*-Werts von ursprünglich 180 S auf 150 S. Bei der Zugabe von 3 μM A β 42 liegt der *s*-Wert der AuNP bei 130 S. Darüber hinaus ist zu erkennen, dass eine weitere Zugabe von A β 42 (7 μM in grün) zu keiner Verringerung des *s*-Werts der AuNP mehr führt. Dies lässt schlussfolgern, dass eine Oberflächensättigung der AuNP mit A β 42 erreicht wurde. Für die Untersuchung des Bindungsverhaltens von BSA an die Oberfläche der 5-nm-AuNP (rechts) wurden 1 μM (blau), 3 μM (cyan), und 7 μM (grün) und zusätzlich noch 10 μM BSA (orange) zu den NP gegeben. Während bei den A β 42-Zugaben bei 3 μM eine Sättigung und damit keine weitere Reduktion des *s*-Werts mit höherer Zugabe erfolgte, wird bei BSA dieser Punkt erst bei einer Konzentration von 7 μM in der Probe erreicht. Der *s*-Wert der 5-nm-AuNP sinkt in Anwesenheit von 7 μM BSA von 180 S auf 95 S. Abbildung 6.2.1.2 zeigt die *s*-Wertverteilungen der Ligandenzugaben von A β 42 (links) und BSA (rechts) zu den 10-nm-AuNP. Es wurde 1 μM (blau) und 3 μM (cyan) A β 42 zu den AuNP (violett) hinzugegeben. Die Zugabe von 1 μM A β 42 führte zu einer Reduktion des *s*-Werts von ursprünglich 620 S auf 410 S. Eine weitere Zugabe von A β 42 auf 3 μM in der Probe führt zu keiner weiteren Verringerung des *s*-Werts.

6.2 | Charakterisierung der Ligandenwechselwirkung mit Goldnanopartikeln

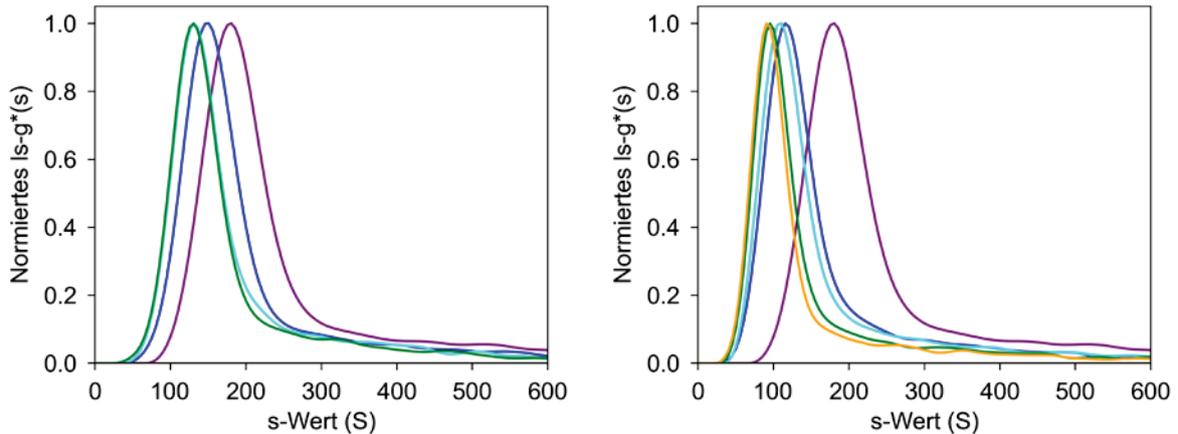


Abbildung 6.2.1.1: Aβ42-Zugaben (links) und BSA-Zugaben (rechts) zu 5-nm-AuNP. Es erfolgte eine Zugabe von 1 μM (blau), 3 μM (cyan) und 7 μM (grün) Aβ42 zu den 5-nm-AuNP (violett). Im Fall von BSA erfolgte eine Zugabe von 1 μM (blau), 3 μM (cyan), 7 μM (grün) und 10 μM (orange) zu den 5-nm-AuNP (violett). Die Normierung der Verteilungen erfolgte auf ihren maximalen Wert. Abhängig vom gewählten Liganden und dessen Konzentration erfolgt eine unterschiedlich stark ausgeprägte s-Wertverschiebung.

Im Fall der 10-nm-AuNP tritt bereits bei 1 μM Aβ42 eine Oberflächensättigung ein, wohingegen bei den 5-nm-AuNP die Sättigung erst bei einer Konzentration von 3 μM Aβ42 eintritt. Für die Untersuchung des Bindungsverhaltens von BSA an die Oberfläche der 10-nm-AuNP (Abbildung 6.2.1.2, rechts) wurde, wie zuvor bei den 5-nm-AuNP in Abbildung 6.2.1.1, 1 μM (blau), 3 μM (cyan), 7 μM (grün) und 10 μM BSA (orange) hinzugegeben. Während bei einer Aβ42-Zugabe von 1 μM eine Oberflächensättigung erfolgt, wird bei BSA dieser Punkt erst bei einer Konzentration von 7 μM mit einem daraus resultierenden s-Wert von 290 S erreicht.

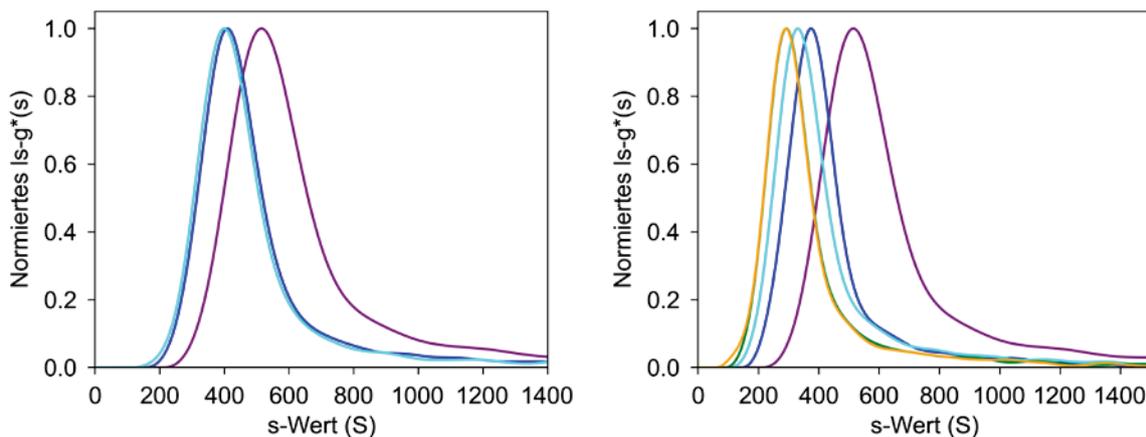


Abbildung 6.2.1.2: Aβ42-Zugaben (links) und BSA-Zugaben (rechts) zu 10-nm-AuNP. Es erfolgte eine Zugabe von 1 μM (blau) und 3 μM (cyan) Aβ42 zu den 10-nm-AuNP (violett). Im Fall von BSA erfolgte eine Zugabe von 1 μM (blau), 3 μM (cyan), 7 μM (grün) und 10 μM (orange) zu den 10-nm-AuNP (violett). Die Normierung der Verteilungen erfolgte auf ihren maximalen Wert. Abhängig vom gewählten Liganden und dessen Konzentration erfolgt eine unterschiedlich stark ausgeprägte s-Wertverschiebung.

6.2 | Charakterisierung der Ligandenwechselwirkung mit Goldnanopartikeln

Tabelle 6.2.1.1 fasst die Ergebnisse der *s*-Wertverschiebungen der 5-nm- und 10-nm-AuNP mit hinzugegebener Konzentration an A β 42 bzw. BSA und der daraus resultierenden Reduktion des *s*-Werts in Bezug auf AuNP ohne Ligandzugabe zusammen. Beim direkten Vergleich der Ergebnisse von A β 42 mit den beiden untersuchten AuNP-Größen ist zu erkennen, dass der Einfluss von 1 μ M A β 42 bei den 10-nm-AuNP zu einer doppelt so starken Reduktion des *s*-Werts führt, als dies bei den 5-nm-AuNP der Fall ist. Bei den 10-nm-AuNP wird bereits bei 1 μ M A β 42 der Punkt der Oberflächensättigung erreicht. Bei den 5-nm-AuNP muss die A β 42-Konzentration um den Faktor 3 erhöht werden, um eine Oberflächensättigung zu erreichen. Im Fall von BSA als Ligand, ergibt sich ein anscheinend komplexerer Zusammenhang zwischen der hinzugegebenen Peptidkonzentration und den daraus resultierenden *s*-Wertreduktionen der beiden untersuchten AuNP-Größen. Hier wird stets erst bei einer Zugabe von 7 μ M Ligand ein Sättigungspunkt erreicht. Bemerkenswert ist, dass es bei beiden verwendeten AuNP-Größen nach der Zugabe von 1 μ M Ligand zu Beginn und dann im weiteren Verlauf der Zugaben, immer nur zu einer Verringerung des *s*-Werts der Protein-beladenen AuNP um den Faktor 1,1 – 1,2 kommt, unabhängig des Faktors der Peptidkonzentrationserhöhung. Die Peptidkonzentration wurde um die Faktoren 3, 2,33 und 1,44 erhöht.

Tabelle 6.2.1.1: Übersicht der aus den Ligandenzugaben resultierenden *s*-Werte der 5-nm- bzw. 10-nm-AuNP und deren Reduktion (n.a.: nicht anwendbar; n.b.: nicht bestimmbar).

AuNP	Ligand	Ligandenkonzentration (μ M)	<i>s</i> -Wert (S)	<i>s</i> -Wertreduktion (%)	Ligand	<i>s</i> -Wert (S)	<i>s</i> -Wertreduktion (%)
5-nm		0	180	n.a.		180	n.a.
5-nm	A β 42	1	150	17	BSA	120	33
		3	130	28		110	39
		7	130	28		95	47
		10	n.b.	n.b.		95	47
10-nm		0	620	n.a.		620	n.a.
10-nm	A β 42	1	410	34	BSA	380	39
		3	410	34		330	47
		7	n.b.	n.b.		290	53
		10	n.b.	n.b.		290	53

6.2 | Charakterisierung der Ligandenwechselwirkung mit Goldnanopartikeln

Neben der rein qualitativen Beurteilung des Einflusses der beiden verwendeten Liganden auf die Veränderung des s -Werts der 5-nm- und 10-nm-AuNP kann auch eine Quantifizierung der an die Oberfläche der AuNP gebundenen Liganden, eine Dichteberechnung der mit Liganden gebundenen NP und darauf basierend eine $s_{20,w}$ -Wertumrechnung erfolgen. Für alle folgenden Berechnungen und Annahmen bezüglich dieser Quantifizierung wurde immer die Geometrie und Physik einer idealen Kugel angenommen. Für die in Tabelle 6.2.1.2 aufgeführten theoretischen Querschnitte eines BSA bzw. A β 42-Moleküls und deren Masse- bzw. Volumenangaben wurden die folgenden Formeln verwendet, wobei der Ligandenquerschnitt mathematisch mit der Kreisfläche (A) gleichgesetzt werden kann. Bei der Masse (m) handelt es sich um das Produkt aus dem Volumen (V) des Körpers und dessen Dichte (ρ).

$$\begin{aligned} \text{Kreisfläche } (A) \text{ (nm}^2\text{):} & \quad A = \pi r^2 \\ \text{Kugelvolumen } (V) \text{ (cm}^3\text{):} & \quad V = \frac{4}{3} \pi r^3 \\ \text{Masse } (m) \text{ (g):} & \quad m = V \rho \quad \rightarrow \quad m = \frac{4}{3} \pi r^3 \rho \\ \text{mit:} & \quad r = \text{Radius} \\ & \quad \rho = \text{Dichte (g/cm}^3\text{)} \end{aligned}$$

Tabelle 6.2.1.2: Übersicht der physikalischen Parameter der Liganden.

Ligand	Stokes Radius (nm)	Dichte (g/cm ³)	Querschnitt (nm ²)	Masse Ligandenmolekül (x 10 ⁻²⁰ g)	Volumen Ligandenmolekül (x 10 ⁻²⁰ cm ³)
BSA	3,48 [60]	1,36	38,05	24,4	17,7
A β 42	1,1	1,38	3,78	0,75	0,55

Der in Tabelle 6.2.1.2 aufgeführte Stokes Radius für das A β 42-Monomer wurde mittels UltraScan III berechnet. Die Anzahl an theoretisch, als monomolekulare Schicht, gebundenen Liganden pro Oberfläche AuNP (O) aus Tabelle 6.2.1.3 ergibt sich aus der Division der Oberfläche eines einzelnen AuNP und des theoretischen Querschnitts eines Ligandenmoleküls (Tabelle 6.2.1.2).

6.2 | Charakterisierung der Ligandenwechselwirkung mit Goldnanopartikeln

Die Berechnung der Oberfläche eines AuNP erfolgt über die Berechnung der Oberfläche einer Kugel.

$$\text{Kugeloberfläche } (O) \text{ (nm}^2\text{):} \quad O = 4 \pi r^2$$

mit $r = \text{Radius}$

Tabelle 6.2.1.3: Übersicht der physikalischen und berechneten Parameter der verwendeten 5-nm- bzw. 10-nm-AuNP.

Durchmesser (nm)	s-Wert (S) <i>s_{20,w}</i> -Wert (S)	Dichte (g/cm ³)	Anzahl NP pro 200 µl Volumen (x 10 ¹³)	Oberfläche pro NP (nm ²)	Oberfläche NP pro 200 µl (x 10 ¹⁴ nm ²)	theoretische BSA-Moleküle pro NP-Oberfläche	theoretische Aβ42-Moleküle pro NP-Oberfläche
5	180 263	17,99	1,1	78,54	8,62	2	20
10	620 811	15,63	0,12	314,16	3,77	8	83

Die in Tabelle 6.2.1.3, 6.2.1.4 und 6.2.1.5 angegebenen Dichten der AuNP wurden auf Basis der gemessenen s-Werte bzw. der daraus berechneten Radien mit den folgend angegebenen Formeln berechnet. Basierend auf diesen Dichten erfolgte die Berechnung der *s_{20,w}*-Werte der mit Liganden gebundenen NP (Tabelle 6.2.1.7). Dabei ist im Fall einer unendlich verdünnten Lösung der Kehrwert des partiell spezifischen Volumens eines Makromoleküls gleich dessen Dichte. Grundlage für die mathematische Herleitung der aufgeführten Formeln sind die Svedberg-Gleichung und das Stokessche Gesetz (3.2.2).

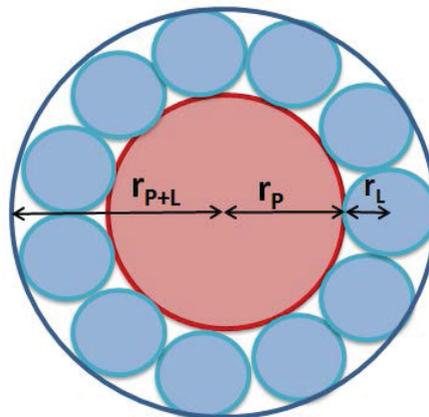


Abbildung 6.2.1.3: Schematische Darstellung eines Nanopartikels (roter zentraler Kreis) mit umgebender Ligandenhülle (blaue Kreise). r_{p+L} : Radius des Nanopartikels mit Ligandenhülle, r_p : Radius des Nanopartikels, r_L : Radius eines Ligandenmoleküls.

6.2 | Charakterisierung der Ligandenwechselwirkung mit Goldnanopartikeln

Radius (r_{P+L}) (cm):

$$r_{P+L} = \frac{s_P r_P}{s_{P+L}}$$

Partiell spezifische Volumen (\bar{v}_{P+L}) (cm³/g):

$$\bar{v}_{P+L} = \frac{r_{P+L}^2}{(4,5 \eta_{L\ddot{o}} s_{P+L}) + (\rho_{L\ddot{o}} r_{P+L}^2)}$$

Dichte (ρ_{P+L}) (g/cm³):

$$\rho_{P+L} = 1/(\bar{v}_{P+L})$$

mit:

$\rho_{L\ddot{o}}$ = Dichte des Lösungsmittels (g/cm³)

$\eta_{L\ddot{o}}$ = Viskosität des Lösungsmittels (g/cm sec)

s_{P+L} = s-Wert der NP mit Ligandenhülle (10⁻¹³ s)

s_P = s-Wert der NP (10⁻¹³ s)

r_{P+L} = Radius der NP mit Ligandenhülle (cm)

r_P = Radius der NP (cm)

\bar{v}_{P+L} = partiell spezifische Volumen der NP mit Ligandenhülle (cm³/g)

ρ_{P+L} = Dichte der NP mit Ligandenhülle (g/cm³)

Die Masse (m) und das Volumen (V) der Ligandenhülle (Tabelle 6.2.1.4 und 6.2.1.5) wurden wie folgend bestimmt:

$$\text{Volumen (V) (cm}^3\text{): } V = \frac{4}{3} \pi (r_{P+L}^3 - r_P^3) \quad \rightarrow \quad V = \frac{4}{3} \pi \left(\left(\frac{s_P r_P}{s_{P+L}} \right)^3 - r_P^3 \right)$$

$$\text{Masse (m) (g): } m = V \rho \quad \rightarrow \quad m = \frac{4}{3} \pi \left(\left(\frac{s_P r_P}{s_{P+L}} \right)^3 - r_P^3 \right) \rho$$

Dabei ergibt sich das Volumen der Ligandenhülle aus der Subtraktion der unbeladenen Partikel von dem Volumen der mit Liganden beladenen Partikel. Im Fall der nicht mit Liganden inkubierten AuNP aus Tabelle 6.2.1.3 wurden die vom Hersteller angegebenen Radien und die s-Werte der AUZ-Experimente verwendet. Die Anzahl AuNP pro 200 μ l Volumen wurde ebenfalls vom Hersteller bezogen. Die gerundete Anzahl der an einen AuNP gebundenen Liganden pro einen AuNP (Tabelle 6.2.1.4 und 6.2.1.5) ergibt sich aus der Division der Masse bzw. des Volumens der Ligandenhülle durch die Masse bzw. Volumen eines Ligandenmoleküls (Tabelle 6.2.1.2).

6.2 | Charakterisierung der Ligandenwechselwirkung mit Goldnanopartikeln

Die Berechnung der gerundeten Schichtanzahl erfolgt durch die Division der gebundenen Liganden mit der theoretisch möglichen Anzahl an gebundenen Liganden als monomolekulare Schicht (Tabelle 6.2.1.3).

Tabelle 6.2.1.4: Übersicht physikalischer und berechneter Parameter der mit Liganden gebundenen 5-nm-AuNP.

Ligand	s-Wert (S)	Radius (nm)	Dichte (g/cm ³)	Masse Ligandenhülle (x 10 ⁻¹⁹ g)	Volumen Ligandenhülle (x 10 ⁻¹⁹ cm ³)	Anzahl Liganden je NP	Schichtanzahl je NP
1 µM Aβ42	150	3	10,83	0,65	0,48	8	0,4
3 µM Aβ42	130	3,46	7,4	1,47	1,08	19	1
7 µM Aβ42	130	3,46	7,4	1,47	1,08	19	1
1 µM BSA	120	3,75	6,03	2,15	1,55	1	0,5
3 µM BSA	110	4,09	4,88	3,05	2,21	1	0,5
7 µM BSA	95	4,74	3,5	5,24	3,8	2	1
10 µM BSA	95	4,74	3,5	5,24	3,8	2	1

Tabelle 6.2.1.5: Übersicht physikalischer und berechneter Parameter der mit Liganden gebundenen 10-nm-AuNP.

Ligand	s-Wert (S)	Radius (nm)	Dichte (g/cm ³)	Masse Ligandenhülle (x 10 ⁻¹⁸ g)	Volumen Ligandenhülle (x 10 ⁻¹⁸ cm ³)	Anzahl Liganden je NP	Schichtanzahl je NP
1 µM Aβ42	410	7,56	5,23	1,75	1,29	232	2,8
3 µM Aβ42	410	7,56	5,23	1,75	1,29	232	2,8
1 µM BSA	380	8,16	4,37	2,42	1,75	9	1,2
3 µM BSA	330	9,39	3,21	4,07	2,94	16	2
7 µM BSA	290	10,7	2,5	6,34	4,59	26	3
10 µM BSA	290	10,7	2,5	6,34	4,59	26	3

6.2 | Charakterisierung der Ligandenwechselwirkung mit Goldnanopartikeln

Tabelle 6.2.1.6: Vergleich der Ligandenbindung an 5-nm- und 10-nm-AuNP.

AuNP+ Ligand	Ligandenkonzentration (μM)	s-Wert-reduktion (%)	Anzahl Liganden je NP	Schichtanzahl je NP	AuNP+ Ligand	s-Wert-reduktion (%)	Anzahl Liganden je NP	Schichtanzahl je NP
5-nm + A β 42	1	17	8	0,4	5-nm + BSA	33	1	0,5
	3	28	19	1		39	1	0,5
	7	28	19	1		47	2	1
	10	n.b.	n.b.	n.b.		47	2	1
10-nm + A β 42	1	34	232	2,8	10-nm + BSA	39	9	1,2
	3	34	232	2,8		47	16	2
	7	n.b.	n.b.	n.b.		53	26	3
	10	n.b.	n.b.	n.b.		53	26	3

Tabelle 6.2.1.7: Übersicht der $s_{20,w}$ -Werte der mit Liganden gebundenen 5-nm- und 10-nm-AuNP.

AuNP+ Ligand	Ligandenkonzentration (μM)	s-Wert (S)	Dichte (g/cm^3)	$s_{20,w}$ -Wert (S)	AuNP+ Ligand	s-Wert (S)	Dichte (g/cm^3)	$s_{20,w}$ -Wert (S)
5-nm + A β 42	1	150	10,83	196	5-nm + BSA	120	6,03	157
	3	130	7,4	170		110	4,88	144
	7	130	7,4	170		95	3,5	124
	10	n.b.	n.b.	n.b.		95	3,5	124
10-nm + A β 42	1	410	5,23	537	10-nm + BSA	380	4,37	497
	3	410	5,23	537		330	3,21	432
	7	n.b.	n.b.	n.b.		290	2,5	380
	10	n.b.	n.b.	n.b.		290	2,5	380

6.2 | Charakterisierung der Ligandenwechselwirkung mit Goldnanopartikeln

Ein in der Literatur häufig diskutiertes Problem im Zusammenhang mit der Arbeit mit NP ist die Bestimmung deren korrekter Dichte [36]. Aufgrund des großen Oberflächen-zu-Volumenverhältnisses von NP beeinflusst die Bindung von Liganden deren Dichte stärker, als bei dem der NP entsprechenden Makrosbstanz [61, 62]. Für die 5-nm-AuNP mit einer Oberfläche von ca. 79 nm² pro NP wurde eine Dichte von ca. 18 g/cm³ bestimmt, was relativ nahe an der Dichte des makromolekularen Goldes mit 19,6 g/cm³ liegt. Für die 10-nm-AuNP mit einer Oberfläche von ca. 314 nm² pro NP wurde eine Dichte von 15,6 g/cm³ bestimmt (Tabelle 6.2.1.3). Diese Unterschiede in der Dichte, welche über die gemessenen Sedimentationskoeffizienten berechnet wurden, ergeben sich aus den unterschiedlichen Größen der Hydrathülle der Partikel. Unabhängig von der AuNP-Größe und dem hinzugegebenen Liganden besteht immer ein direkter Zusammenhang zwischen den hinzugegebenen Ligandenkonzentrationen, den resultierenden Radien der AuNP und deren Dichte. Mit zunehmender Ligandenkonzentration steigt bis zum Sättigungspunkt immer der Radius, während die Dichte der AuNP immer geringer wird (Tabelle 6.2.1.4). Wie zu erwarten, steigt mit zunehmendem Radius immer die Masse und das Volumen der Ligandenhülle, die Anzahl an gebundenen Liganden und die Schichtanzahl der Liganden pro AuNP. Wie zu Tabelle 6.2.1.1 bezüglich des *s*-Werts bereits angemerkt wurde, steigen die Radien bzw. fallen die Dichten immer um einen deutlich kleineren Faktor, als der Faktor der Konzentrationszunahme der Liganden in der Probe, nach dem erstmals 1 µM Ligand den AuNP hinzugegeben wurde. Dies beruht auf der direkten Abhängigkeit der berechneten Dichten und Radien vom gemessenen *s*-Wert. Zudem lässt sich schlussfolgern, dass die erste Zugabe von Liganden bezüglich des *s*-Werts und allen darauf beruhenden Werten der entscheidende Punkt ist. Mit der ersten Anlagerung von Liganden an die AuNP erfolgt die drastischste Dichte- und Formänderung und damit einhergehend die stärkste *s*-Wertreduktion, was ebenfalls in Tabelle 6.2.1.1 deutlich zu erkennen ist. Von einer annäherungsweise sphärischen Form der AuNP ohne Liganden mit hoher Dichte, kommt es durch die Anlagerung der Peptide, mit einer Dichte von ca. 1,37 g/cm³, zu deutlichen Dichte- und Formänderungen. Die weitere Anlagerung dieser deutlich weniger dichten Liganden führt zu keiner solch verhältnismäßig drastischen Form-, Dichte- und *s*-Wertänderung, als das nach der initialen Ligandenzugabe zu beobachten ist. Betrachtet man in Tabelle 6.2.1.6 das unterschiedliche Bindungsverhalten von Aβ42 und BSA an die 5-nm- und 10-nm-AuNP muss die zur Verfügung stehende Gesamtfläche der AuNP bei den konstant 200 µl AuNP-Stammlösung miteinbezogen werden, die für alle in diesem Kapitel aufgeführten Experimente verwendet wurde. Dabei ergibt sich aus Tabelle 6.2.1.3, dass im Fall der 5-nm-AuNP ein um den Faktor 2,32 größere Gesamtfläche in den 200 µl Volumen vorliegt, als bei den 10-nm-AuNP.

6.2 | Charakterisierung der Ligandenwechselwirkung mit Goldnanopartikeln

Dies erklärt, dass im Fall von A β 42 bei den 10-nm-AuNP nach einer Zugabe von 1 μ M der Sättigungspunkt erreicht wird, wohingegen bei den 5-nm-AuNP die Konzentration um den Faktor 3, auf 3 μ M Ligandenkonzentration, erhöht werden muss, um den Flächenunterschied von Faktor 2,32 auszugleichen. In Tabelle 6.2.1.2 werden die wichtigsten Parameter von A β 42 und BSA für die hier aufgeführten Berechnungen aufgelistet. Im Vergleich ist zu erkennen, dass ein BSA-Molekül ein 32-fach größeres Volumen einnimmt als ein A β 42-Molekül. Mit Blick auf Tabelle 6.2.1.6 wird deutlich, welchen Einfluss dies auf den *s*-Wert der AuNP hat, wenn BSA als Ligand zugesetzt wird. Die Bindung eines BSA-Moleküls an die 5-nm-AuNP führt direkt zu einer Reduktion des *s*-Werts um 39 %. Eine weitere Erhöhung auf 2 Moleküle führt mit 47 % fast zu einer Halbierung des *s*-Wertes. Noch anschaulicher ist ein Vergleich der beiden Zugaben von 1 μ M A β 42 und 1 μ M BSA zu den 10-nm-AuNP. Hier erfolgt bei BSA als Ligand eine Reduktion des *s*-Werts um 39 %, mit theoretisch 9 gebundenen Molekülen BSA. Für eine etwa vergleichbar hohe *s*-Wertreduktion mit 34 % müssen im Fall von A β 42 232 Moleküle an die Oberfläche der 10-nm-AuNP binden. Dies zeigt auch, dass bei gleicher Ligandenkonzentration und gleicher AuNP-Größe BSA eine anscheinend weniger effektive Bindung an die AuNP-Oberfläche aufweist als A β 42. Auch dies kann auf das relativ große Volumen des BSA zurückgeführt werden. Die im Vergleich zu A β 42 extreme Ausdehnung des BSA-Moleküls führt zu sterischen Behinderungen während des Anlagerungsprozesses an die Oberfläche der AuNP. Die relativ kleinen und flexiblen A β 42-Moleküle können hingegen ohne bemerkbare gegenseitige Behinderung an die Oberfläche der AuNP adsorbieren. Findet allerdings eine erfolgreiche Bindung eines BSA-Moleküls statt, führt dies besonders bei den 5-nm-AuNP zu einer drastischen *s*-Wertreduktion.

6.2.2 Überstandsanalyse nach Oberflächensättigung

Nachdem im vorangegangenen Kapitel die Bindung von A β 42 und BSA an die Oberfläche von 5-nm- und 10-nm-AuNP vorgestellt und die Anzahl an bindenden Liganden berechnet werden konnte, soll in diesem Abschnitt eine Vorgehensweise für eine AUZ-basierte Analyse von Probenbestandteilen vorgestellt werden, die in einem System aus Nanopartikeln als Trägersubstanz und an deren Oberfläche gekoppelten Liganden, nicht spezifisch mit dem Liganden interagieren und noch frei in Lösung vorliegen. Für diese Vorgehensweise wurden die bereits vorgestellten 10-nm-AuNP und A β 42 bzw. BSA als Liganden und Zielseptid verwendet.

6.2 | Charakterisierung der Ligandenwechselwirkung mit Goldnanopartikeln

Neben dem zu Beginn von 6.2.1 vorgestellten und vielfach erfolgreich verwendeten Analyseprotokoll für den Bindungsnachweis von Liganden an die AuNP-Oberfläche mittels eines SV-Laufs bei 10 °C, einer Absorptionsdetektion der AuNP bei 520 nm und einer optimierten Zentrifugationsgeschwindigkeit, wurde für die Analyse nichtbindender Liganden mit FITC-markiertem A β 42 in der FDS-UZ gearbeitet. Diese Zentrifugation erfolgte bei 60.000 rpm und 20 °C. Zudem erfolgten zwei Inkubationsschritte. In der ersten 1-stündigen Inkubation, bei RT in Ruhe, wurde eine Probe der 10-nm-AuNP mit 3 μ M BSA vorinkubiert, um eine Bindung des BSA als Modellligand an die AuNP-Oberfläche zu erreichen.

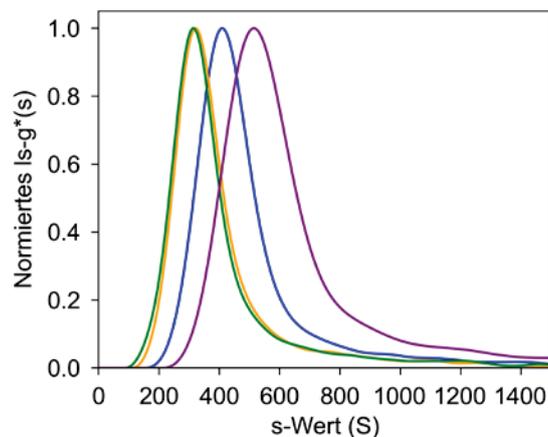


Abbildung 6.2.2.1: Einfluss der gleichzeitigen Zugabe von A β 42 und BSA auf die s-Wertverteilung von 10-nm-AuNP. Es erfolgt ein Wechselwirkungsnachweis anhand einer s-Wertverschiebung der 10-nm-AuNP (violett) mit 1 μ M A β 42 (blau) und der vor der Zugabe von 1 μ M A β 42 mit 3 μ M BSA vorinkubierten (grün) bzw. nicht mit 3 μ M BSA vorinkubierten AuNP (orange). Zu erkennen ist, dass eine Vorinkubation der AuNP mit BSA keinen Einfluss auf die s-Wertverschiebung hat, da sich die beiden Verteilungen homogen überlagern. Die Normierung der Verteilungen erfolgte auf ihren maximalen Wert.

Es folgte mit allen weiteren Proben die zweite, als Standard eingeführte, 1-stündige Inkubation aller Probenbestandteile bei RT und in Ruhe. Im Anschluss wurde der zur Bestimmung der s-Werte der AuNP erforderliche SV-Lauf bei 3.000 rpm und 10 °C durchgeführt. Abbildung 6.2.2.1 zeigt die verschiedenen s-Wertverteilungen der 10-nm-AuNP ohne Anwesenheit eines potentiellen Interaktionspartners (violett), die mit der alleinigen Zugabe von 1 μ M A β 42 (blau), die vor der Zugabe von 1 μ M A β 42 mit 3 μ M BSA vorinkubierten AuNP (grün) und die vor der Zugabe von 1 μ M A β 42 nicht mit 3 μ M BSA vorinkubierten AuNP (orange). Es ist zu erkennen, dass eine Vorinkubation der AuNP mit BSA keinen Einfluss auf die s-Wertverschiebung hat, da sich die beiden Verteilungen sehr homogen überlagern. Der für die s-Wertverschiebung entscheidendsten Effekt ist die Anlagerung des A β 42 alleine bzw. der der 3 μ M BSA mit 1 μ M A β 42, unabhängig von einer Vorinkubation mit BSA. Für die Analyse der nicht an die AuNP bindenden Liganden wurde wie bereits erläutert, eine Zentrifugation in der FDS-UZ mit 1 μ M FITC-markiertem A β 42 durchgeführt.

6.2 | Charakterisierung der Ligandenwechselwirkung mit Goldnanopartikeln

Dafür wurden die bereits beschriebenen Proben, mit entsprechenden Inkubationen, erneut hergestellt und für 10 h bei 3.000 rpm, 10 °C in der FDS-UZ zentrifugiert, um die Bedingungen des SV-Laufs für die Bestimmung der *s*-Wertverteilung der AuNP zu simulieren. Am darauffolgenden Morgen wurde dann die eigentliche Analyse mittels der FDS-Optik bei 60.000 rpm und 20 °C durchgeführt. Abbildung 6.2.2.2 stellt die Ergebnisse dieser Überstandsanalyse in der FDS-UZ dar. In Abbildung 6.2.2.2 A erfolgt ein Vergleich der $s_{20,w}$ -Wertverteilungen des sich noch im Überstand befindlichen freien FITC-A β 42 der mit BSA vorinkubierten AuNP (grün), der nicht mit BSA vorinkubierten AuNP (cyan) und zur Kontrolle FITC-A β 42 ohne vorherige Anwesenheit von 10-nm-AuNP (violett). Ein direkter Vergleich der gemessenen Monomerspeaks mit und ohne Vorinkubation der AuNP mit BSA bei ca. 0,8 S zeigt, dass die Vorinkubation der NP mit BSA zu einer teilweisen Absättigung der Oberfläche der NP führt, was eine verringerte Adsorption des FITC-A β 42-Monomers an die NP-Oberfläche zur Folge hat und damit eine erhöhte Monomerkonzentration im Überstand, die bei 60.000 rpm in der FDS-UZ detektiert wird. Abbildung 6.2.2.2 B, C und D zeigen die Sedimentationsprofile der FITC-A β 42-Kontrolle (B), das noch freie FITC-A β 42 in der Probe ohne mit BSA vorinkubierten AuNP (C) und den FITC-A β 42-Überstand der 10-nm-AuNP ohne jegliche Anwesenheit von BSA in der Probe (D). Der visuelle Vergleich der drei gezeigten Sedimentationsprofile macht den Effekt der Anwesenheit von BSA in den Proben ebenfalls deutlich. Die Probe in der nur 1 μ M A β 42 und AuNP, ohne Anwesenheit von BSA, enthalten waren (D), zeigte ein kaum noch auswertbares Sedimentationsprofil, da das FITC-A β 42-Monomer ungehindert an die Oberfläche der NP adsorbiert und somit kaum noch FITC-A β 42-Monomer im Überstand verbleibt, weswegen in Abbildung 6.2.2.2 A für diese Probe keine *s*-Wertverteilung aufgetragen wurde. Das deutliche Adsorptionsverhalten des A β 42 an die AuNP wurde bereits zu Abbildung 6.2.2.1 erörtert. Abbildung 6.2.2.2 C veranschaulicht exemplarisch das Sedimentationsprofil des noch im Überstand befindlichen FITC-A β 42 in den Proben, denen zur Oberflächensättigung BSA hinzugegeben wurde. Es ist ein deutlich anderes Muster der Sedimentationsfronten zu erkennen, als im Vergleich zu der Kontrollprobe in Abbildung 6.2.2.2 B. Dies kann durch unspezifische, kurzzeitige Wechselwirkungen mit dem in der Probe enthaltenen BSA erklärt werden. Das hier gemessene Sedimentationsprofil ähnelt dem des in Kapitel 5.1 vorgestellten Profils, in dem die Bindung von freiem HSA und FITC-A β 42 veranschaulicht wurde. Da die hier eingesetzte 3 μ M BSA-Konzentration, mit dem zu berücksichtigenden Adsorptionsverhalten an die AuNP, aber unter dem Schwellenwert von 3 μ M HSA in Kapitel 5.1 liegt, kann hier keine Bindung der beiden Proteine anhand der *s*-Wertverteilung nachgewiesen werden.

6.2 | Charakterisierung der Ligandenwechselwirkung mit Goldnanopartikeln

Aufgrund des in der FDS-UZ eingebauten 488 nm Lasers konnte in diesem Versuchsaufbau keine direkte Bindung des FITC-A β 42 an die AuNP-Oberfläche gemessen werden, da das Absorptionsmaximum der AuNP und das Emissionsmaximum des Fluoreszeins, beide bei ca. 520 nm, überlagern und somit keine Fluoreszenz des FITC-A β 42 mehr zu messen gewesen wäre, wenn die für die AuNP optimalen Zentrifugationsgeschwindigkeiten gewählt worden wären.

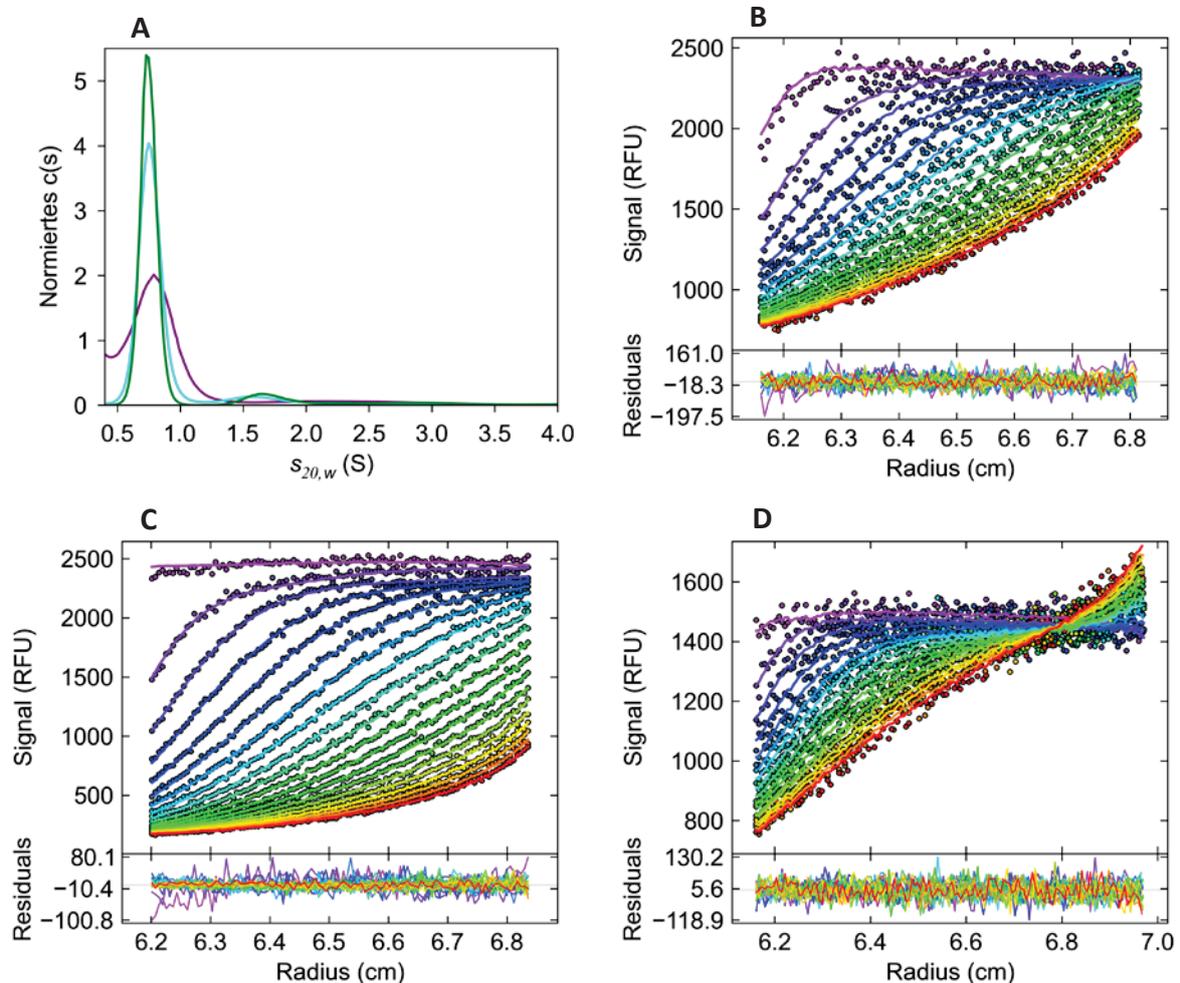


Abbildung 6.2.2.2: Analyse des nicht an die 10-nm-AuNP adsorbierten FITC-A β 42 mittels eines FDS-SV-Laufs.

Die Zentrifugation erfolgt bei 60.000 rpm und 20 °C nach dem in Abbildung 6.2.2.1 dargestellten SV-Lauf. A zeigt einen Vergleich der s -Wertverteilung des sich noch im Überstand befindlichen freien FITC-A β 42: in Gegenwart mit BSA vorinkubierten AuNP (grün), von nicht mit BSA vorinkubierten AuNP (cyan) und zur Kontrolle FITC-A β 42 ohne vorherige Anwesenheit von 10-nm-AuNP (violett). Die Anwesenheit von BSA in den Proben führt in Abhängigkeit der Inkubation zu einer veränderten Ausprägung des FITC-A β 42-Monomerpeaks. Die Normierung der Verteilungen erfolgte auf die Fläche. B, C, D zeigen die Sedimentationsprofile der FITC-A β 42-Kontrolle (B), das noch freie FITC-A β 42 in der Probe ohne mit BSA vorinkubierten AuNP (C) und den FITC-A β 42-Überstand der 10-nm-AuNP ohne jegliche Anwesenheit von BSA (D).

6.2 | Charakterisierung der Ligandenwechselwirkung mit Goldnanopartikeln

Unabhängig der hier vorgestellten Ergebnisse war bei der Einstellung der Fluoreszenzparameter, die vor Beginn der Zentrifugation individuell für jede Messzelle erfolgen muss, immer ein deutlicher Unterschied in der Startfluoreszenz zwischen Proben mit enthaltenen AuNP und ohne AuNP zu sehen, was auf die Überlagerung der Emissions- und Absorptionsspektren des Fluoreszein und der AuNP zurückgeführt werden kann.

Am Ende dieses Kapitels können zwei Resümees gezogen werden. Mittels der Verwendung von Goldnanopartikeln und A β 42 bzw. BSA als Modellliganden konnte erfolgreich eine Etablierung eines allgemeingültigen Vorgehens für eine AUZ-basierte Charakterisierung ligandenmodifizierter Nanopartikel mit einer darauf aufbauenden Quantifizierung der Oberflächenmodifikation der Nanopartikel durch diese Liganden erfolgen. Trotz der Interferenz der Emission des als Fluoreszenzmarker genutzten Fluoreszein und der Absorption der Goldnanopartikel bei 520 nm konnte zudem mit der Überstandsanalyse und fluoreszeinmarkiertem A β 42 die Bindung der Liganden an Goldnanopartikel verfolgt werden.

7 Diskussion

Bei der Alzheimerschen Demenz handelt es sich um eine neurodegenerative Erkrankung des menschlichen Hirns, in deren pathologischem Prozess dem Amyloid- β -Peptid eine zentrale Rolle zugesprochen wird. In Folge von dessen Überexpression und fehlerhafter Resorption kommt es zur Anreicherung von verschiedenen A β -Aggregationsprodukten, was zur Pathologie der Alzheimerschen Demenz beiträgt. A β stellt damit für das weitere biomedizinische Verständnis und der Entwicklung kurativer Therapien der Alzheimerschen Demenz einen zentralen Ansatzpunkt dar (1.2). Aus methodischer Sicht stand die AUZ mit deren breitem Anwendungsspektrum als biophysikalische Methode im Mittelpunkt dieser Arbeit. Die AUZ ermöglicht unter Einbeziehung der Absorptions- und Fluoreszenzdetektionssystemen frei in Lösung die strukturelle Untersuchung von Protein-Ligandenwechselwirkungen (5.1, 5.2) und die biophysikalische Charakterisierung und Ligandenwechselwirkungsstudien von peptidbasierten und kolloidalen Nanopartikeln (NP) (6.1, 6.2).

7.1 Protein-Ligandenwechselwirkungsstudien in der AUZ

Ein entscheidender Aspekt bei der Arbeit mit dem A β 42-Peptid ist dessen intrinsische Eigenschaft zur starken Selbstassoziation [63]. Für einen erfolgreichen Interaktionsnachweis mit einem Liganden ist eine möglichst hohe A β 42-Monomerkonzentration, die weitest gehende Eliminierung aggregationsfördernder Nukleationskeime und die Minimierung von Oberflächenadsorptionsprozessen entscheidend. Systematische Untersuchungen des Einflusses von phosphatbasiertem und HEPES-Puffer auf die Fibrillisation von A β 40 zeigten, dass es in dem getesteten Konzentrationsbereich von 20 mM bis 80 mM Puffer, im HEPES-Puffer es zu einer deutlichen Verzögerung der Fibrillisation kam, was durch spezifische Interaktionen mit den Histidinseitenketten des A β 40 zu erklären sei [64]. Unter 4.1 wurden die Ergebnisse eines Löslichkeitsvergleichs von 1 μ M FITC-A β 42 in zwei phosphatbasierten Puffern und einem 10 mM HEPES-Puffer, mit 137 mM NaCl, 0,01 % Tween 20, pH 7,4 vorgestellt. Es konnte ein deutlich erhöhtes Löslichkeitsverhalten des FITC-A β 42 im HEPES-Puffer mit einhergehend höherem Monomerpeak festgestellt werden. Die deutlich verlängerte Lag-Phase in den durchgeführten Aggregationsassays im HEPES-Puffer [64] kann als indirekter Beleg für eine erhöhte Monomerlöslichkeit und Stabilität in diesem Puffer angesehen werden, da eine Aggregation entweder durch von Beginn an vorhandene Nukleationskeime verstärkt wird oder die in dem Puffer enthaltenen Komponenten eine Keimbildung begünstigen [65]. Das in dieser Arbeit verwendete A β 42-Peptid, mit oder ohne Fluoreszenzmarkierung, wurde mittels Festphasensynthese hergestellt und als Trockensubstanz geliefert.

Durch den synthetischen Herstellungs- und Aufreinigungsprozess können Verunreinigungen mit Abbruchfragmenten bzw. freiem Fluorophor, die das Aggregationsverhalten, die s -Wertbestimmung, den Interaktionsnachweis mit Liganden und eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse beeinflussen, nicht ausgeschlossen werden. Die zusätzliche Anwesenheit von derart kleinen Partikeln führt zu einer Verschärfung des Basisliniendekonvolutionsproblems und kann selbst bei einer maximalen Drehzahl von 60.000 rpm und 30 °C, bei der sich aufgrund der niedrigeren Viskosität und Dichte des Lösungsmittels, das A β 42-Monomer weiter vom Meniskus des Lösungsmittels entfernen sollte, nicht vollständig gelöst werden. Es kann somit zu keinem Zeitpunkt der radialen Detektion das der Basislinie entsprechende Signal detektiert werden [66]. Wie erläutert, erfolgten bereits Interaktionsstudien des A β 42-Monomers mit dem D3-Peptid (1.3). Eines der Ziele dieser Dissertation war es einen Bindungsnachweis dieser Interaktionspartner, frei in Lösung mit der AUZ als Absolutmethode, durchzuführen. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde wie in Kapitel 5.2 dargestellt mit der Absorptions- und der Fluoreszenzoptik gearbeitet und bei einem 10 μ M äquimolaren Konzentrationsverhältnis, mit 1 μ M FITC-A β 42, eine stattfindende Komplexbildung aus A β 42 und D3 nachgewiesen (Abbildung 5.2.2.1). Simulationen lassen auf eine Eins-zu-Eins-Bindungsstöchiometrie zwischen dem A β 42-Monomer und D3 schließen. Untermuert werden diese Ergebnisse durch Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie-Messungen bei denen mittels N-Terminallybiotinyliertem A β 42 eine Dissoziationskonstante von $15 \mu\text{M} \pm 1,5 \mu\text{M}$ im Fall von D3 gemessen wurde. Grundlage für den Fitprozess war ein Langmuir 1:1-Bindungsmodell [67]. Zudem konnte bei Arbeiten mit drei synthetischen Peptidkonstrukten mit je einem Molekulargewicht von 2049 g/mol, 2777 g/mol und 3505 g/mol belegt werden, dass es möglich ist die drei korrespondierenden $s_{20,w}$ -Wertespezies von 0,36 S, 0,45 S und 0,52 S signifikant zu unterscheiden [68]. Ein simulierter SV-Lauf einer 1:1-Mischung des A β 42-Monomers und dem Komplex mit D3, basierend auf dem Modell zweier idealer, nicht-interagierender Komponenten und einer anschließenden $c(s)$ -Auswertung machen deutlich, dass eine Trennung der beiden simulierten Spezies möglich ist, wenn diese gemeinsam in der Probe vorliegen (Abbildung 5.2.2.2). Dies belegt die hohe Speziesauflösung der AUZ und untermuert die Aussagekraft der gemessenen s -Wertdifferenz von 0,3 S zwischen dem A β 42-Monomer und dem A β 42-Monomer-D3-Komplex (Abbildung 5.2.1.2 und 5.2.2.1). Vorangegangen erfolgten Interaktionsuntersuchungen von A β 42 mit D3 bei einem 20 μ M äquimolaren Konzentrationsverhältnis im Einwellenlängendetektionsmodus der Absorptionsoptik, wobei keine Komplexbildung nachweisbar war (Abbildung 5.2.1.1). Es konnten in Gegenwart von D3 keine größeren A β 42-Aggregate im Bereich zwischen 4 bis 18 S nachgewiesen werden, sondern nur der A β 42-Monomerpeak bei ca. 0,7 S.

Dies könnte durch unterschiedliche Bindungsaffinität des D3 zu monomerem und oligomerem A β 42 erklärbar sein, da in einer 20 μ M A β 42-Probe deutlich mehr oligomere Strukturen zu erwarten sind, als in einer 10 μ M A β 42-Probe und ein Teil des in der Probe enthaltenen D3 mit diesen oligomeren Strukturen zum Boden der Messzelle sedimentiert. Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie-Messungen mit monomerem, oligomerem und fibrillärem A β 42 lassen auf eine erhöhte Affinität von D3 zu oligomerem A β 42 schließen, was durch den Spiegelbild-Phagen-Display-Selektionsprozess des D3 gegen monomeres und möglicherweise kleine A β 42-Oligomere erklärt wird, wobei keine Angaben bezüglich Eigenschaften dieser oligomeren Spezies gemacht werden [69]. In einem A β 42-Aggregationsassay konnte eine Reduktion von A β 42-Oligomeren mit einem geschätzten s -Wert von 5 - 7 S durch D3 gemessen werden, was etwa 23 monomeren A β 42-Einheiten entspricht [70]. *In silico* Studien postulieren eine erhöhte Affinität von D3 zu dem A β 42-Monomer, als gegen das ebenfalls in der Simulation untersuchte A β 42-Pentamer [18]. Des Weiteren wurde FITC-markiertes D3-Peptid (FITC-D3) für den Monomerbindungsnachweis getestet (Abbildung 5.2.2.4). Der Einsatz von FITC-D3 würde aufgrund eines größeren Molekulargewichtsunterschiedes zwischen freiem FITC-D3 und im Komplex gebundenem FITC-D3 zu deutlich größeren s -Wertdifferenzen und zu einem weniger problembehafteten Komplexnachweis führen. Unspezifische Oberflächenadsorptionen des stark positiv geladenen FITC-D3 an hydrophobe Messzellenbestandteile und zusätzliche Fluorophor-Stacking-Effekte machten die Verwendung von FITC-D3 unmöglich, trotz Zugabe von 0,01 % Tween 20 in dem verwendeten HEPES-Puffer. Die Zugabe eines geringen Prozentsatzes an Serumalbuminen zu Proben führt zu einer Sättigung hydrophober Oberflächen, damit einhergehend zu einer Verringerung unspezifischer Adsorptionsverhalten von Fluoreszenzmarkern und zu einer Signalintensitätserhöhung. Allerdings kann dieses Vorgehen nur angewandt werden, wenn derartige Probenzusätze die s -Wertverteilung nicht beeinflussen [35]. Ein Hauptproblem bei einem Interaktionsnachweis des A β 42-Monomers mit einem Liganden in der AUZ ist, dass A β 42 in seiner monomeren Konformation nicht stabil in Lösung vorliegt, sondern ab einer bestimmten Konzentration an in eine β -faltblattreiche Struktur umfaltet und aggregiert [11]. In wässriger Lösung liegt A β in ungeordnetem Zustand vor und weist einen höheren Formparameter auf, was zu einem geringen Sedimentationsverhalten führt [18, 71, 72]. Diese ungeordnete Struktur wurde in *in silico* Studien berechnet, durch schnelle Umfaltungsprozesse zwischen α -helikalen, β -faltblattreichen und unstrukturierten Strukturanteilen erklärt und experimentell in NMR-Studien bestimmt [11]. Nur in dem Zeitraum in dem das A β 42-Monomer intrinsisch ungeordnet vorliegt, kann es zwischen diesem und D3 zur Komplexbildung kommen, ohne dass gleichzeitig der Aggregationsprozess des A β 42 selbst als Konkurrenzprozess dem System freies A β 42-Monomer entzieht und damit die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen A β 42-Monomerbindung reduziert.

Wie lange dieser intrinsisch ungeordnete Zustand vorliegt, hängt direkt von der Konzentration des A β 42-Monomers in Bezug auf die Gesamtkonzentration von A β 42 in der Lösung ab. Ist die Konzentration an A β 42-Monomer von Beginn an gering, die Konzentration an Nukleationskeimen relativ hoch, überwiegt der Aggregationsprozess über dem Prozess der Monomerbindung durch Liganden und die effektiv messbare Komplexkonzentration sinkt. Erfolgt eine Monomerbindung durch D3, besteht weiterhin das Problem, dass es sich um einen kleinen Komplex, mit nur einer kleinen s -Wertdifferenz zum A β 42-Monomer handelt. Geringe Affinitäten der Interaktionspartner können zu schnellen Assoziations- und Dissoziationsprozessen während der Zentrifugation führen, so dass die beiden Interaktionspartner nicht in Form eines stabilen Komplexes sedimentieren, sondern die errechnete s -Wertspezies ein Mittelwert aus den s -Werten der freien Komponenten und dem Komplex darstellt. In der Literatur wird dies als „reaction boundary - Reaktionsgrenzschicht“ beschrieben, bei der sich sowohl die Interaktionsprozesse, als auch die Sedimentationsprozesse der Interaktionspartner überlagern [66, 73, 74]. *In silico* Studien zur Untersuchung der A β 42-D3-Interaktion stellten fest, dass eine Bindung von D3 an das A β 42-Monomer zu einer ungeordneteren Struktur des A β 42-Monomers führt. D3 selbst nimmt aufgrund repulsiver Kräfte seiner fünf positivgeladenen Arginine ebenfalls eine ungeordnete Sekundärstruktur ein, was schlussfolgern lässt, dass der Gesamtkomplex ebenfalls eine ungeordnete Struktur aufweist. Zudem konnte bei den *in silico* Studien festgestellt werden, dass D3 eine stärkere Affinität zu dem A β 42-Monomer aufweist, als gegen das ebenfalls in der Simulation untersuchte A β 42-Pentamer [11, 18]. Das unterschiedliche Bindungsverhalten von argininreichen Peptidstrukturen an Proteine ist eine bekannte Beobachtung [75, 76]. Dieses Bindungsverhalten hängt neben der peptidbasierten Zielstruktur von den vorliegenden Lösungsmittelbedingungen, wie z.B. pH-Wert und Viskosität, ab [75]. Speziell bei der Interaktion mit verschiedenen A β -Peptiden kommt es in Abhängigkeit von der Anzahl und Anordnung der Arginine entweder zur Bildung von transienten Peptidstrukturen oder zur Bildung stabiler Komplexe [76]. Weitere Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie-Messungen mit verschiedenen D3-Derivaten belegen die Relevanz der Argininanordnung im D3-Peptid für das Bindungsverhalten an A β 42. So führen im Fall von cD3r die Zyklisierung und eine zusätzliche Arginininsertion zu einer 5-fach höheren Affinität von cD3r zu A β 42 als im Vergleich zum nicht-modifizierten D3 [67]. Neben der Tatsache, dass bei dem Interaktionsnachweis des A β 42-Monomers und D3 die s -Wertauflösung im maximal möglichen Gravitationsfeld der AUZ nahe am Detektionslimit liegt, kann der Einsatz der Fluoreszenzoptik, mit der hier notwendigen Fluoreszenzmarkierung, zu möglichen Artefakten führen. Verunreinigungen der Probe oder Messzellenbestandteile mit freiem Fluorophor können zu unspezifischen Signalen, damit einhergehender Hintergrundfluoreszenzerhöhung und einer Verschiebung des Detektionslimits zu höheren Intensitäten führen [77].

Die Lokalisation des Meniskus während des Fittens, Konvektionsbewegungen während der Sedimentation, mangelnde Materialqualität der Messzellenbestandteile, Temperatur- und Lichtquellenintensitätsschwankungen und die exakte Ausrichtung der Messzellen im Rotor stellen weitere methodische Schwachpunkte dar, die zu den gemessenen Standardabweichungen in Kapitel 4.1 des 1 μM FITC-A β 42-Monomers beigetragen haben könnten [78, 79, 80]. Neben der Detektion des A β 42-Monomerpeaks wurde eine zweite, konzentrationsbezogen deutlich kleinere *s*-Wertspezies gemessen, deren Lokalisation unabhängig einer Ligandenzugabe zwischen 1,8 – 2,5 S variierte. Im Durchschnitt konnte für diese *s*-Wertspezies ein Gesamtkonzentrationsanteil der sedimentierenden Grenzschicht von ca. 1,5 - 2,5 % ermittelt werden. Ausgeschlossen sind dabei Proben, die sich in PBS-Puffer befanden, da dieser als aggregationsfördernd gilt.

7.2 Charakterisierung von Nanopartikeln in der AUZ

Im Gegensatz zu biologischen Makromolekülen weisen NP eine ausgeprägte intrinsische Größen-, Form- und Dichtevervariabilität auf, was zu einer deutlich breiteren *s*-Wertverteilung und nicht-idealem Sedimentationsverhalten führt [81]. Die Dichte von NP wird aufgrund ihrer großen Oberfläche stark durch Veränderungen der Oberflächenladungen beeinflusst, die sich durch elektrostatische Gradienten während der Zentrifugation ändern kann [26]. Die Untersuchung des Einflusses von Oberflächenladungen auf die *s*-Wertverteilung erfordert die Durchführung systematischer Messreihen in Lösungsmitteln mit verschiedenen Ionenstärken [82]. Änderungen der Oberflächenladungen können zu Polymerisations- und Agglomerationsprozessen oder einem kompletten Ausfallen der Partikel führen [26, 36]. Weitere Schwierigkeiten bei der Arbeit mit NP in der AUZ ergeben sich durch systematische Zusammenhänge zwischen dem Sedimentationsverhalten und der NP-Konzentration, der Absorptionswellenlänge und Streueffekten des Lichtes durch die NP [36, 81]. Zwecks Etablierung eines AUZ-basierten Charakterisierungsprinzips ligandenmodifizierter NP mit anschließender Quantifizierung der Oberflächenmodifikation wurden Interaktionsstudien von Goldnanopartikeln (AuNP) mit A β 42 und BSA als Liganden durchgeführt. Dafür wurde das Sedimentationsverhalten von unmodifizierten 5-nm- und 10-nm-AuNP untersucht und für die 10-nm-AuNP ein *s*-Wert im verwendeten Natriumphosphat-Puffer von 620 S bestimmt (Tabelle 6.2.1.1). Eine Ligandenbindung an die Oberfläche der AuNP führte unabhängig der Partikelgröße und des Liganden zu einer Abnahme der Peakbreite der *s*-Wertverteilung. Dies steht in Einklang mit publizierten Ergebnissen, wo ebenfalls für unmodifizierte 10-nm-AuNP *s*-Werte von ca. 600 - 650 S bestimmt und eine Abnahme der Peakbreite bei Ligandenbindung festgestellt wurden [62, 83, 84]. Im weiteren Verlauf wurden Zugaben von 1 μM bis 7 μM A β 42 zu den 5-nm- und 10-nm-AuNP durchgeführt.

Dabei wurde bei den 10-nm-AuNP bereits bei 1 μM A β 42-Zugabe eine Oberflächensättigung beobachtet. Bei den 5-nm-AuNP trat die Oberflächensättigung erst nach einer Zugabe von 3 μM A β 42 ein (Tabelle 6.2.1.6), obwohl die Oberfläche eines 5-nm-AuNP absolut gesehen kleiner ist, als bei einem 10-nm-AuNP (Tabelle 6.2.1.3). Beim Vergleich der zur Verfügung stehenden Gesamtoberflächen der 5-nm- und 10-nm AuNP-Proben wird ersichtlich, dass die Gesamtoberfläche bei den 5-nm-AuNP-Proben um den Faktor 2,32 höher ist als bei den 10-nm-AuNP-Proben (Tabelle 6.2.1.3), was die dreifach höhere A β 42-Konzentration zur Oberflächensättigung der 5-nm-AuNP erklärt und die Verlässlichkeit des hier etablierten Analyseverfahrens untermauert. Systematische Interaktionsstudien von Proteinen des humanen Bluts mit 1 – 100 nm AuNP im Durchmesser lassen auf ein nichtkooperatives Bindungsverhalten von HSA an die AuNP schließen. Das nichtkooperative Bindungsverhalten des HSA kann auf sterische Effekte und eine fortschreitende Verringerung der Assoziationsenergie pro Partikel zurückgeführt werden, wenn es zur weiteren Proteinadsorption an die Oberfläche der AuNP kommt [59]. Ähnliche Effekte konnten auch bei Studien mit 10 – 20 nm Eisen/Platinum-NP bzw. Cadmiumselenid/Zinkselenid-NP mit HSA festgestellt werden [85]. Aus den in Tabelle 6.2.1.6 dargestellten Ergebnissen lässt sich schließen, dass unabhängig der Partikelgröße bei gleicher Ligandenkonzentration immer weniger BSA-Moleküle an die AuNP-Oberfläche binden, als A β 42-Moleküle. Mit zunehmender Ligandenkonzentration sinkt kontinuierlich, ohne erkennbaren Zusammenhang zwischen dem gewählten Liganden und der AuNP-Größe, die berechnete Dichte der mit Liganden gebundenen AuNP (Tabelle 6.2.1.4 und 6.2.1.5). Diese direkte Korrelation zwischen Ligandenkonzentration und Dichteverringerung von 10-nm-AuNP wird ebenfalls in entsprechenden Veröffentlichungen beschrieben [62, 83]. Bezüglich des Einflusses von NP auf das Aggregationsverhalten von A β ergibt sich ein sehr heterogenes Bild. Dabei werden NP sowohl A β -aggregationsfördernde als auch -inhibierende Eigenschaften und damit verbunden, unterschiedliche toxizitätsbeeinflussende Wirkungen auf A β -Oligomere zu geschrieben [28, 86, 87]. Neben dem Material der NP spielen Oberflächenmodifikationen, wie Ladungen und zusätzlich kleine Liganden, eine wichtige Rolle. Die Bindung von BSA an NP kann sowohl über elektrostatische Interaktionen, durch z.B. Lysine auf der Oberfläche des BSAs oder negative Ladungen an der Oberfläche der NP, als auch hydrophobe Interaktionen erfolgen [21, 57, 58, 59]. Im Fall von AuNP und BSA kann es zu einer direkten Ausbildung von Thiolbindungen zwischen dem Gold und der Cysteine auf der Oberfläche des BSA kommen [58, 59].

8 Zusammenfassung

Bei der Alzheimerschen Demenz (AD) handelt es sich um eine neurodegenerative Erkrankung des menschlichen Hirns, in deren pathologischem Prozess dem Amyloid- β -Peptid ($A\beta$) und dessen Aggregationsprodukten eine zentrale Rolle zugesprochen wird. Ansatzpunkte zur erfolgreichen Modulation der $A\beta$ -Aggregationsprozesse stellen der Einsatz von D-enantiomeren Peptiden (D-Peptide) und Nanopartikel (NP), die als Trägersysteme fungieren, da. Eine biophysikalische Charakterisierung des hier untersuchten D-Peptides D3, als auch der NP, wurde mittels Analytischer Ultrazentrifugation (AUZ) durchgeführt. Dabei wurde sowohl die Möglichkeit der Absorptions- als auch der Fluoreszenzmessung der zu analysierenden Probenbestandteile genutzt. Die AUZ ermöglicht als Absolutmethode in Lösung die quantitative Analyse von Makromolekülen, basierend auf deren hydrodynamischer Separation, im angelegten Zentrifugalfeld. Nach der Charakterisierung des D-Peptides und der NP als Einzelkomponenten, wurden Interaktionsstudien im mikromolaren Bereich mit $A\beta_{42}$ und Serumalbuminen durchgeführt. Mit Einsatz des Fluoreszenzdetektionssystems konnte erfolgreich eine Bindung von D3 im unteren zweistelligen mikromolaren Konzentrationsbereich an monomeres, fluoreszenzmarkiertes $A\beta_{42}$ nachgewiesen werden. Simulationen und Messungen im selbigen Konzentrationsbereich mit dem Zweiwellendetektionsmodus der Absorptionsoptik, untermauern die beobachtete $A\beta_{42}$ -Monomerbindung von D3. Unter Verwendung mehrstufiger Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe wurde erfolgreich eine *s*-Wertspezifische Charakterisierung von HSA-Nanopartikelpräparationen (HSA-NP) durchgeführt. Mit anschließendem Einsatz des Fluoreszenzdetektionssystems konnte erfolgreich eine im unteren mikromolaren Bereich stattfindende Wechselwirkung der zuvor charakterisierten und fluoreszenzmarkierten HSA-NP mit $A\beta_{42}$ nachgewiesen werden. Vorangegangen erfolgte ein Bindungsnachweis von monomerem HSA mit monomerem, fluoreszenzmarkiertem $A\beta_{42}$ im einstelligen mikromolaren Konzentrationsbereich. Anhand von Goldnanopartikeln und $A\beta_{42}$ und BSA, als bindende Proteine, konnte erfolgreich eine Etablierung eines allgemeingültigen Vorgehens für eine AUZ-basierte Charakterisierung ligandenmodifizierter NP mit einer darauf aufbauenden Quantifizierung der Oberflächenmodifikation der NP durch diese Liganden, erfolgen. Basierend auf den physikalisch-technischen Grundlagen der AUZ, dem Einsatz der Absorptions- und Fluoreszenzdetektionssystemen und der Arbeit in den Bereichen Proteinanalytik und Nanopartikelanalyse werden in dieser Dissertation die breiten Anwendungsmöglichkeiten der Analytischen Ultrazentrifugation deutlich.

9 Summary

The Alzheimer's Disease is a neurodegenerative disorder of the human brain. The pathological process of AD is characterized by excessive production and abnormal aggregation of the amyloid β peptides ($A\beta$). The central role of $A\beta$ in the pathogenesis of AD has made it an important target for drug development. Either by inhibiting the generation of $A\beta$ or by modulating its aggregation process is considered to be a promising approach for disease intervention.

Previous studies of the D-enantiomeric peptides (D-peptides) have demonstrated the effect of these D-peptides on the self-aggregation of $A\beta$. This work applied analytical ultracentrifugation (AUC) to gain more insight into the structural interaction between $A\beta$ and D-peptides. AUC is a first principle method and allows the analysis of macromolecules based on their hydrodynamic separation in a gravitational field. Both the absorption detection system and fluorescence detection system (FDS) were involved to investigate ligand- $A\beta$ interaction. Direct bindings of the D-peptide D3 to monomeric fluorophore-labeled $A\beta_{42}$ in a lower binary micromolare range were successfully detected by FDS-AUC measurement. Additional studies using two-wavelength detection mode of the absorption detection system also provide a direct binding of D3 to monomeric $A\beta_{42}$ in a concentration range similar to the FDS-AUC study.

Nanoparticles (NP) are widely used drug carrier and may have promising applications in the central nervous system diseases. The s -value of human serum albumin nanoparticles (HSA-NP) were precisely determined by gravitational-sweep sedimentation analysis. The interaction between the fluorophore-labeled HSA-NP and $A\beta_{42}$ was characterized by FDS-AUC analysis. The results revealed direct bindings of $A\beta_{42}$ to the fluorophore-labeled HSA-NP in a binary micromolare range. To further confirm the interaction, monomeric HSA and monomeric fluorophore-labeled $A\beta_{42}$ were subjected to FDS-AUC measurement. Evidence from AUC analysis substantiated the finding that HSA binds directly to $A\beta_{42}$ in a one-figure micromolare range. Finally, a general procedure for AUC based characterization of ligand modified NP was established through investigating the interaction among gold nanoparticles, $A\beta_{42}$ and bovine serum albumin (BSA) by using AUC analysis. This procedure enables accurate quantification of different kinds of ligand modified NP at low concentrations.

This study demonstrated for the first time that D3 bind directly to monomeric $A\beta_{42}$. Besides, the interaction between ligand-modified NP and $A\beta_{42}$ was also analyzed in detail. These findings would be beneficial to clarify the underlying mechanisms responsible for the efficacy of drug candidates. In additional, this work also suggested that analytical ultracentrifugation is a powerful and informative approach in the investigation of ligand-peptide interaction.

10 Selbstständigkeitserklärung

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

Düsseldorf, _____

11 Danksagung

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Willbold für die Möglichkeit der Promotion in seiner Abteilung.

Bei Frau Dr. Nagel-Steger möchte ich mich für die Betreuung und die vielen Diskussionen bedanken, die mich während der Arbeit vorangebracht haben und der ganzen Arbeitsgruppe Nagel-Steger für die schöne Zeit.

12 Literaturverzeichnis

- [1] Alzheimer A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und psychisch-gerichtliche Medizin (Berlin) 64:146-148.
- [2] Grammas P. (2011). Neurovascular dysfunction, inflammation and endothelial activation: Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. Journal of Neuroinflammation 2011, 8:26.
- [3] Cavalluci V. *et al.* (2012). A β Toxicity in Alzheimer's Disease. Mol Neurobiol (2012) 45:366–378.
- [4] World Alzheimer Report 2015. Alzheimer's Disease International.
- [5] Sperling R.A. *et al.* (2011). Testing the right target and right drug at the right stage. Sci. Transl. Med. 3, 111cm33 (2011).
- [6] Hardy J.A. & Higgins G.A. (1992). Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis. Science 1992, April 10;256(5054):184-5.
- [7] Selkoe D. J. & Hardy J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. EMBO Molecular Medicine (2016) emmm.201606210.
- [8] Selkoe D.J. (2004). Cell biology of protein misfolding: The examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. Nature Cell Biology, Volume 6, Number 11, November 2004.
- [9] Benilova I. *et al.* (2012). The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. Nature Neuroscience, Volume 15, Number 3, March 2012.
- [10] Socia S.J. *et al.* (2010). The Alzheimer's Disease-Associated Amyloid β -Protein Is an Antimicrobial Peptide. PLoS ONE 5(3): e9505.
- [11] Olubiyi O.O & Strodel B. (2012). Structures of Amyloid β -peptides A β 1-40 and A β 1-42 as influenced by pH and a D-Peptide. J. Phys. Chem. B 2012, 116, 3280–3291.
- [12] Zhang Y. & Lee D.H.S (2011). Sink Hypothesis and Therapeutic Strategies for Attenuating A β Levels. The Neuroscientist, 17(2) 163–173.
- [13] Lai A.Y. *et al.* (2012). Clearance of amyloid- β peptides by microglia and macrophages: the issue of what, when and where. Future Neurol. 2012 March 1; 7(2): 165–176.
- [14] Georgievska B. *et al.* (2015). Revisiting the peripheral sink hypothesis: inhibiting BACE1 activity in the periphery does not alter β -amyloid levels in CNS. J. Neurochem. (2015) 132, 477–486.
- [15] Henderson J.S. *et al.* (2014). Sustained peripheral depletion of amyloid- β with a novel form of neprilysin does not affect central levels of amyloid- β . Brain 2014; 137; 553–564.

- [16] Sun N. *et al.* (2012). A Survey of Peptides with Effective Therapeutic Potential in Alzheimer's Disease Rodent Models or in Human Clinical Studies. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2012, Vol. 12, No. 5.
- [17] Funke S. & Willbold D. (2012). Peptides for Therapy and Diagnosis of Alzheimer's Disease. *Current Pharmaceutical Design*, 2012, 18, 755-767.
- [18] Olubiyi O.O. *et al.* (2014). Amyloid Aggregation Inhibitory Mechanism of Arginine-rich D-peptides. *Current Medicinal Chemistry*, 2014, 21, 1448-1457.
- [19] Funke S. *et al.* (2010). Oral Treatment with the D-Enantiomeric Peptide D3 Improves the Pathology and Behavior of Alzheimer's Disease Transgenic Mice. *ACS Chem. Neurosci.* (2010), 1, 639–648.
- [20] Leithold L.H.E. (2015). Pharmacokinetic Properties of a Novel D-Peptide Developed to be Therapeutically Active Against Toxic β -Amyloid Oligomers. *Pharm Res* (2016) 33:328–336.
- [21] Jain S. *et al.* (2012). Gold nanoparticles as novel agent for cancer therapy. *The British Journal of Radiology*, 85 (2012), 101–113.
- [22] Krol S. *et al.* (2013). Therapeutic Benefits from Nanoparticles: The Potential Significance of Nanoscience in Diseases with Compromise to the Blood Brain Barrier. *Chem. Rev.* 2013, 113, 1877–1903.
- [23] Mu Q. *et al.* (2014). Chemical Basis of Interactions Between Engineered Nanoparticles and Biological Systems. *Chem. Rev.* 2014, 114, 7740–7781.
- [24] Diaz L. *et al.* (2015). Characterization of polymeric nanomaterials using analytical ultracentrifugation. *Environ. Sci. Technol.* 2015, 49, 7302–7309.
- [25] Boulos S. P. *et al.* (2013). Nanoparticle–Protein Interactions: A Thermodynamic and Kinetic Study of the Adsorption of Bovine Serum Albumin to Gold Nanoparticle Surfaces. *Langmuir* 2013, 29, 14984–14996.
- [26] Walter J. *et al.* (2014). Multidimensional Analysis of Nanoparticles with Highly Disperse Properties Using Multiwavelength Analytical Ultracentrifugation. *ACS Nano.* 2014 Sep 23;8(9):8871-86.
- [27] Kim B.Y.S. *et al.* (2010). Nanomedicine. *N Engl J Med* 2010;363:2434-43.
- [28] Zhang M. *et al.* (2013). Nanomaterials for Reducing Amyloid Cytotoxicity. *Adv. Mater.* 2013, 25, 3780–3801.
- [29] Zaman M. *et al.* (2014). Nanoparticles in relation to peptides and protein aggregation. *International Journal of Nanomedicine* 2014;9 899–912.
- [30] Nakamoto M. *et al.* (2016). Design of Synthetic Polymer Nanoparticles That Facilitate Resolubilization and Refolding of Aggregated Positively Charged Lysozyme. *J. Am. Chem. Soc.* 2016, 138, 4282–4285.

- [31] Brown P.H. *et al.* (2008). Characterizing Protein-Protein Interactions by Sedimentation Velocity Analytical Ultracentrifugation. *Current Protocols in Immunology* 18.15.1-18.15.39, April 2008.
- [32] Pauck T. & Colfen H. (1997). Determination of particle size distributions with angström resolution. *Colloid & Polymer Science*, Vol. 275, No. 2 (1997).
- [33] Zhao H. *et al.* (2013). Tools for the Quantitative Analysis of Sedimentation Boundaries Detected by Fluorescence Optical Analytical Ultracentrifugation. *PLoS ONE* 8(10): e77245.
- [34] Cole J.L. *et al.* (2008). Analytical Ultracentrifugation: Sedimentation velocity and sedimentation equilibrium. *Methods Cell Biol.* 2008;84:143–179.
- [35] Zhao H. *et al.* (2003). Analysis of High Affinity Self-Association by Fluorescence Optical Sedimentation Velocity Analytical Ultracentrifugation of Labeled Proteins: Opportunities and Limitations. *PLoS ONE* 8(12): e83439.
- [36] Planken K. L. & Cölfen H. (2010). Analytical ultracentrifugation of colloids. *Nanoscale*, 2010, 2, 1849–1869.
- [37] Mächtle W. & Börger C. (2006). *Analytical Ultracentrifugation of Polymers and Nanoparticles*. Springer Verlag, 2006.
- [38] Svedberg T. & Pedersen K. O. (1940). *The Ultracentrifuge*. Oxford University Press, London (1940).
- [39] Lamm O. (1929). Die Differentialgleichung der Ultrazentrifugierung. *Almqvist & Wiksell*, 1929 (Arkiv för Matematik, Astronomi och Fysik)
- [40] Laue T.M. *et al.* (1992). Computer-aided interpretation of analytical sedimentation data for proteins. *Analytical ultracentrifugation in biochemistry and polymer science* (eds. S.E. Harding *et al.*), pp. 90–125. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
- [41] Cohn E. J. *et al.* (1943). Proteins, amino acids and peptides as Ions and Dipolar Ions. *The American Journal of the Medical Sciences* 205 (1943), Nr. 6, S. 884.
- [42] Stafford W.F. & Braswell E.H. (2004). Sedimentation velocity, multi-speed method for analyzing polydisperse solutions. *Biophysical Chemistry* 108 (2004), 273–279.
- [43] Mächtle W. (1999). High-Resolution, Submicron Particle Size Distribution Analysis Using Gravitational-Sweep Sedimentation. *Biophysical Journal*, Volume 76, February 1999, 1080–1091.
- [44] Schuck P. & Rossmannith P. (2000). Determination of the Sedimentation Coefficient Distribution by Least-Squares Boundary Modeling. *Biopoly* 54: 328–341, 2000.
- [45] Schuck P. (2000). Size-Distribution Analysis of Macromolecules by Sedimentation Velocity Ultracentrifugation and Lamm Equation Modeling. *Biophysical Journal*, Volume 78, March 2000, 1606–1619.

- [46] Schuck P. *et al.* (2002). Size-Distribution Analysis of Proteins by Analytical Ultracentrifugation: Strategies and Application to Model Systems. *Biophysical Journal*, Volume 82, February 2002, 1096–1111.
- [47] Brautigam C.A. (2015). Calculations and Publication-Quality Illustrations for Analytical Ultracentrifugation Data. *Methods in Enzymology*. Vol. 562, 2015, 109-133.
- [48] Duong-Ly K.C. & Gabelli S.B. (2014). Salting out of Proteins Using Ammonium Sulfate Precipitation. *Methods of Enzymology*, Volume 541, 2014, 85-94.
- [49] Kirschbaum J. (1970). Tetrameric Structure and conformation of Heat-Microaggregated Human Serum Albumin. *Journal of Pharmaceutical Sciences* Vol. 59, No.6 June 1970 854-856.
- [50] Rózga M. *et al.* (2007). The binding constant for amyloid A β 40 peptide interaction with human serum albumin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 364 (2007) 714–718.
- [51] Stanyon H.F. & Viles J.H. (2012). Human serum albumin can regulate Amyloid- β Peptide Fiber Growth in the Brain Interstitium. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 287, No. 33, pp 28163–28168, August 10, 2012.
- [52] Rahmani S. *et al.* (2015). Long-circulating Janus nanoparticles made by electrohydrodynamic co-jetting for systemic drug delivery applications. *J Drug Target*. 2015 ; 23(0): 750–758.
- [53] Dieckmann Y. *et al.* (2009). Particle size distribution measurements of manganese-doped ZnS nanoparticles. *Anal. Chem.* 2009, 81, 3889–3895.
- [54] Vogel V. *et al.* (2002). Characterization of serum albumin nanoparticles by sedimentation velocity analysis and electron microscopy. *Progr Colloid Polym Sci* (2002) 119:31–36.
- [55] Atmeh R.F. *et al.* (2007). Albumin Aggregates: Hydrodynamic shape and physico-chemical properties. *Jordan Journal of Chemistry* Vol. 2 No.2, 2007, pp. 169-182.
- [56] Treuel L. *et al.* (2010). The Influence of Surface Composition of Nanoparticles on their Interactions with Serum Albumin. *ChemPhysChem* 2010, 11, 3093 – 3099.
- [57] Zhong R. *et al.* (2014). Discrete Nanoparticle-BSA Conjugates Manipulated by Hydrophobic Interaction. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2014, 6, 19465–19470.
- [58] Brewer S.H. *et al.* (2005). Probing BSA Binding to Citrate-Coated Gold Nanoparticles and Surfaces. *Langmuir* 2005, 21, 9303-9307.
- [59] De Paoli Lacerda S.H. *et al.* (2010). Interaction of Gold Nanoparticles with Common Human Blood Proteins. *ACS NANO*, VOL. 4, NO. 1, 365–379, 2010.
- [60] Axelsson I. (1978). Characterization of proteins and other macromolecules by agarose gel chromatography. *Journal of Chromatography A* 152 (1): 21–32.

- [61] Jamison J.A. *et al.* (2008). Size-Dependent Sedimentation Properties of Nanocrystals. ACS NANO, VOL. 2, NO. 2, 311-319, 2008.
- [62] Benoit N.D. *et al.* (2012). Measuring the Grafting Density of Nanoparticles in Solution by Analytical Ultracentrifugation and Total Organic Carbon Analysis. Anal. Chem. 2012, 84, 9238–9245.
- [63] Broersen K. *et al.* (2011). A standardized and biocompatible preparation of aggregate-free amyloid beta peptide for biophysical and biological studies of Alzheimer's disease. Protein Engineering, Design & Selection vol. 24 no. 9 pp. 743–750, 2011.
- [64] Garvey M. *et al.* (2011). Phosphate and HEPES buffers potently affect the fibrillation and oligomerization mechanism of Alzheimer's A β peptide. Biochemical and Biophysical Research Communications 409 (2011) 385–388.
- [65] Fändrich M. (2007). Absolute Correlation between Lag Time and Growth Rate in the Spontaneous Formation of Several Amyloid-like Aggregates and Fibrils. J. Mol. Biol. (2007) 365, 1266–1270.
- [66] Dam J. *et al.* (2005). Sedimentation Velocity Analysis of Heterogeneous Protein-Protein Interactions: Lamm Equation Modeling and Sedimentation Coefficient Distributions $c(s)$. Biophysical Journal, Volume 89, July 2005, 619–634.
- [67] Ziehm T. *et al.* (2016). Increase of Positive Net Charge and Conformational Rigidity Enhances the Efficacy of D-Enantiomeric Peptides Designed to Eliminate Cytotoxic A β Species. ACS Chem. Neurosci. 2016, 7, 1088–1096.
- [68] Schuck P. *et al.* (1998). Determination of Sedimentation Coefficients for Small Peptides. Biophysical Journal, Volume 74, January 1998, 466–474.
- [69] Bartnik D. *et al.* (2010). Differently Selected d-Enantiomeric Peptides Act on Different A β Species. Rejuvenation Research, Volume 13, Number 2-3, 2010.
- [70] Brener O. *et al.* (2015). QIAD assay for quantitating a compound's efficacy in elimination of toxic A β oligomers. *Scientific Reports* 5, Article number: 13222 (2015).
- [71] Cuchillo R. *et al.* (2012). Mechanisms of small-molecule binding to intrinsically disordered proteins. Biochemical Society Transactions (2012) Volume 40, part 5.
- [72] Manon F. & Ebel C. (2010). Analytical ultracentrifugation, a useful tool to probe intrinsically disordered proteins. Instrumental Analysis of Intrinsically Disordered Proteins: Assessing Structure and Conformation. 2010 John Wiley & Sons, Inc..
- [73] Dam J. & Schuck P. (2005). Sedimentation Velocity Analysis of Heterogeneous Protein-Protein Interactions: Sedimentation Coefficient Distributions $c(s)$ and Asymptotic Boundary Profiles from Gilbert-Jenkins Theory. Biophysical Journal Volume 89 July 2005 651–666.

- [74] Schuck P. (2010). Diffusion of the Reaction Boundary of Rapidly Interacting Macromolecules in Sedimentation Velocity. *Biophysical Journal*, Volume 98, June 2010, 2741–2751.
- [75] Inoue N. *et al.* (2014). Specific Decrease in Solution Viscosity of Antibodies by Arginine for Therapeutic Formulations. *Mol. Pharmaceutics* 2014, 11, 1889–1896.
- [76] Das P. *et al.* (2014). Interaction of Amyloid Inhibitor Proteins with Amyloid Beta Peptides: Insight from Molecular Dynamics Simulations.
- [77] Kingsbury J.S. & Laue T.M. (2011). Fluorescence-Detected Sedimentation in Dilute and Highly Concentrated Solutions. *Methods in Enzymology*, Volume 492, 2011, Pages 283–304.
- [78] Arthur K.K. *et al.* (2008). Detection of Protein Aggregates by Sedimentation Velocity Analytical Ultracentrifugation (SV-AUC): Sources of Variability and Their Relative Importance. *Journal of Pharmaceutical Science*, Vol. 98, No. 10, October 2009.
- [79] Gabelson J.P. (2011). Measuring low levels of protein aggregation by sedimentation velocity. *Methods* 54 (2011) 83–91.
- [80] Pekar A. *et al.* (2007). Quantitation of aggregates in therapeutic proteins using sedimentation velocity analytical ultracentrifugation: Practical considerations that affect precision and accuracy. *Analytical Biochemistry* 367 (2007) 225–237.
- [81] Jamison, J.A. *et al.* (2009). Applying analytical ultracentrifugation to nanocrystal suspensions. *Nanotechnology* 20 (2009) 355702 (10pp).
- [82] Carney, R.P. *et al.* (2011). Determination of nanoparticle size distribution together with density or molecular weight by 2D analytical ultracentrifugation. *Nat. Commun.* 2:335 doi: 10.1038/ncomms1338 (2011).
- [83] Falabella J.B. *et al.* (2010). Characterization of Gold Nanoparticles Modified with Single-Stranded DNA Using Analytical Ultracentrifugation and Dynamic Light Scattering. *Langmuir* 2010, 26(15), 12740–12747.
- [84] Calabretta M. *et al.* (2005). Analytical Ultracentrifugation for Characterizing Nanocrystals and Their Bioconjugates. *Nano Lett.*, Vol. 5, No. 5, 2005.
- [85] Röcker C. *et al.* (2009). A quantitative fluorescence study of protein monolayer formation on colloidal nanoparticles. *Nature Nanotechnology* 4, 577 - 580 (2009).
- [86] Kim Y. *et al.* (2016). How Do the Size, Charge and Shape of Nanoparticles Affect Amyloid β Aggregation on Brain Lipid Bilayer? *Sci. Rep.* 6, 19548; doi: 10.1038/srep19548 (2016).
- [87] Rocha S. *et al.* (2008). Influence of fluorinated and hydrogenated nanoparticles on the structure and fibrillogenesis of amyloid beta-peptide. *Biophysical Chemistry* 137 (2008) 35–42.
- [88] Schaefer J. *et al.* (2012). Atomic Force Microscopy and Analytical Ultracentrifugation for Probing Nanomaterial Protein Interactions. *ACS Nano*, 2012, 6 (6), pp 4603–4614.