

# Einzelpartikelanalyse zur Diagnose von Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Alexandra Dybala

aus Herne

Düsseldorf, 20. September 2022

aus dem Institut für Physikalische Biologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichterstatter:

1. Prof. Dr. Dieter Willbold

2. Prof. em. Dr. Dr. h.c. Detlev Riesner

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Oktober 2022

Das Projekt Einzelpartikelanalyse zur Diagnose von Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson wurde in Kooperation mit dem Institut für Strukturbiochemie (IBI-7) am Forschungszentrum Jülich durchgeführt. Das Projekt wurde außerdem durch die iBrain Interdisziplinäre Graduiertenschule für Hirnforschung und Translationale Neurowissenschaften an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit finanzieller Unterstützung durch Prof. Riesner gefördert.





## Eidesstattliche Erklärung

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

Düsseldorf, 20. September 2022

Alexandra Dybala

## Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Riesner, der mich in dem Projekt fortlaufend unterstützt hat und in allen Situationen immer mit einem guten Rat zur Seite stand. Ich danke auch dafür, dass eine freie Gestaltung meines Projekts möglich war und neue Ideen immer unterstützt wurden. Mit Ihnen, Herr Riesner, konnte ich immer über spannende wissenschaftliche Themen diskutieren, aber auch für das eine oder andere private Thema war die Zeit da.

Ebenfalls möchte ich Herrn Professor Willbold für die Unterstützung meines Projekts danken. Herrn Willbold danke ich besonders für das ausgezeichnete Umfeld in Düsseldorf und am Forschungszentrum Jülich, in dem ich meine Arbeit anfertigen konnte. Außerdem danke ich für die Unterstützung und Diskussionen in den regelmäßigen Meetings.

Dr. Oliver Bannach möchte ich herzlich für die Hilfe und Unterstützung zu jeder Zeit danken. Insbesondere bei Fragen zu fachlichen Details konnte ich auf Herrn Bannach zählen. Ich bedanke mich außerdem für die positive und teamorientierte Atmosphäre in der AG Bannach. An dieser Stelle danke ich der gesamten Arbeitsgruppe und ganz besonders Marlene Pils, Victoria Kraemer-Schulien und Lara Blömeke. Marlene Pils stand mir während meiner Arbeit besonders zur Seite.

Ich danke Professor Tamgüney für die fachliche Unterstützung in meinem Projekt und für die aufschlussreiche Kooperation.

Professor Hoyer und Dr. Gremer danke ich für die fachlichen Ratschläge und Hilfe. Ganz herzlich möchte ich mich bei Astrid Wies, Barbara Schulten und Elke Reinartz bedanken, die durch ihre liebevolle Art dem Institut Persönlichkeit verleihen und verliehen haben. Robin Backer danke ich für die tolle Unterstützung im Labor.

Dr. Luitgard Nagel-Steger möchte ich für die ehrlichen und kritischen Diskussionen danken. Seitdem ich das erste Mal ins Institut kam, habe ich sie als Wissenschaftlerin und Vorbild zu schätzen gelernt.

Mein besonderer Dank gilt auch Dennis Thomaßen, der mein Projekt während seiner Bachelorarbeit tatkräftig und mit viel Einsatz und Ideen bereichert hat.

Marc Sevenich und Ian Gering danke ich für die Hilfe im Labor und für den fachlichen Austausch.

I thank Ci Chu for some funny moments in the office.

Ich danke Marie und Anne, die mich eine Weile begleitet haben, für eine lustige und unbeschwerte Zeit.

Dem gesamten Institut möchte ich für die tolle Atmosphäre danken, in der ich arbeiten konnte.

Nicht zuletzt danke ich meinen Freunden, die mich seit über 20 Jahren im Leben begleiten und mich auf allen Wegen immer bestärkt haben. Danke Lisa, Lena, Sandra und Robert.

Ich danke Marcin und meinen Eltern für die Liebe, die Motivation und den starken Rückhalt. Durch euch wird das Schiff nie untergehen :) ... Ich liebe euch.

Für meine Familie & Freunde ...

Der Zweifel ist der Beginn der Wissenschaft. Wer nichts anzweifelt, prüft nichts. Wer nichts prüft, entdeckt nichts. Wer nichts entdeckt, ist blind und bleibt blind.

Teilhard de Chardin

### Zusammenfassung

Morbus Alzheimer ist die häufigste altersbedingte neurodegenerative Krankheit und die häufigste Ursache für eine Demenzerkrankung. Die Alzheimer-Krankheit ist bisher nicht heilbar und vielversprechende Therapieansätze sind in der klinischen Erprobung gescheitert. Daneben erschweren zu späte Diagnosen mögliche Behandlungen, da bei Auftreten von Symptomen, die Krankheit in der Regel weit fortgeschritten ist. Pathophysiologische Veränderungen, wie die Aggregation des Amyloid  $\beta$ -Peptids (A $\beta$ ), können bereits Jahre vor den ersten Symptomen eintreten. In Hinblick auf mögliche Therapieansätze sollte daher frühestmöglich mit der Behandlung begonnen werden. Die Aggregation von Aß und dem Tau-Protein  $(\tau)$  sind charakteristisch für die Alzheimer-Krankheit, während die  $\alpha$ -Synuclein (α-Syn)-Aggregation das hauptsächliche Merkmal für die Parkinson-Krankheit ist. Die aggregierten Proteine können sich unter anderem im Gehirn ablagern oder sich als kleinere Einheiten, den sogenannten Oligomeren, im Körper verbreiten. Daher sind Oligomere auch in Zerebrospinalflüssigkeit (CSF) und anderen Körperflüssigkeiten und Geweben als Biomarker nachgewiesen worden. Der quantitative Nachweis von Oligomeren aus dem Blut ist gegenwärtig das Hauptziel vieler Wissenschaftler. So könnte bei routinemäßigen Blutuntersuchungen die Bestimmung von Oligomeren als prognostischer Marker eingeschlossen werden.

Da die geschätzte Oligomerkonzentration im Blut sehr gering ist, sind hochsensitive Methoden, wie die *surface-based fluorescence intensity distribution analysis* (sFIDA)-Methode notwendig. sFIDA wurde für den Nachweis verschiedener krankheitsrelevanter Aggregate, bestehend aus Prion-Protein (PrP), Amyloid  $\beta$ -Peptid (A $\beta$ ) oder  $\alpha$ -Synuclein ( $\alpha$ -Syn) entwickelt.

Durch spezifische Anlagerung von Monomeren können Oligomere amplifiziert werden, wodurch die Anzahl der Epitope für Detektionssonden und die Oberfläche des Proteinaggregats vergrößert werden.

Das Ziel dieser Arbeit war die Erhöhung der Sensitivität durch Amplifikation von A $\beta$ -Oligomeren mit anschließender Detektion im sFIDA. A $\beta$  weist eine hohe Neigung zur spontanen Aggregation auf, weshalb die kontrollierte Amplifikation erschwert war. Daher wurden die Entwicklungen auf  $\alpha$ -Syn-Aggregate als Biomarker für die Parkinson-Krankheit ausgeweitet.

In dieser Arbeit wurden die Experimente hauptsächlich im Puffersystem mit synthetischem Protein durchgeführt. Ein Amplifikationsprotokoll konnte jeweils für A $\beta$  und  $\alpha$ -Syn erstellt werden. Als wesentliche Erkenntnis dieser Arbeit war der Wechsel von der Amplifikation von immobilisierten Aggregaten auf die Amplifikation in Lösung. Außerdem erwies sich ein basischer pH für die Amplifikation der Oligomere als vorteilhaft, da die spontane Aggregation unterdrückt wurde. Die erstellten Protokolle dienen als Vorarbeit für zukünftige Amplifikationsassays mit natürlichen Oligomeren, beispielsweise aus Blutproben. Erste Ergebnisse für die Amplifikation von Oligomeren aus einer biologischen Probe konnte für  $\alpha$ -Syn-Oligomere aus Gehirnhomogenat einer transgenen Maus mit pathologischen Auffälligkeiten nach Durchführung eines etablierten Proteinfällungsprotokolls erzielt werden. Das im sFIDA gemessene Signal unterschied sich nach Amplifikation deutlich von der Probe einer gesunden Kontrollmaus.

Zukünftig soll das Amplifikationsprotokoll für weitere biologische Proben wie CSF oder Blut angepasst werden.

### Abstract

Alzheimer's disease (AD) is the most common age-related neurodegenerative disease and the most common cause of dementia. So far, there is no cure for AD and promising therapeutic approaches have failed in clinical trials. In addition, late diagnosis complicates possible treatments, as by the time symptoms appear, the disease is usually far advanced. Pathophysiological changes, such as aggregation of Amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ), can occur years before the first symptoms. In view of possible therapeutic approaches, treatment should therefore be started as early as possible. Aggregation of A $\beta$  and the tau protein ( $\tau$ ) are characteristic of AD, while  $\alpha$ -Syn aggregation is the main feature for Parkinson's disease (PD). The aggregated proteins can be deposited in the brain, among other places, or spread throughout the body as smaller units referred to as oligomers. Therefore, oligomers have also been detected in cerebrospinal fluid (CSF) and other body fluids and tissues as biomarkers. Quantitative detection of oligomers from blood is currently the main goal of many scientists. Thus, routine blood tests could include the determination of oligomers as a prognostic marker.

Since the estimated oligomer concentration in blood is very low, highly sensitive methods such as the *surface-based fluorescence intensity distribution analysis* (sFIDA) method are necessary. sFIDA was developed for the detection of different disease-relevant aggregates consisting of Prion-Protein (PrP), Amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ) or  $\alpha$ -Synuclein ( $\alpha$ -Syn).

By the addition of monomers, oligomers can be amplified, increasing the number of epitopes for detection probes and the surface area of the protein aggregate.

The aim of this work was to increase sensitivity by amplifying A $\beta$  oligomers with subsequent detection in sFIDA. A $\beta$  has a high tendency to spontaneous aggregation, which made controlled amplification difficult. Therefore, developments were extended to  $\alpha$ -Syn aggregates as biomarkers for Parkinson's disease.

In this work, the experiments were mainly performed in a buffer system with synthetic protein. An amplification protocol could be established for  $A\beta$  and  $\alpha$ -Syn respectively. A major finding of this work was the change from amplification of immobilised aggregates to amplification in solution. Furthermore, a basic pH proved to be beneficial for the amplification of oligomers as spontaneous aggregation was suppressed. The protocols established serve as preliminary work for future amplification assays with natural oligomers, for example from blood samples. First results for the amplification of oligomers from a biological sample could be obtained for  $\alpha$ -Syn oligomers from brain homogenate of a transgenic mouse with pathological abnormalities after performing an established protein precipitation protocol. The signal measured in sFIDA after amplification was clearly different from the sample from a healthy control mouse.

In the future, the amplification protocol will be adapted for other biological samples such as CSF or blood.

# Inhaltsverzeichnis

1	Einle	eitung	1					
	1.1	Neurodegenerative Krankheiten	1					
	1.2	Einordnung in den aktuellen wissenschaftlichen Kontext	1					
	1.3	Biomarker und Diagnose der Alzheimer-Krankheit	3					
	1.4	Die Bedeutung der A $\beta$ -Oligomere für die Entstehung und Fortschreitung						
		der Alzheimer-Krankheit	7					
	1.5	Die sFIDA-Technologie zum Nachweis einzelner Aβ-Oligomere	9					
	1.6	Amplifikations-basierte Diagnostik	11					
	1.7	Aggregationswege von amyloiden Proteinen	11					
	1.8	Zielsetzung	13					
2	Mat	erialien und Methoden	15					
	2.1	Verwendete Chemikalien, Puffer und Lösungen	15					
	2.2	Zusammensetzung der Puffer und Lösungen	17					
	2.3	sFIDA	17					
		2.3.1 Fluorochrom-Konjugation der Antikörper	18					
		2.3.2 Präparation der Detektionsantikörper und des Substrats	18					
		2.3.3 Messung und Technische Parameter	18					
		2.3.4 Analyse	18					
	2.4	$A\beta$ -Aliquotierung	21					
	2.5	ThT-Aggregationsassay	21					
	2.6	$\alpha - {\rm Synuclein\ Proteinsynthese\ und\ Reinigung\ } \ldots \ldots$	22					
	2.7	Fluorochrom-Konjugation der Y136C-α-Syn-Mutante	23					
	2.8	Herstellungsprotokoll der Seeds	23					
	2.9	Proteinfällung mit PTA	24					
	2.10	Rasterkraftmikroskopie	25					
	2.11	Dot-Blot	26					
	2.12	Oberflächenplasmonenresonanz	26					
3	Erge	bnisse	28					
	3.1	1 Amplifikation von Aβ-Seeds auf der Glasoberfläche						
	3.2	Spontane Aggregation des Substrats und erhöhter Hintergrund durch das						
		Fluorochrom-markierte Substrat	30					
		3.2.1 Minimierung von falsch-positiven Signalen durch die Einführung ei-						
		nes Blockierungspeptids	32					
		3.2.2 BSA als potenzieller Inhibitor der spontanen Aggregation	42					
		3.2.3 Minimierung von falsch-positiven Signalen durch die Verwendung						
		von Substrat, das nicht an die Fängerantikörper binden kann	45					
	3.3	Adaption der Amplifikation von immobilisierten α-Synuclein-Seeds im sFIDA	64					
		3.3.1 Konzeptnachweis der $\alpha$ -Syn-Amplifikation auf der Glasoberfläche .	64					

5	Anh	ang		98
	4.8	Ausbli	ck	96
		Probe	im sFIDA	95
	4.7	Erster	Nachweis der Amplifikation von $\alpha$ -Syn-Seeds aus einer biologischen	
		sischer	n Bedingungen	92
	4.6	Optim	ierungsschritte resultierten in der Amplifikation in Lösung unter ba-	
	4.5	Ampli	fikation von $\alpha$ -Synuclein auf der Oberfläche	91
	4.4	Indire	kter Nachweis der Amplifikation in Lösung durch das A $\beta_{11-42}$ -Substrat	89
		fehlen	de Amplifikation	87
	4.3	Steriso	ch eingeschränkte Zugänglichkeit der Seeds als mögliche Ursache für	
		starke	r Selbstaggregation und bei der Bildung von polyvalenten Aggregaten	83
	4.2	Strate	gien zur Verhinderung falsch-positiver Signale sind unzureichend bei	
		der Ol	perfläche	81
	4.1	Hohe	Seedkonzentration ermöglicht Amplifikation von A $\beta$ -Oligomeren auf	
4	Disk	cussion		81
			Maus	"
		3.3.3	Amplifikation von $\alpha$ -Syn-Seeds aus Hirnhomogenat einer transgenen	
		0.0.0	Amplifikation von $\alpha$ -Syn-Seeds	67
		3.3.2	Optimierung von Pufferbedingungen und Substratkonzentration zur	
		229	Optimierung von Pufferbedingungen und Substratkonzentration zur	

# Abkürzungsverzeichnis

$A\beta$	Amyloid $\beta$ -Peptid
AD	Alzheimer-Krankheit
AFM	Rasterkraftmikroskopie
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
APP	Amyloid-Precursor-Protein
α-Syn	α-Synuclein
BP	Blockierungspeptid
BSA	Bovines Serumalbumin
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
CAA	Zerebrale Amyloidangiopathie
CJD	Creutzfeldt–Jakob-Krankheit
CSF	Zerebrospinalflüssigkeit
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FCS	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie
HSA	Humanes Serumalbumin
ISF	Interstitielle Flüssigkeit
MRI	Magnetresonanztomographie
PD	Parkinson-Krankheit
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
РК	Proteinase K
PMCA	Protein Misfolding Cyclic Amplification
PrP	Prion-Protein
PTA	Natrium-Phosphorwolframat
$\mathbf{RT}$	Raumtemperatur
RT-QuIC	Real-Time Quaking Induced Conversion
sFIDA	surface-based fluorescence intensity distribution analysis
SIMOA	Single-Molecule Array
$\mathbf{SPR}$	Oberflächenplasmonenresonanz
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
$\mathbf{ThT}$	Thioflavin T
WB	Western-Blot
WT	Wildtyp

## Einheiten

Präfixe				
Symbol	Name	Potenz	Zahl	Wort
k	Kilo	$10^{3}$	1.000	Tausend
-	-	$10^{0}$	1	Eins
с	Zenti	$10^{-2}$	0,01	Hundertstel
m	Milli	$10^{-3}$	0,001	Tausendstel
μ	Mikro	$10^{-6}$	0,000.001	Millionstel
n	Nano	$10^{-9}$	0,000.000.001	Milliardstel
р	Piko	$10^{-12}$	0,000.000.000.001	Billionstel
f	Femto	$10^{-15}$	0,000.000.000.000.001	Billiardstel

### Tabelle 1: Präfixe und Basisgrößen

### Basisgrößen

Basisgröße	Symbol	Einheit	Einheitszeichen
Zeit	t	Sekunde	S
		Minute	min
		Stunde	h
Länge	l	Meter	m
Masse	m	Gramm	g
Volumen	V	Liter	1
Temperatur	T	Grad Celsius	°C
Stoffmenge	n	Mol	mol

### Stoffmengen-

### konzentration

Molar M = mol/l

### Sonstige Größen

Basisgröße	Symbol	Einheit
Erdbeschleunigung	g	$9,81\mathrm{m/s^2}$
Wellenlänge	λ	nm

# Abbildungsverzeichnis

1	Theoretisches Modell der Änderung der Biomarker-Konzentration und die Entwicklung klinischer Symptome mit dem Fortschreiten der Alzheimer-	
	Krankheit	4
2	Reispiele von klassischen und neuentwickelten Immunoassavs	т 6
3	Die Verbreitung von Aß-Ablagerungen in Gehirnen von Alzheimer-Patienten	8
4	Schematische Übersicht des sFIDA-Assavs	10
5	Aggregationswege mit unterschiedlichen Spezies von amvloiden Proteinen	12
6	Schematische Abbildung der Vergrößerung eines Oligomers durch Amplifi-	19
		19
7	Schematische Abbildung des Analyseprozess von der Messung bis zur Dar-	
	stellung der Ergebnisse	20
8	PTA-Protokoll modifiziert nach Henke [1]	25
9	Amplifikation von synthetischen A $\beta_{42}\text{-}\mathrm{Seeds}$ über die Zeit im sFIDA $\ .\ .\ .$	29
10	Spontane Aggregation des Substrats und erhöhtes Hintergrundrauschen durch	
	die Verwendung von markiertem Substrat	31
11	Strategie zur Verhinderung falsch-positiver Signale	33
12	Der Einfluss von A $\beta_{14}$ auf die spontane A $\beta_{42}\text{-}Aggregation}$ und Amplifikation	35
13	Der Effekt von A $\beta_{14}$ und A $\beta_{15}$ -Cysteamin auf die Blockierung der freien	
	Fängerantikörper im sFIDA zur Verhinderung der Bindung spontan ent-	
	standener Aggregate	36
14	Affinität des A $\beta_{14}$ -Peptids zu den Fängerantikörpern	38
15	Der Effekt von A $\beta_{14}$ und A $\beta_{15}$ auf die Fängerantikörper Nab228 und 6E10	
	bei Präinkubation oder permanenter Inkubation	39
16	Amplifikation im s FIDA unter Verwendung der Blockierungspeptide $A\beta_{14}$	
	und A $\beta_{15}$ für den 6E10-Fängerantikörper	41
17	Einfluss von BSA bei der Amplifikation	43
18	Einführung des N-terminal trunkierten $A\beta_{11\text{-}42}$ als potenzielles Substrat $\ .$ .	45
19	Kriterien des A $\beta_{11-42}$ -Substrats	47
20	Amplifikation von A $\beta_{42}$ -Seeds mittels A $\beta_{11-42}$ -Substrat im sFIDA	51
21	Untersuchung verschiedener Blockierlösung zur effektiven Oberflächenblockie-	
	rung gegen $A\beta_{11-42}$	53
22	Amplifikation auf der mit BSA- oder Milchpulver-blockierten sFIDA-Ober-	
	fläche	55
23	Amplifikation von A $\beta_{42}$ -Seeds in Lösung mittels A $\beta_{11-42}$ -Substrat und an-	
	schließendes sFIDA-Experiment	58
24	pH-Optimierung bei 37°C für die A $\beta_{42}$ -Amplifikation durch A $\beta_{11-42}$	61
25	Amplifikation von A $\beta_{42}\text{-}\mathrm{Seeds}$ mittels $A\beta_{11\text{-}42}\text{-}\mathrm{Substrat}$ bei pH 8 und 25°C $% \beta_{11}^{2}$ .	62

26	Ermittlung der Inkubationsdauer für die $\alpha$ -Syn-Amplifikation durch die Be-	
	obachtung des Aggregationsverlaufs mittels ThT und Visualisierung der	
	Amplifikation im sFIDA-Assay	66
27	Schematischer Aufbau des sFIDA-Experiments zur Optimierung des pH-	
	Werts und der Substratkonzentration	68
28	Optimierung der $\alpha\mbox{-}{\rm Syn-}{\rm Amplifikation}$ bei pH 8 und 10 $\mu\mbox{M}$ $\alpha\mbox{-}{\rm Syn-}{\rm Substrat}$ .	71
29	Optimierung der A $\beta$ -Amplifikation bei pH 7,5 oder 8 und 5 µM A $\beta$ -Substrat	72
30	Schematischer Aufbau des sFIDA-Experiments zur Optimierung des (Fluo-	
	rochrom-konjugierten) Substrats in Lösung	74
31	Optimierung der $\alpha$ -Syn-Amplifikation in Lösung mit 10 µM Substrat oder	
	$5 \mu\text{M}$ Substrat und $12,5 \text{mM}$ NaCl	75
32	Optimierung der A β-Amplifikation in Lösung mit unkonjugiertem oder 1%	
	Fluorochrom-konjugiertem Substrat	76
33	Amplifikation von $\alpha$ -Syn-Seeds aus TgM83 <sup>+/-</sup> -Hirnhomogenat	78
34	Vereinfachte Darstellung möglicher Gleichgewichtsszenarien von Monome-	
	ren und Aggregaten	82
35	Verdrängung der Blockierungspeptide durch polyvalente Bindungsmöglich-	
	keiten der Oligomere	84
36	Sterische und entropische Einschränkungen der gebundenen Seeds	89
37	Verdeckung der Epitope der A $\beta_{42}$ Seeds durch starke Amplifikation durch	
	das A $\beta_{11-42}$ -Substrats	90
38	Mögliche Identifizierung von on- und off-pathway-Oligomeren mithilfe der	
	sFIDA-Technologie	97
39	Amplifikation von A $\beta_{42}$ -Seeds mittels A $\beta_{11-42}$ -Substrat im sFIDA	107
40	pH-Optimierung bei 37°C für die A $\beta_{42}$ -Amplifikation durch A $\beta_{11\text{-}42}$ in An-	
	und Abwesenheit von 150 mM NaCl	108
41	Optimierung des pH-Wertes und der Temperatur für die Amplifikation von	
	$A\beta_{42}$ -Seeds durch $A\beta_{11-42}$ -Substrat in Lösung $\ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots$	109
42	Ko-Aggregation von monomerem A $\beta_{11-42}$ und A $\beta_{42}$	110
43	Spontane Aggregation von 5 $\mu M$ A $\beta_{42}$ bei pH 7-9	110
44	Vergleich zweier A $\beta_{42}$ -Konzentrationsreihen im Plattenlesegerät und sFIDA $\Xi$	111
45	Amplifikation von A β42-Seeds mit A β11-42-Substrat bei pH 8 und 25°C für	
	8h	112

\_\_\_\_\_

X

# Tabellenverzeichnis

1	Präfixe und Basisgrößen	VIII
2	Technische Definitionen für den sFIDA-Assay	XIII
3	Chemikalien, Puffer und Lösungen	15
4 5	getestete pH-Werte und Substratkonzentration	69 75
6	sFIDA-Protokolle	99

### Nomenklatur

Die folgenden Definitionen gelten für diese Arbeit und werden in der Literatur zum Teil anders definiert.

**Proteinaggregate** bestehen aus mehreren alternativ-gefalteten und  $\beta$ -Faltblatt-reichen Monomeren, die durch intermolekulare Wechselwirkungen zusammenhängen.

**Oligomere** sind Proteinaggregate, die aus wenigen aggregierten monomeren Einheiten bestehen. Ein Oligomer kann wieder zu Monomeren dissoziieren oder zu Fibrillen konvertieren.

**Amplifikation** beschreibt die Anlagerung von Substrat an einen Seed, wodurch die Oberfläche vergrößert wird. Hierbei wird die Art der Anlagerung nicht definiert und somit nicht zwischen der linearen Anlagerung an Fibrillenenden oder der nicht fibrillären Anlagerung an globulären Oligomeren unterschieden.

**On-pathway-Oligomere** werden als Oligomere definiert, die in ihrem Aggregationsweg durch Monomere wachsen können und nicht zu Monomeren dissoziieren.

*Off-pathway*-Oligomere können durch Monomere nicht mehr wachsen und dissoziieren gegebenenfalls wieder zu monomeren Einheiten.

**Substrat** bezeichnet monomeres Protein in nativer Konformation, das für die Amplifikation vorhandener Seeds verwendet wird.

Seeds sind Nukleationskeime aus aggregierten amyloiden Proteinen (Oligomere), die in Anwesenheit von Substrat amplifiziert werden können. Dadurch unterscheiden sie sich von Oligomeren, die nicht weiter zu Fibrillen konvertieren.

**Blockierungspeptide** sind Peptide, die durch sterische Blockierung eine spezifische Protein-Antikörper-Bindung verhindern.

## Definitionen

Signal	Fluoreszenz eines am Zielprotein gebundenen Antikörpers oder eines am Zielprotein angelagerten Fluorochrom-konjugieten Sub- strats.
Hintergrund	Unspezifisch erzeugtes Fluoreszenzsignal durch eine unspezifi- sche Bindung des Detektionsantikörpers (z.B. Interaktionen mit heterophilen Antikörpern), durch unspezifische Bindungen von Farbstoffen, Autofluoreszenz oder durch Kamerarauschen er- zeugtes Signal.
unspezifisch erzeugtes Signal	Signal eines an der Oberfläche unspezifisch gebundenen (ggfs. Fluorochrom-konjugierten) Substrats.
CutOff	Der CutOff beschreibt einen Schwellenwert einer Pixelintensität. Für die Analysen werden nur die Pixel gewertet, die sich über dem CutOff befinden. Der CutOff wird in der Regel anhand einer Kontrolle berechnet, wobei ein bestimmter Prozentsatz der Anzahl der hellsten Pixel toleriert wird und der entsprechende Intensitätswert des n-ten Pixels als CutOff festgelegt wird.
Signalsteigerung	Die Signalsteigerung wird durch die Amplifikation von Seeds und dem daraus resultierenden Gewinn des Signals im Vergleich zum Signal nicht-amplifizierter Seeds erzielt.

Tabelle 2: Technische Definitionen für den sFIDA-Assay

### 1 Einleitung

#### 1.1 Neurodegenerative Krankheiten

Neurodegenerative Krankheiten sind durch den fortschreitenden Verlust von Nervenzellen mit zellulären Dysfunktionen, Rückgang von Synapsen und letztlich Gehirnschäden gekennzeichnet [2]. Zu den neurodegenerativen Krankheiten gehören beispielsweise die Alzheimer-Krankheit (AD), Parkinson-Krankheit (PD), Prionerkrankungen wie die Creutzfeldt–Jakob-Krankheit (CJD), Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) und viele weitere [2, 3]. Diese Erkrankungen haben charakteristische Gemeinsamkeiten, wie zum Beispiel die Aggregation von Proteinen, die sich im Gehirn ablagern und sich weiter ausbreiten können [2, 4]. Es wurden außerdem eine gestörte zerebrale Durchblutung und eine beschädigte Bluthirnschranke im Zusammenhang mit dem Auftreten neurodegenerativer Erkrankungen beobachtet [5]. Eine unterschiedliche Einteilung in verschiedene Krankheiten ist aufgrund der meist spezifischen betroffenen Hirnareale möglich, die unterschiedliche Symptome und Krankheitsbilder auslösen. Dies wird unter anderem durch die Fehlfaltung und Aggregation spezifischer Proteine verursacht, die sich in charakteristischen Richtungen im Gehirn verbreiten [2, 4, 3]. Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson sind die [2] häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen. Für die Alzheimer-Krankheit ist die Aggregation von A $\beta$  und dem Tau-Protein ( $\tau$ ) typisch während für die Parkinson-Krankheit die Aggregation von  $\alpha$ -Syn das Hautmerkmal ist [2, 4, 3].

#### 1.2 Einordnung in den aktuellen wissenschaftlichen Kontext

Morbus Alzheimer – oder AD, aus dem Englischen: Alzheimer's Disease – ist die häufigste altersbedingte neurodegenerative Krankheit und für etwa 60-70 % aller Fälle von Demenzerkrankungen verantwortlich, unter denen heute über 55 Millionen Menschen leiden [6]. Bisher ist die Alzheimer-Krankheit nicht heilbar, obwohl weltweit Wissenschaftler versuchen, geeignete Medikamente zu entwickeln. In den vergangenen Jahren wurde vor allem der immunologische Ansatz verfolgt, wobei bedauerlicherweise vielversprechende Medikamente in Form von monoklonalen Antikörpern, wie zum Beispiel die von Biogen entwickelten Antikörper Aducanumab oder Crenezumab von AC Immune/Roche, in späten Studienphasen gescheitert sind. Obwohl Aducanumab im Sommer 2021 in den USA vorläufig zugelassen wurde, lehnte die Europäische Arzneimittel-Agentur (EMA) aufgrund umstrittener Wirksamkeit und teilweise schwerwiegender Nebenwirkungen die Zulassung für Europa ab.

Für eine gute Wirksamkeit von Medikamenten ist eine frühzeitige Behandlung entschei-

dend. Bei der Alzheimer-Krankheit beginnen die pathophysiologischen Veränderungen bereits viele Jahre vor den klinischen Symptomen und somit viele Jahre vor der Diagnose. Zu diesem Zeitpunkt sind die pathophysiologischen Veränderungen schon sehr weit fortgeschritten. Zu den typischen physiologischen Veränderungen gehören die Aggregation von A $\beta$ , das sich überwiegend in extrazellulären Plaques ansammelt und die Aggregation des Tau-Proteins ( $\tau$ ), das intrazellulär neurofibrilläre Bündel ausbildet [7, 3].

Seit einigen Jahren geraten Aβ-Oligomere als vermutlich hauptverantwortliche Spezies für Neurodegeneration und synaptische Toxizität immer mehr in den Fokus [8]. Im Gegensatz zu Fibrillen sind Oligomere klein und löslich, da sie aus nur wenigen aggregierten monomeren Einheiten bestehen. Dies hat zur Folge, dass Oligomere durch den Körper diffundieren können und sich dadurch schneller verbreiten können. Im Gegensatz zu den Fibrillen- und Plaqueansammlungen im Gehirn, korreliert die Quantität der Oligomere stark mit dem Beginn und mit dem Fortschreiten der Alzheimer-Krankheit [9].

Ein Oligomer kann durch die Faltung von intrinsisch ungeordneten A $\beta$ -Monomeren zu Strukturen mit erhöhtem  $\beta$ -Faltblatt-Anteil entstehen. Dabei können diese pathologisch gefalteten Oligomere prionartig die Faltung von weiteren Monomeren von nativ ungeordnet zu  $\beta$ -Faltblatt-reichen Strukturen bewirken [10]. Monomere neigen zur Selbstaggregation und somit zur Bildung von Oligomeren, die aus wenigen monomeren Einheiten bestehen. Oligomere befinden sich im chemischen Gleichgewicht mit Monomeren und Fibrillen. Ein Oligomer kann entweder in die monomeren Einheiten dissoziieren oder durch die Addition von weiteren Monomeren zu Fibrillen konvertieren [11].

Der Mechanismus der induzierten Umfaltung von Monomeren in nativer Konformation zu  $\beta$ -Faltblatt-reichen Strukturen sowie die weitere Anlagerung dieser Monomere an vorhandene Oligomere wurden in der Diagnostik für Prionenerkrankungen genutzt. Pathologisch gefaltetes PrP (im Folgenden: PrP<sup>Sc</sup>, historisch wegen Scrapiekrankheit *Sc* genannt), zum Beispiel aus infiziertem Hirngewebe, konnte somit durch die Zugabe von nativen nicht pathologischen PrP (PrP<sup>C</sup>, *C* für engl. *Cellular* = Zellulär) vervielfältigt werden. Dieser Mechanismus wird auch als *Amplifikation* bezeichnet [12, 13].

Für die Diagnose der Alzheimer-Krankheit wird eine Kombination aus kognitiven Tests, biochemischen CSF-Analysen und Positronen-Emissions-Tomographie (PET) Scan verwendet (weitere Informationen zu den aktuellen Diagnoseverfahren in Kapitel 1.3). Hierbei sind vor allem die letzten genannten Methoden sehr kostenintensiv und CSF-Analysen außerdem invasiv und belastend für den Patienten.

Ein nicht-invasiver und weniger kostenaufwändiger Bluttest könnte bei Patienten routinemäßig und idealerweise, bevor klinische Symptome entstehen, durchgeführt werden. Hierfür werden mit Hochdruck neue Biomarker gesucht. Aufgrund der sehr geringen Konzentration der im Blut vorkommenden Biomarkern sind sehr sensitive Methoden erforderlich.

#### 1.3 Biomarker und Diagnose der Alzheimer-Krankheit

Die Alzheimer-Diagnose erfolgt bis heute in den meisten Fällen erst nach Auftreten der ersten Symptome, wenn die Patienten zum Beispiel über Gedächtnisprobleme klagen. Das Alter gilt als größtes Risiko für die Alzheimer-Erkrankung [14, 15]. Zu diesem Zeitpunkt sind pathologische Veränderungen schon weit fortgeschritten. Diese treten bereits Jahre vor der Diagnose auf [16].

Ein entscheidender Grund ist eine nachlassende Aufrechterhaltung zellulärer Mechanismen, die für die Zellhomöostase und ein stabiles Proteom zuständig sind [17].

Ein theoretisches Modell von Jack et al. (s. modifizierte Abbildung 1) gibt an, dass die ersten pathologischen Veränderungen mit A $\beta$  einhergehen [18]. Hier wird eine niedrigere CSF-A $\beta_{42}$ -Konzentration im Zusammenhang mit einer späteren Alzheimer-Diagnose beobachtet [19]. Das A $\beta$ -Peptid ist ein Spaltprodukt eines Vorläuferproteins, dem sogenannten Amyloid-Precursor-Protein (APP), das durch Enzyme in mehreren Prozessen gespalten wird und dabei verschiedene A $\beta$ -Isoformen erzeugt [47]. Das A $\beta_{42}$ -Peptid besteht hierbei aus den Aminosäuren 1-42. Eine inverse Korrelation von niedrigeren CSF-A $\beta$ -Konzentrationen und vermehrter A $\beta$ -Ablagerungen im Gehirn wurde bei Patienten beobachtet. Dabei wirken die A $\beta_{42}$ -Ablagerungen im Gehirn sinnbildlich wie ein Sog, der lösliches A $\beta_{42}$  an sich zieht und eine geringere Konzentration in CSF verursacht [20].

Das beschriebene Modell stellt ein hypothetisches Modell dar, da nicht alle Patienten, die pathologische Auffälligkeiten zeigen, zwangsläufig die symptomatischen Stadien erreichen [18, 19].

Interessanterweise korreliert die Quantität dieser A $\beta$ -Ablagerungen in Form von Plaques nicht mit dem Krankheitsbild der Patienten [9]. Auch bei symptomfreien gesunden Patienten können Plaques zum Teil im Gehirn nachgewiesen werden. A $\beta$ -Plaques wurden bereits bei sehr jungen Personen im Alter von 40 Jahren nachgewiesen [21] und etwa 20 - 40 % der Patienten im Alter von über 70 Jahren haben Biomarker oder zeigen Auffälligkeiten einer AD-Pathologie nach einer Autopsie, obwohl sie nicht an kognitiven Beeinträchtigungen litten [22].

Zu den Haupt-CSF-Markern im späteren Stadium der Erkrankung gehören phosphoryliertes Tau-Protein (p- $\tau$ ), die gesamte Tau-Proteinkonzentration (t- $\tau$ ), die A $\beta_{42}$ -Konzentration und das Verhältnis von A $\beta_{42}$  zu A $\beta_{40}$ . Diese wurden in unzähligen Studien evaluiert und sind ab dem Prodromalstadium, wenn erste Symptome von leichten kognitiven Defiziten auftreten (= MCI, engl. für *Mild Cognitive Impairment*), diagnostisch sehr zuverlässig [23].



Abb. 1: Theoretisches Modell der Änderung der Biomarker-Konzentration und die Entwicklung klinischer Symptome mit dem Fortschreiten der Alzheimer-Krankheit

Jahre vor den ersten Symptomen, wenn die Patienten kognitiv unauffällig erscheinen, treten erste pathologische Veränderungen in der A $\beta$ -Konzentration auf, gefolgt von synaptischen und neuronalen Dysfunktionen, die mit zunehmenden Fortschreiten des klinischen Stadiums strukturelle Veränderungen des Gehirns bewirken. Veränderungen im präsymptomatischen Stadium können mittels CSF-Analysen, PET, FDG-PET<sup>1</sup> und fMRI<sup>2</sup> untersucht werden. Mit Eintreten des Prodromalstadiums können volumetrische MRI-Analysen hinzugezogen werden. Abbildung modifiziert nach [18, 19]

Ein System für die spezifische Alzheimer-Diagnose unter Einbeziehung der vorhandenen Biomarker bietet das Klassifizierungssystem nach Jack et al. [24]. Dies beinhaltet die Aβ-Ablagerungen (Plaques) (A), pathologisches  $\tau$ -Protein (T) und Neurodegeneration (N) und ergibt die ATN-Klassifizierung [24]. Die einzelnen Gruppen können nach aktuellem Stand entweder durch bildgebende Verfahren (MRI, PET) oder biochemische CSF-Analysen untersucht werden. Daher ist eine Alzheimer-Diagnose nach der ATN-Klassifizierung rein durch bildgebende Untersuchungen, CSF-Analysen oder einer Kombination aus beiden Methoden möglich. Aβ-Plaques sind direkt durch den Einsatz von Aβ-bindenden Liganden bei PET-Messungen oder durch eine verringerte Aβ<sub>42</sub>-Konzentration in CSF nachweisbar. Erhöhte phosphorylierte  $\tau$ -Konzentrationen und kortikales  $\tau$ -Protein weisen auf  $\tau$ -Aggregate hin und können durch CSF oder PET-Messungen mit spezifischen  $\tau$ -Liganden nachgewiesen werden. Neurodegeneration kann durch eine erhöhte gesamt- $\tau$ -Konzentration (t- $\tau$ ) in

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>PET-Methode unter Verwendung der radioaktiv-markierten <sup>18</sup>F-Fluordesoxyglucose (FDG)

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup>funktionelle Magnetresonanztomographie zur Darstellung der physiologische Funktion des Gehirns, basierend auf der Änderung des Blutsauerstoffgehalts

CSF, erhöhte Stoffwechselaktivität bei FDG-PET und Atrophie (durch MRI) bestimmt werden [24].

In den vergangenen Jahren wird der Fokus zunehmend auf die Detektion der Aβ-Oligomere gelegt. Hierzu werden klassische Methoden verwendet und neue Methoden entwickelt. Im Folgenden sind aus den unzähligen verschiedenen Methoden einige Beispiele aus der Klasse der Immunoassays aufgeführt (s. Abbildung 2).

Immonoassays beinhalten im Wesentlichen drei Schritte: das "Einfangen" eines Zielproteins durch einen Fängerantikörper, die Detektion durch einen oder zwei weitere Antikörper, die mit einem Fluorochrom oder einem Enzym gekoppelt sein können und den Ausgabewert (im Engl. *Readout*) als Resultat eines gemessenen Signals. Das Signal wird beispielsweise durch Anregung des an den Detektionsantikörper konjugierten Fluorochroms oder einer entsprechenden Enzymreaktion erzeugt [25].

Zu den klassischen Immunoassays gehören beispielsweise der *Enzyme-Linked Immunosor*bent Assay (ELISA) und der Western-Blot (WB).

Bei dem ELISA wird die Oligomerspezifität entweder durch die Verwendung von konformationsspezifischen Antikörper gewährleistet oder durch die Verwendung von konformationsunspezifischen Fänger- und Detektionsantikörper, die um dasselbe Epitop konkurrieren. In beiden Fällen können Monomere nicht detektiert werden [25].

Bei einem Western-Blot werden die Proteine zunächst aus einem Proteingemisch (aus einer biologischen Probe) elektrophoretisch nach Ladung und Größe getrennt. Damit die Oligomere in nativer Form bestehen bleiben, muss auf die Verwendung von Detergenzien und Reduktionsmittel, die eine Denaturierung verursachen würden, verzichtet werden. Nach der Trennung der Proteine erfolgt der Transfer erneut durch Elektrophorese auf eine Membran (s. Abbildung 2). Die Zielproteine können anschließend wie oben beschrieben mithilfe von Antikörpern detektiert werden. A $\beta$ -Oligomere konnten durch die Western-Blot-Methode bereits im Hirngewebe von Alzheimer-Patienten nachgewiesen werden [25].

Zu den neueren Methoden gehört die Single-Molecule Array (SIMOA)-Technologie, die einen Partikel-basierenden digitalen ELISA darstellt. Magnetische Partikel werden hierfür mit einem Fängerantikörper beschichtet und in einem sehr hohen Überschuss zur vermuteten Zielproteinkonzentration eingesetzt. Dadurch erhält ein Partikel entweder kein oder ein gebundenes Zielprotein. Diese werden einzeln in ein Array mit mehreren tausenden Plattenvertiefungen geladen und digital verlesen (s. Abbildung 2). Jede Vertiefung enthält dabei die Information positiv oder negativ wenn ein Zielprotein gebunden ist beziehungsweise nicht gebunden ist. SIMOA wurde bisher zur Detektion synthetischer A $\beta$ -Oligomere verwendet [25].

Die sFIDA-Technologie gehört ebenfalls zu den neueren Methoden, die A $\beta$ -Oligomere mit Einzelpartikelsensitivität nachweisen kann. Eine ausführliche Beschreibung ist im nachfolgenden Kapitel 1.5 gegeben.



Abb. 2: Beispiele von klassischen und neuentwickelten Immunoassays

ELISA unter der Verwendung eines konformations- oder epitopspezifischen Fängerantikörpers, der Oligomere bzw. Oligomere und Monomere bindet, die mit einem oder zwei weiteren Antikörpern detektiert werden. Das Signal wird in diesem Beispiel durch eine Meerrettichperoxidase-Enzymreaktion erzeugt, wodurch das fluoreszierende Produkt Tetramethylrhodamin gebildet wird. Beim Western-Blot wird ein Proteingemisch elektrophoretisch getrennt und auf eine Membran transferiert. Die auf der Membran lokalisierten Zielproteine werden anschließend zum Beispiel mit einem oligomerspezifischen Antikörper inkubiert und durch einen Meerrettichperoxidase-konjugierten sekundären Antikörper detektiert. Die SIMOA-Technologie basiert auf der Verwendung magnetischer Partikel, die mit einem Fängerantikörper versehen werden, der das Zielprotein aus einer Probe binden kann. Jeder Partikel trägt anschließend entweder kein oder ein Zielprotein, die nach Zugabe in einem Array mit tausenden Vertiefungen digital ausgelesen werden und die Informationen in Form von *negativ*, wenn kein Zielprotein gebunden ist bzw. *positiv*, wenn ein Zielprotein gebunden ist, abgespeichert werden. Bei der sFIDA-Technologie wird die Glasoberfläche einer Mikrotiterplatte mit einem epitopspezifischen Antikörper beschichtet und Zielproteine aus einer Probe gebunden. Durch die Verwendung von Fluorochromkonjugierten Antikörpern, die dasselbe Epitop binden, werden Monomere nicht detektiert. Das Signal wird mikroskopisch in Form von fluoreszierenden Partikeln abgebildet. Die Nutzung unterschiedlicher Fluorochrome und die Analyse der ko-lokalisierten Signale können die Sensitivität erhöhen. Abbildung modifiziert nach [25].

### 1.4 Die Bedeutung der Aβ-Oligomere für die Entstehung und Fortschreitung der Alzheimer-Krankheit

In der Therapieentwicklung für die Alzheimer-Krankheit richteten sich in den vergangenen Jahren die meisten Ansätze mit passiver Immunisierung gegen  $A\beta_{42}$ -Monomere oder unlösliche Fibrillen und Plaques. Diese Ansätze scheiterten aber bedauerlicherweise sehr spät in der klinischen Phase III [9].

Neue Forschungsergebnisse im Bereich der A $\beta$ -Plaques ergaben, dass Plaques gezielt von Mikrogliazellen, die zum Immunsystem des Gehirns gehören, in dichte Strukturen gepackt werden [26]. Die Autoren vermuten, dass dieser Mechanismus die Verbreitung von schädlicheren und diffusen "Pre-Plaque A $\beta$ -Oligomeren" reduziert und begründeten dadurch das Scheitern von Therapieansätzen, die sich gegen Plaques richteten [26].

Sowohl zukünftige Therapieansätze, als auch die Diagnostik sollten sich daher gegen Oligomere richten.

Die Verbreitung von pathologischen Proteinen erfolgt vermutlich direkt von Zelle zur Zelle, beispielsweise zwischen verbundenen Neuronen und benachbarten Gliazellen [4].

An dieser Stelle sind aggregierte Spezies kritisch, die ebenfalls als Seed dienen können und die Verbreitung der A $\beta$ -Aggregate potenziell beschleunigen. Seeds können entweder durch Fragmentierung [4] in der Anzahl multipliziert werden oder wie oben beschrieben, durch weitere Monomere vergrößert werden, die durch die Anlagerung an den Seed prionartig in die pathologische Konformation gezwungen werden.

Bei Alzheimer-Patienten können erste Aβ-Ablagerungen in der Großhirnrinde nachgewiesen werden, die sich durch den Hirnstamm bis zum Kleinhirn verbreiten können [4] (s. Abbildung 3).

Untersuchungen von Hirnproben des Neocortex von Alzheimer-Patienten zeigten erhöhte Aβ-Oligomerkonzentrationen in Exosomen [27]. In Zellkulturexperimenten konnten diese Exosomen über den Zell-Zell-Transfer übertragen werden. Die Blockierung der Bildung, der Sekretion oder der Aufnahme dieser Oligomer-enthaltenden Exosomen ging mit einer reduzierten Verbreitung der toxischen Oligomere einher [27].

Blutgefäße im Gehirn versorgen zum einen das Gehirn mit Sauerstoff und Glukose und sind zum anderen wichtig für die Drainage der Interstitielle Flüssigkeit (ISF) und gelöster Stoffe wie zum Beispiel A $\beta$  [28].

Die kleinsten Blutgefäße, die sogenannten Kapillaren, sind mit Zellen an der Außenwand umkleidet (Perizyten und Endothelzellen), die Teil der hochspezialisierten Bluthirnschranke sind. Die Bluthirnschranke kontrolliert die Aufnahme und Abgabe gelöster Stoffe und Ionen aus CSF und ISF. Endothelzellen verfügen über Rezeptoren, die den Proteinaustausch, darunter auch lösliches A $\beta$ , gezielt regulieren können. Störungen des Systems können pathologische Ereignisse wie zum Beispiel die lokale Ablagerung von A $\beta$  im Zusammenhang mit der Zerebrale Amyloidangiopathie (CAA) auslösen [28].

Die pathologische Wirkung von löslichen Oligomeren, die zusätzlich als Seeds für weitere Oligomere fungieren können, ist daher vermutlich stärker als die dicht-gepackten unlöslichen Plaques.



Abb. 3: Die Verbreitung von Aβ-Ablagerungen in Gehirnen von Alzheimer-Patienten

Die Verbreitung von A $\beta$ -Ablagerungen ist durch die Färbung der Hirnregionen von dunkel nach hell schematisch dargestellt. Im Neocortex (dunkel violetter Bereich) werden A $\beta$ -Ablagerungen zuerst beobachtet und anschließend im Allocortex (Teil der Großhirnrinde). Die weitere Verbreitung erfolgt im Diencephalon (Zwischenhirn mit Thalamus im Zentrum; orange eingekreist) und den Basalganglien (nicht eingezeichnet) bis hin zum Hirnstamm und ggfs. auch im Kleinhirn. Die Richtung wird als kaudal (hervorgehoben durch den grünen Pfeil) bezeichnet. Abbildung modifiziert nach [4].

Aβ-Oligomere wurden bereits in CSF nachgewiesen und sind möglicherweise auch in anderen Körperflüssigkeiten wie zum Beispiel Blut zu erwarten.

Es wurde beobachtet, dass A $\beta$ -Oligomere die Übertragung von Signalen an den Neuronen beeinflussen können. Die Inhibierung der Langzeitpotenzierung und gleichzeitige Verstärkung der Langzeitdepression führt zum Rückgang dendritischer Spines, die für die Synapsenbildung wichtig sind und wodurch der Zelltod eingeleitet wird. Oligomere aus 2-12 Einheiten gelten dabei als besonders neurotoxisch [25].

In der Literatur werden Oligomere zum Teil in *on-pathway*-Oligomere – Oligomere, die zu Fibrillen konvertieren können, oder in *off-pathway*-Oligomere – Oligomere, die nicht zu Fibrillen konvertieren, kategorisiert. Welche Art dieser Oligomeren für die Entstehung und Fortschreitung der Alzheimer-Krankheit relevanter ist, wurde noch nicht vollständig geklärt. Dear et al. sehen von einer strengen Einteilung in *on*- oder *off-pathway* ab, da sich ein Oligomer in einem *Reaktionsnetzwerk* mit vielen Möglichkeiten zur Fibrillenbildung befinde [29] (s. auch Kapitel 1.7).

Studien zu PrP-Oligomeren zeigten eine besonders toxische Wirkung von *off-pathway*-Oligomeren, da sie die Membranpermeabilität mit einem bestimmten Mechanismus stören können und sie durchlässig werden lassen [30].

In dieser Arbeit werden *On-pathway*-Oligomere als Oligomere definiert, die durch die Anlagerung von Monomeren wachsen können und nicht zu Monomeren dissoziieren. *Offpathway*-Oligomere können hingegen wieder zu monomeren Einheiten dissoziieren und wachsen nicht weiter zu größeren Aggregaten.

#### 1.5 Die sFIDA-Technologie zum Nachweis einzelner Aβ-Oligomere

Krankheiten, die dadurch entstehen, dass nativ gefaltete Proteine mit einer normalen physiologischen Funktion plötzlich eine krankhafte Faltung einnehmen und Aggregate bilden, erfordern Methoden, die die Aggregatbildung nachweisen können.

Die sFIDA-Technologie wurde für den quantitativen Nachweis von PrP<sup>Sc</sup>-Aggregaten entwickelt. Die ursprüngliche Diagnostik, die auf der Resistenz einer Protease – Proteinase K (PK) beruhte, war nicht immer zuverlässig und zeitaufwändig. Zum Teil wurden auch krankhafte aber nicht PK-resistente PrP<sup>Sc</sup>-Aggregate gefunden [31].

So wurden zunächst PrP-Aggregate in Lösung mittels Dual-Colour-Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) untersucht, bei der Proteinaggregate mithilfe von farblich unterschiedlichen Fluorochrom-konjugierten Antikörpern detektiert werden. Nur Aggregate, die aus mindestens zwei Monomeren bestehen, können potenziell durch zwei unterschiedlich-konjugierte Antikörper gebunden werden. Ko-lokalisierte Signale werden daher als Aggregat interpretiert [31].

Da größere Aggregate sehr langsam diffundieren und somit eine lange Messzeit benötigen, wurden die Aggregate im sFIDA an einer Glasoberfläche durch einen Fängerantikörper immobilisiert. Die Oberfläche konnte anschließend mikroskopisch gescannt werden und einzelne Partikel gezählt werden.

Die Verwendung von Fängerantikörpern und Detektionsantikörpern, die dasselbe oder ein überlappendes Epitop binden, gewährleistet den selektiven Nachweis von Oligomeren, wohingegen Monomere aufgrund des bereits besetzten Epitops durch den Fängerantikörper nicht mehr durch einen Detektionsantikörper gebunden werden können [32] (Abbildung 4). Dadurch lässt sich die sFIDA-Technologie prinzipiell für alle Krankheiten anpassen, die mit der Aggregation von Proteinen einhergehen wie zum Beispiel die Alzheimer-Krankheit, Parkinson-Krankheit oder Diabetes Mellitus Typ 2.

Durch die Einzelpartikel-Sensitivität konnte ein Detektionslimit im unteren femtomolaren Konzentrationsbereich für Aβ-Oligomere in CSF erzielt werden [33].

Für den Nachweis von A $\beta$  im Blut sind ultrasensitive Methoden erforderlich, da die physiologische Gesamt-A $\beta$ -Konzentration im pikomolaren Bereich [34] und die zu erwartende Oligomer-Konzentration dementsprechend viel geringer ist.

Dies sFIDA-Methode ermöglichte bisher eine zuverlässige Identifizierung von PrP<sup>Sc</sup>infizierten Hamstern und Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE)-infizierten Rindern [31].

Für den Nachweis von PrP<sup>Sc</sup>-Partikeln in Scrapie-infizierten Schafen konnten nach Anwendung eines Reinigungsprotokolls der Probe bereits erste Erfolge in Plasmaproben erzielt werden [35].

Heute wird sFIDA für die Identifizierung von Alzheimer-Patienten anhand von CSF-Proben verwendet [36] und erst kürzlich konnten auch CSF-Proben von Patienten, die unter der Parkinson-Krankheit leiden, von gesunden Kontrollproben mittels sFIDA unterschieden werden [37].



Abb. 4: Schematische Übersicht des sFIDA-Assays

(A) Im sFIDA-Assay wird ein Fängerantikörper auf einer Glasoberfläche immobilisiert, der Oligomere aus einer biologischen Probe selektiert. Die Detektion erfolgt durch einen oder zwei unterschiedlich Fluorochrom-markierte Antikörper, die an identische oder überlappende, aber innerhalb des Proteinaggregats getrennt positionierte Epitope binden. Ein Laser scannt die Oberfläche und regt dabei die an Oligomer gebundenen Detektionsantikörper an. Die unterschiedlich markierten Detektionsantikörper können einzeln oder mit erhöhter Sensitivität als ko-lokalisiertes Signal aufgezeichnet werden (basierend auf [31]).
#### 1.6 Amplifikations-basierte Diagnostik

Amplifikations-basierte Assays wurden in der Diagnostik für Prion-Krankheiten entwickelt [38]. Pathologisch gefaltetes  $PrP^{Sc}$  kann eine Umfaltung von physiologischen  $PrP^{C}$  induzieren, wodurch strukturell eine Konversion von überwiegendem  $\alpha$ -helikalem Anteil zu  $\beta$ -Faltblattstrukturen erfolgt [39]. Da krankhaftes  $PrP^{Sc}$  aus Patientenproben (= Seeds) durch Zugabe von synthetischem PrP (= Substrat) vervielfältigt werden kann, wurde diese Eigenschaft für diagnostische Zwecke mit hoher Sensitivität genutzt.

Zwei Methoden mit demselben Ziel, die Seeds zu vervielfältigen, sind hierbei entwickelt worden: Die Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA)-Methode, die auf Sonifzierung basiert und die Real-Time Quaking Induced Conversion (RT-QuIC)-Methode, die auf Schütteln basiert, um die Anzahl der einzelnen Seeds durch mechanische Einwirkung zu erhöhen und dadurch zu vervielfältigen [38]. Das Prinzip der induzierten Umfaltung in eine krankhafte Proteinkonformation ist auch bei anderen amyloiden Proteinen zu beobachten. Während die Amplifikations-basierte Diagnostik heute nur bei Prionerkrankungen routinemäßig eingesetzt wird, sind bei Synucleinopathien bereits zahlreiche erste Erfolge in der Diagnostik von  $\alpha$ -Syn-assoziierten Krankheiten berichtet worden [38]. Für  $\beta$ -Amyloid-Erkrankungen hingegen wurden bisher nur wenige Studien publiziert, die auf Amplifikation basieren [40, 38, 41, 42].

Eine andere hochsensitive Methode ist die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS), mit der Pitschke et al. bereits erfolgreich A $\beta$ -Oligomere aus humanen CSF-Proben durch Fluorochrom-konjugiertes A $\beta$  amplifizieren und dadurch von gesunden Kontrollen unterscheiden konnten [40]).

Erste Ergebnisse zur Amplifikations-basierten Diagnostik mit Plasmaproben von Alzheimer-erkrankten Personen konnten 2017 von An et al. mit einem ELISA-ähnlichen Verfahren gezeigt werden [42].

#### 1.7 Aggregationswege von amyloiden Proteinen

Proteine falten sich in der Regel in ihre biologisch aktive Konformation, die auch als native Struktur bezeichnet wird. Diese ist aufgrund der thermodynamischen Stabilität in den meisten Fällen gleichzeitig die bevorzugte Struktur [43]. Während des Faltungsprozesses nimmt das Protein zahlreiche Konformationen ein, die aus gefalteten und unstrukturierten Anteilen bestehen können. Unter gewissen Umständen bilden sich dabei metastabile Konformationen, die eine Aggregation des Proteins fördern können [44, 45]. Einige Proteine sind auch in nativer Konformation nicht vollständig gefaltet und besitzen unstrukturierte Regionen oder sind gänzlich unstrukturiert. Diese Proteine werden auch als *intrinsisch ungeordnet* bezeichnet. Dazu gehören beispielsweise die Proteine A $\beta$ ,  $\alpha$ -Syn, das  $\tau$ -Protein und PrP. Proteine, die nur teilweise intrinsisch ungeordnete Bereiche besitzen, zeigen insgesamt ein höheres Potenzial zur Amyloidbildung [46, 45]. Unter den genannten Beispielen gehören Aβ [47] und PrP [48] zu den Proteinen mit teilweise intrinsisch ungeordneten Bereichen. Die Proteinaggregation ist charakteristisch für viele Krankheiten, einschließlich der neurodegenerativen Krankheiten wie der Alzheimer-Krankheit und der Parkinson-Krankheit [45]. Durch die Aggregation können unterschiedliche Spezies mit unterschiedlich schädlichem Potenzial gebildet werden, wie im vorherigen Kapitel 1.4 erläutert wurde. Die verschiedenen möglichen Aggregationswege sind in folgender Abbildung 5 dargestellt. Die Aggregationspezies können von strukturierten Aggregaten, wie den Fibrillen und Protofibrillen über teilweise strukturierte Oligomeren von globulären bis ringförmigen Oligomeren, verschiedene polymorphe Strukturen in unterschiedlichen Größen annehmen [49]. In vivo können sich Aggregate in Form von Einschlusskörperchen oder Plaques ansammeln.



Abb. 5: Aggregationswege mit unterschiedlichen Spezies von amyloiden Proteinen

Native Monomere können sich unter bestimmten Umständen fehlfalten und in Anwesenheit weiterer Monomere Dimere und Oligomere bilden. Eine heterogene Vielfalt herrscht insbesondere bei den Oligomeren: z.B. ringförmige oder globuläre Oligomere mit unterschiedlichen Anteilen an unstrukturierten und strukturierten  $\beta$ -Faltblatt Anteilen [49]. Alternativ bilden sich Fibrillen und Protofibrillen. Eine Ansammlung der verschiedenen Aggregate innerhalb und außerhalb der Zellen erfolgt beispielsweise in sogenannte Einschlusskörperchen oder Plaques. Abbildung modifiziert nach [49].

#### 1.8 Zielsetzung

Die klinische Diagnose der Alzheimer-Krankheit basiert aktuell immer noch hauptsächlich auf biochemischen Analysen von Zerebrospinalflüssigkeit (CSF) und Positronen-Emissions-Tomographie (PET), die für den Patienten als belastend empfunden werden. Zudem wird die Krankheit im Regelfall erst nach Auftreten erster Symptome diagnostiziert, wenn pathophysiologische Veränderungen bereits vor mehreren Jahren eingetreten sind [16]. Das Amyloid  $\beta$ -Peptid (A $\beta$ ) steht eng im Zusammenhang mit der Entstehung der Alzheimer-Krankheit. Vermutlich betreffen erste krankheitsrelevante Ereignisse die Veränderung der CSF-A $\beta$ -Konzentration und insbesondere Aggregation [18, 19]. Neue diagnostische Ansätze zielen heute auf die Detektion kleiner und löslicher Aggregate, den sogenannten Oligomeren. Sie sollen hauptsächlich für die Neurodegeneration verantwortlich sein, indem sie die Signalübertragung an Neuronen verändern [25]. In vielen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen erhöhten A $\beta$ -Oligomerkonzentrationen in CSF und der Alzheimer-Krankheit festgestellt, jedoch gibt es große Überschneidungen der Ergebnisse mit der Kontrollgruppe [50]. Ultrasensitive Methoden sind hierfür erforderlich, um die sehr geringen Konzentrationen nachzuweisen.

In der vorliegenden Arbeit soll mithilfe der Amplifikation von Oligomeren durch Zugabe von monomerem Substrat eine höhere Sensitivität für den Nachweis erreicht werden. Die Anlagerung des Substrats an die Oligomere führt zu einer Vergrößerung der Oberfläche (s. Abbildung 6) und somit auch zu mehr Epitopen, die für die Immunodetektion erforderlich sind. Die Oligomere, die durch das Substrat amplifiziert werden können, werden auch als *Seeds* bezeichnet. In dieser Arbeit sollen die amplifizierten Seeds mit der sFIDA-Methode nachgewiesen werden. Dazu sollen sie vorab an einen Fängerantikörper gebunden werden und anschließend amplifiziert werden oder als weitere Option sollen die Seeds vorab in Lösung amplifiziert werden und danach an den Fängerantikörper gebunden werden.



Abb. 6: Schematische Abbildung der Vergrößerung eines Oligomers durch Amplifikation

Das zugegebene Substrat, das aus monomerem A $\beta$  besteht, lagert sich an Oligomere an. Diese werden dadurch amplifiziert. Die Oberfläche des amplifizierten Oligomers wird dadurch vergrößert und bietet mehr Epitope für eine anschließende Immunodetektion. Alternativ wird Fluorochrom-konjugiertes Substrat verwendet, wodurch eine vergrößerte Oberfläche direkt detektiert werden kann.

Zusammenfassend soll der Prozess der Amplifikation mit der ultrasensitiven sFIDA-

Technologie kombiniert werden. Diese Arbeit dient der Etablierung des Amplifikationsschritts für den sFIDA-Assay und zielt auf eine zukünftige Anwendung für natürlich vorkommende Seeds in Körperflüssigkeiten wie CSF- und insbesondere Blutproben. Die Etablierung soll zunächst mit synthetischem Aβ erfolgen.

Im ersten Schritt soll überprüft werden, ob A $\beta$ -Oligomere auf der Oberfläche prinzipiell amplifiziert werden können. Dazu soll Fluorochrom-markiertes A $\beta_{42}$  sowohl für die Seeds als auch für das Substrat verwendet werden. Dabei soll durch die Verwendung von unterschiedlichen Fluorochromen überprüft werden, ob das Substrat mit den Seeds kolokalisiert.

Fluorochrom-markierte A $\beta$ -Monomere können potenziell an die Fängerantikörper binden, wodurch erhöhtes Hintergrundrauschen zu erwarten ist. Außerdem neigt das A $\beta$ -Peptid zu einer starken Selbstaggregation, die auch als *spontane Aggregation* bezeichnet wird. Diese spontan entstandenen Aggregate können ebenfalls potenziell an die Fängerantikörper binden und falsch-positives Signal erzeugen. Daher soll in dieser Arbeit zusätzlich eine geeignete Strategie entwickelt werden, die zum einen die Bindung von Fluorochromkonjugiertem Substrat und zum anderen die Bindung von spontan entstandenen Aggregaten verhindert. Zur Unterstützung sollen geeignete Pufferbedingungen gefunden werden, die die spontane Aggregation inhibieren. Proteine, die A $\beta$  binden, können dabei als Regulator der gezielten Amplifikation eingesetzt werden.

Da sich die kontrollierte Amplifikation von  $A\beta$  als nicht reproduzierbar erwies und nicht alle Ziele erreicht werden konnten, wurde die Zielsetzung im Verlauf der Arbeit angepasst. Anhand eines weiteren amyloiden Proteins, dem  $\alpha$ -Synuclein ( $\alpha$ -Syn), sollte in dieser Arbeit die Amplifikation von  $\alpha$ -Syn-Seeds im sFIDA nachgewiesen werden. Dazu sollten zunächst synthetisch hergestellte Seeds und anschließend Seeds aus einer biologischen Probe verwendet werden.

# 2 Materialien und Methoden

## 2.1 Verwendete Chemikalien, Puffer und Lösungen

Chemikalie	Firma
2YT Medium Pulver	AppliChem GmbH
211 Alpha-Synuclein-Antikörper	Santa Cruz
4D6 anti-Alpha-Synuclein Purified (Azid-frei)	Biolegend
Agar	AppliChem GmbH
Ammoniumsulfat	VWR International GmbH
Ampicillin Natriumsalz	AppliChem GmbH
Amyloid $\beta$ -Protein (1-14)	Bachem
Amyloid $\beta$ -Protein (1-42)	Bachem
Aptes $((3-Aminopropyl)triethoxysilane))$	Sigma-Aldrich
Beta-Amyloid (11-42)	Bachem
Beta-Amyloid (11-42), HiLyte Fluor 488 markiert	Anaspec
Beta-Amyloid (1-42), HiLyte Fluor 488 markiert	Anaspec
Beta-Amyloid (1-42), HiLyte Fluor 647 markiert	Anaspec
BSA	AppliChem GmbH
Dinatriumphosphat	Carl Roth GmbH + Co. KG
EDC (1-(3-Dimethylaminopropyl)-3 -Ethylcarbodiimid-Hydrochlorid)	Sigma-Aldrich
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma-Aldrich
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG
Fluoreszenzfarbstoff CF488A	Sigma-Aldrich
Fluoreszenzfarbstoff CF633	Sigma-Aldrich
Glukose	Caesar & Loretz GmbH
Glycerol	Thermo Fisher Scientific
HCl (Chlorwasserstoff)	AppliChem GmbH
HFIP $(1,1,1,3,3,3$ -Hexafluor-2-propanol)	Sigma-Aldrich
Hilyte Fluor 488 $C_2$ Maleimid	Anaspec
Hilyte Fluor 647 $C_2$ Maleimid	Anaspec
Laktose	Carl Roth GmbH + Co. KG
LB Medium	PanReac AppliChem ITW Reagents

Tabelle 3: Chemikalien, Puffer und Lösungen

Chemikalie	Firma
Magnesiumsulfat	Thermo Fisher Scientific
Nab228 monoklonaler anti-β-Amyloid Antikörper	Sigma-Aldrich
NaCl (Natriumchlorid)	Thermo Fisher Scientific
Natriumazid	Sigma-Aldrich
Natriumdihydrogenphosphat	AppliChem GmbH
NHS (N-Hydroxysuccinimide)	Sigma-Aldrich
Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS $10\times)$	Sigma-Aldrich
Polyacrylamid-Matrix (Bio-Gel P-30 Gel)	Bio-Rad Laboratories
ProClin 300	Sigma-Aldrich
PTA (Natrium-Phosphorwolframat)	Sigma-Aldrich
Sarkosyl (N-Lauroylsarcosin Natrium-Salz-Lösung)	Sigma-Aldrich
SDS (Natriumdodecylsulfat)	SERVA Elektrophoresis GmbH
SmartBlock	Candor
Streptomycin	Sigma-Aldrich
TBS (Tris gepufferte Kochsalzlösung) $(10\times)$	SERVA Elektrophoresis GmbH
TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride)	Sigma-Aldrich
ThT (Thioflavin T UltraPure Grade)	Eurogentec Ltd
Toluol	Sigma-Aldrich
Tris	VWR International GmbH
Tween 20	AppliChem GmbH

\_

#### 2.2 Zusammensetzung der Puffer und Lösungen

Die Puffer und Lösungen dieser Arbeit wurden mit Milli-Q Wasser (erzeugt durch die Millipore-Anlage; Wasserwiderstand: 18,2 M $\omega \cdot$  cm) hergestellt und verdünnt. Die gewünschten pH-Werte und Puffekonzentrationen wurden mittels BioMol.Net Puffer-Kalkulator berechnet, der auf der Henderson-Hasselbalch-Gleichung basiert:

$$pH = pK_{a} + \log_{10}(\frac{[A^{-}]}{[HA]})$$
(1)

 $pK_a = S$ äurekonstante,  $A^- = K$ onzentration der basischen Komponente and HA = Konzentration der sauren Komponente.

Puffer, die im Methoden- oder Ergebnisteil nicht genau definiert sind, werden in der unten stehende Tabelle aufgeführt:

Puffer	Zusammensetzung
Tris Puffer	$40$ oder $50\mathrm{mM}$ Tris Base, p H-Einstellung mit HCl
TBST (Waschpuffer)	TBS $+$ 0,01 % Tween
TBS-Proclin	TBS + $0.03\%$ Prolin
EDC/NHS-Lösung	$200 \mathrm{mM} \mathrm{EDC} + 50 \mathrm{mM} \mathrm{NHS}$
LB-Medium	$5{\rm g/l}$ NaCl , $10{\rm g/l}$ Trypton, $5{\rm g/l}$ Hefe extrakt

#### 2.3 sFIDA

Der sFIDA-Assay wurde in einer 384-Mikrotiterplatte (Nunc MicroWell 384-Well plates, Thermo Fisher Scientific oder Sensorplate plus 384 Well, Greiner Bio-One International) durchgeführt. Die Arbeiten wurden unter einer Sicherheitswerkbank (HeraSafe 2020, Thermo Fisher) getätigt. Alle verwendeten Puffer und Lösungen wurden steril verwendet, indem sie vor Gebrauch dampfsterilisiert (VX-150 Autoklav, Systec) oder mit einem Sterilfilter (ROTILABO PVDF) filtriert wurden. Die Waschschritte erfolgten automatisiert in einem Mikroplatten-Waschgerät (Plate Washer 405TS, Biotek), der in der Sterilbank installiert wurde. Das Protokoll für die Versuchsdurchführung erfolgte anlehnend an die Standardarbeitsanweisung (SOP) zur Präparation des manuellen sFIDA-Assays (ICS-6 (D) SOP 8.2-001, Revision 15). Aufgrund der dynamischen Optimierungsarbeiten sind alle sFIDA-Protokolle für die entsprechenden Experimente in Kapitel 5 sFIDA Protokolle detailliert aufgeführt. Der Grundaufbau des sFIDA-Assays besteht aus der Immobilisierung von Fängerantikörpern auf der Glasoberfläche bei 4°C über Nacht. Alle weiteren Präparationsschritte erfolgen bei Raumtemperatur. Nach einem Waschschritt werden freie (Glas-) Oberflächen mit einer Blockierlösung geblockt und erneut gewaschen. Die Probeninkubation erfolgt für 1-2 Stunden. Nach einem erneuten Waschschritt werden die Detektionssonden an die Zielproteine für eine Stunde gebunden. Nach einem letzten Waschschritt erfolgt dann ein Pufferwechsel mit dem Biozid Proclin, um Kontaminationen zu vermeiden. Die Platte wird mit Folie (Seal Plate film, Sigma-Aldrich) versiegelt und vermessen. In dieser Arbeit wurden alle sFIDA-Experimente am Fluoreszenzmikroskop (Celldiscoverer 7, Zeiss Jena AG) vermessen.

#### 2.3.1 Fluorochrom-Konjugation der Antikörper

Zur Herstellung der Detektionsantikörper wurden die Antikörper nach Standardarbeitsanweisung (SOP) zur Durchführung der Fluoreszenzmarkierung von Antikörpern (ICS-6 (D) SOP \_ 8.2-013) mit den Fluorochromen CF633 oder CF488A konjugiert. Die Farbstoffe besitzen Succinimidyl-Ester, die unter basischen Bedingungen mit den primären Aminen der Antikörper reagiert. Daher erfolgte die Reaktion in einer 1 M Carbonatlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur und 600 rpm Schütteln. Für die Trennung der Fluorochrom-konjugierten Antikörper von den überschüssigen Farbstoffen wurde der Antikörper anschließend in einer Polyacrylamid-Matrix nach SOP gereinigt. Die Konzentration wurde anschließend photometrisch (UV/Vis Spektralphotometer V-650, Jasco) nach SOP bestimmt.

#### 2.3.2 Präparation der Detektionsantikörper und des Substrats

Um die Detektionsantikörper- oder Substratlösungen von Aggregaten zu trennen, wurden die präparierten Lösungen für 1 h in einer Ultrazentrifuge (Optima Max XP, Beckman Coulter) mit einem Festwinkelrotor (TLA 100.3, Beckman Coulter) für eine Stunde bei  $100.000 \times \text{g}$  bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend vorsichtig in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

#### 2.3.3 Messung und Technische Parameter

Die 384-Mikrotiterplatte wurden im Celldiscoverer 7 (Zeiss Jena AG) mit einer Evolve Kamera (Thermo Fisher) gemessen. Die Belichtungszeit variierte zwischen den Experimenten und sind in den jeweiligen Protokollen angegeben (s. Protokolle 5). Es wurden zwei Kanäle mit den Wellenlängen  $\lambda_{Ex} = 653$  nm und  $\lambda_{Em} = 668$  nm für den "roten Kanal" und  $\lambda_{Ex} = 493$  nm und  $\lambda_{Em} = 517$  nm für den "grünen Kanal" gemessen. Die Emissionswellenlängen passierten entsprechend einen 670-710 nm oder einen 504-554 nm Filter. Das Objektiv Plan-Apochromat 50x/1.2 oder Plan-Apochromat 20x/0.7 wurde für eine 50-fache Vergrößerung verwendet. Alternativ konnte durch eine zusätzliche Linse die doppelte Vergrößerung erreicht werden.

#### 2.3.4 Analyse

Die Proben werden standardmäßig in je vier Replikaten in 384er Mikrotiterplatten vermessen. Dazu wird die Mikrotiterplatte mit einer Folie abgedichtet und im Mikroskop (*Celldiscoverer 7*, Zeiss Jena AG) automatisch vermessen. Dabei wird pro Plattenvertiefung eine Matrix von üblicherweise  $5 \times 5$  Bildern aufgenommen, sodass bei vier Replikaten insgesamt 100 Bilder für die Analyse zur Verfügung stehen (7A). Die Bilder werden von der sFIDAta-Software<sup>3</sup> analysiert und es erfolgt zunächst eine automatische Artefaktdetektion, wodurch unscharfe Bilder, Bilder mit partikelartigen Verunreinigungen oder 250 % von der durchschnittlichen Helligkeit aller Aufnahmen abweichende Bilder aussortiert werden. Die Artefaktdetektion erfolgt vollkommen automatisch, frei von subjektivem Einfluss des Benutzers.

Die durchschnittliche Pixelintensitäten aller Pixel werden zunächst aus allen Bildern innerhalb einer Plattenvertiefung berechnet und anschließend werden die Werte der vier Replikate (4 Plattenvertiefungen) erneut gemittelt. Die daraus resultierende durchschnittliche Pixelintensitätsverteilung wird dann in einem Histogramm betrachtet (7B). Die Bilder enthalten  $512 \times 512$  Pixel (= 262.144 Pixel) und können insgesamt 65.536 unterschiedliche Graustufenwerte einnehmen. Die Pixelanzahl auf der Y-Achse wird gegen die entsprechende Pixelintensität (I) auf der X-Achse aufgetragen. Um die Pixelanzahl zu ermitteln, die eine Intensität größer oder gleich einer zugeordneten Intensität auf der X-Achse aufweisen, werden alle Pixel integriert, die mindestens den entsprechenden Intensitätswert erreichen. Das Ergebnis ist in Abbildung 7C dargestellt. In den Histogrammen ist zu erkennen, dass die Kontrolle (K) im Vergleich zu der Probe einer erkrankten Person (E) überwiegend dunklere Pixelintensitäten aufweist. Dennoch sind in der Kontrolle ebenfalls unterschiedliche Pixelintensitäten zu erkennen, die als *Hintergrund* definiert werden (s. Definition). Anhand des Hintergrunds wird ein Schwellenwert, der sogenannte CutOff, definiert (s. Definition). Dabei werden von insgesamt 262.144 Pixeln 0.1% der hellsten Pixel (= 262 Pixel) toleriert und der Intensitätswert bzw. Schwellenwert, bei dem 0.1% der Pixel verbleiben, wird als CutOff festgelegt (7D). Sobald der CutOff bestimmt wurde, werden die Pixel entsprechend des zugehörigen Intensitätswerts ausschließlich in unterhalb des CutOffs oder oberhalb des CutOffs eingeteilt (7E). Die Pixelanzahl oberhalb des CutOffs wird in einem Balkendiagramm mit Standardabweichung aus vier Replikaten dargestellt (7F).

 $<sup>^{3}\</sup>mathrm{Die}\ sFIDAta\text{-}\mathrm{Software}$ wurde für den internen Gebrauch entwickelt



Abb. 7: Schematische Abbildung des Analyseprozess von der Messung bis zur Darstellung der Ergebnisse

(A) Bildaufnahmen von mehreren Bildern in einer Matrix (z.B.  $5 \times 5$  Bilder; hier nur ein Bild dargestellt) pro Plattenvertiefung und insgesamt 4 Replikate (4 Vertiefungen) für jede Probe. Die Farbtiefe beträgt 16 Bit, sodass jeder Pixel 65.536 unterschiedliche Graustufenwerte (inklusive 0) einnehmen kann. Die Bildauflösung beträgt  $512 \times 512$  Pixel (= 262.144 Pixel; in der Abbildung stark vereinfacht dargestellt). In den Bildern der Kontrolle (K) sind wenige helle Pixel zu erkennen (=Hintergrundrauschen) wohingegen in den Bildern der Probe einer Erkrankten Person (E) die Anzahl heller Pixel um ein Vielfaches größer ist. (B) Der Mittelwert aus vier Replikaten der durchschnittlichen Pixelintensitätsverteilung pro Bild ist in einem Histogramm dargestellt. Die Pixelanzahl auf der Y-Achse ist gegen die Pixelintensität (I) auf der X-Achse aufgetragen. In dem Histogramm von E ist die größere Anzahl der Pixel mit höheren Intensitätswerten, im Vergleich zu K, zu erkennen. (C) Die Pixelanzahl zu jedem Intensitätswert  $\geq$  I (Y-Achse) wird integriert und gegen die Pixelintensität aufgetragen (X-Achse). (D) Der CutOff wird anhand einer Anzahl von 0.1% der hellsten Pixel der Kontrolle von insgesamt 262.144 Pixeln bestimmt und beträgt I = 2.784. (E) Bei diesem Intensitätswert werden alle Pixel über dem CutOff weiß dargestellt und alle Pixel unterhalb des CutOffs in schwarz dargestellt. (F) Die Darstellung der Pixelanzahl über dem CutOff für jede Bedingung erfolgt im Balkendiagramm mit Standardabweichung aus vier Replikaten.

#### 2.4 Aβ-Aliquotierung

1 mg Lyophilisiertes A $\beta_{42}$  (Bachem) wurde in 1.100 μl HFIP gelöst und 10 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit einer Mikroliterspritze (Hamilton) in 50 textmu g Aliquots (jeweils 50 μl Volumen) in 1,5 ml überführt. Aufgrund des hohen Dampfdrucks ist mit einem Volumenverlust während der Präparation zu rechnen. Die Aliquots wurden mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und mit einer Vakuumzentrifuge (RVC 2-18, Martin Christ) gefriergetrocknet. Bei Bedarf wurden diese Aliquots nach demselben Prinzip verkleinert. Die Aliquotierung aller Aβ-Varianten erfolgte nach demselben Prinzip.

#### 2.5 ThT-Aggregationsassay

Um den Aggregationsverlauf von  $A\beta$  oder  $\alpha$ -Syn in Echtzeit zu beobachten, wurde der Farbstoff Thioflavin T (ThT) verwendet, der spezifisch  $\beta$ -Faltblattstrukturen bindet, die für Amyloide charakteristisch sind [51]. ThT enthält eine in Lösung frei rotierende Phenylgruppe, die durch die Bindung an amyloide Strukturen unterbunden wird. Dadurch verschiebt sich das Anregungs- und Emissionsspektrum von 350 und 438 nm im ungebundenen Zustand auf 450 und 482 nm im gebundenen Zustand [52]. Die Experimente wurden in einer 96er-Mikrotiterplatte (Half Area, non-binding surface, Corning 3881) mit einem Volumen von 100 µl pro Vertiefung durchgeführt. Das ThT/Proteinverhältnis betrug ca. 1:3. Bei einer sehr geringen Proteinkonzentrationen wurden mindestens 3 µM ThT verwendet. Die Messung erfolgte im Plattenlesegerät (FLUOstar Omega oder CLARIOstar Platereader, BMG Labtech) mit einem Anregungsfilter von 440 nm und einem Emissionsfilter von 480 nm. Die Datenpunkte wurden in einem Zeitintervall von 3-6 Minuten aufgenommen. Sofern nicht anders gekennzeichnet, wurde die Platte im Ruhezustand (ohne Schütteln) gemessen.

Die für das jeweilige Experiment verwendeten Puffer sind in den Abbildungsunterschriften aufgeführt. Bei der Verwendung von monomeren A $\beta_{42}$  wurde ein lyophilisiertes Aliquot von A $\beta$  zunächst in 10 mM NaOH auf Eis gelöst und anschließend mit einem Puffer-Mix (+ ThT, Natriumazid und ggfs. weitere Reagenzien) gemischt. Die Lösungen wurden zügig in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte überführt. Bei Amplifikationsassays wurden die Seeds in einem Puffer-Mix vorbereitet und als erstes auf die Platte überführt. In diesem Fall wurde die Substratlösung in Puffer als letztes überführt. Die Substratlösung wurde auf Eis gelagert.

Assays mit  $\alpha$ -Syn wurden wie oben für A $\beta$  beschrieben durchgeführt. Das  $\alpha$ -Syn wurde nach der Reinigung (s. 2.6) in Zielpuffer bei -80°C gelagert. Die Proteinkonzentration wurde vor der Lagerung photometrisch (UV/Vis Spektralphotometer V-650, Jasco) mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von 5.600 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> bei  $\lambda = 275$  nm.

#### 2.6 α-Synuclein Proteinsynthese und Reinigung

Für die Transformation des Plasmidvektors mit  $\alpha$ -Syn-WT DNA oder der Y136C- $\alpha$ -Syn DNA wurden 1 µl einer Konzentration von 20 ng/µl Plasmidvektor in 50 µl Chemokompetente Zellen (*Escherichia coli (E. coli)* XL1-Blue) transformiert. Der Reaktionsansatz wurde hierfür 10 min auf Eis inkubiert und anschließend 45 s bei 42°C erwärmt. Der Reaktionsansatz wurde weitere 2 min auf Eis gestellt und in 500 µl LB-Medium 30 min bei 37°C und 800 rpm (Thermomixer comfort, Eppendorf) geschüttelt. Der Ansatz wurde zuletzt auf einer LB-Agargplatte (1,5 % Agar) mit 100 µg/ml Ampicillin über Nacht bei 37°Causplattiert.

Eine Übernachtkultur einer Kolonie wurde in 50 ml 2YT-Medium + 100 µg/ml Ampicillin in einem 250 ml Kolben vorbereitet und bei 37°C und 160 rpm über Nacht in einem Inkubationsschüttler (Innova 40, New Brunswick) geschüttelt.

Die Vektoren wurden anschließend mit dem Nucleospin Plasmid EasyPure Kit (Macherey-Nagel) nach Herstellerprotokoll isoliert und in den *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) wie oben beschrieben transformiert. Es erfolgte eine erneute Übernachtkultur (s. oben). Zum Anlegen von Glycerolstocks wurden 500 µl der Übernachtkultur mit 500 µl 60 % Glycerol gemischt und bei -80°C gelagert. Diese konnten dann für erneute Synthesen für die Herstellung der Übernachtkulturen verwendet werden. Zur Überprüfung der korrekten und mutationsfreien Gensequenz wurde der Vektor wie oben beschrieben isoliert und durch die Firma SeqLab GmbH sequenziert. Aus der Vorkultur wurden 2 Liter Kultur (31 g/l 2YT-Medium, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 50 mM GMB (37,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 12,6 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) und 100 µg/ml Ampicillin) hergestellt. Außerdem wurde für das sogenannte Autoinduktionsmedium ein Verhältnis von 0,2 % Laktose, 0,05 % Glukose und 0,6 % Glycerol hinzugefügt. Die Kultur wurde mit einer OD<sub>600</sub> von 0,05 mithilfe der Übernachtkultur vorbereitet und für ca. 24 h unter denselben Bedingungen wie für die Übernachtkultur inkubiert.

Die Kultur wurde 20 min bei  $5.000 \times$  zentrifugiert (Avanti J-26XP Zentrifuge, Beckman Coulter und einen JLA 10500 Rotor, Beckman Coulter). Das Bakterienzellsediment wurde in einer 0,9 %igen NaCl-Lösung aufgenommen und mit einer Tablette (pro 20 ml Lösung) EDTA-freier Proteaseinhibitor-Cocktail (cOmplete) in einem 50 ml-Reaktionsgefäß bei 95°C thermolytisch für 15 min aufgeschlossen. Die Lösung wurde zwischenzeitlich mit einem Schüttelgerät (Vortexmischer, VWR) durchmischt. Anschließend wurde die Lösung auf Eis gekühlt und bei  $8.000 \times g$  und 4°C für 20 min zentrifugiert (5702 R, Eppendorf). Der Überstand mit den enthaltenen Zielproteinen wurde in ein frisches 50 ml-Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 10 mg/ml Streptomycinsulfat bei 4°C für 20 min auf einen Rollenmischer (RM 5, CAT) gefällt. Es erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt bei  $8.000 \times g$  und 4°C für 20 min. Der Überstand wurde mit einem 0,22 µm-Spritzenfilter (RO-TILABO PVDF) in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die Proteine mit einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung gefällt (weißer Niederschlag). Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das weiße Proteinsediment entweder bei -20°C gelagert oder für

die weiterführenden Reinigungsschritte in  $25 \,\mathrm{mM}$  Tris-Puffer bei pH 8 über Nacht bei 4°C in einem 10 MWCO Schlauch dialysiert.

Eine Anionenaustauschchromatographie wurde mit einer HiTrap Q HP 5 ml Säule in 25 mM Tris pH 8 und einem Salzgradienten mit 800 mM NaCl durchgeführt. Die Steigung des Gradienten betrug 2%/min und die Flussgeschwindigkeit betrug 2 ml/min. Das Protein wurde in ein 15 ml-Reaktionsgefäß erneut mit Ammoniumsulfat gefällt. Für die anschließende Größenausschlusschromatographie wurde WT- $\alpha$ -Syn in 25 mM Tris pH 8 aufgenommen. Für die Y136C- $\alpha$ -Syn-Mutante wurde aufgrund der oxidierenden Cysteine das Protein in 150 mM Tris pH 7,2 + 5 mM TCEP (Reduktionsmittel) eine Stunde inkubiert, bevor es mit einer Gelfiltrationssäule (Superdex 200 Increase 10/300 GL, GE Healthcare) im selben Puffer gereinigt wurde. WT- $\alpha$ -Syn wurde in 50 mM Tris pH 8 eluiert und bei -80°C gelagert. Die Y136C- $\alpha$ -Syn-Mutante wurde entweder schockgefroren und bei -20°C kurzzeitig gelagert oder unmittelbar für die Fluorochrom-Markierung vorbereitet.

#### 2.7 Fluorochrom-Konjugation der Y136C-α-Syn-Mutante

Die Konzentration der Y136C-a-Syn-Mutante wurde photometrisch (UV/Vis Spektralphotometer V-650, Jasco) mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von  $4.110 \,\mathrm{M}^{-1} \,\mathrm{cm}^{-1}$  bei  $\lambda = 275$  nm bestimmt. Um das TCEP für den Konjugationsansatz zu reduzieren, wurde die Y136C- $\alpha$ -Syn-Lösung mit einem 10 kDa-CutOff Zentrifugalfilter bei  $3.200 \times g$  und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 200 mM HEPES-Puffer auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt. Der Überstand wurde anschließend in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit einem 5,4-fachen molaren Überschuss Hilyte-Fluor-647-C<sub>2</sub> Maleimid oder Hilyte-Fluor-488- $C_2$  Maleimid für eine Stunde abgedunkelt bei RT inkubiert. Um den überschüssigen Farbstoff zu entfernen, wurde der Ansatz mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) in einer semipräparativen Säule (Zorbax 9.4x250mm) getrennt. Als Elutionslösung wurden 22% Acetonitril (AcN) mit 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) verwendet. Die AcN-Konzentration stieg über einen Gradienten im Elutionsprotokoll an, während die TFA-Konzentration konstant blieb: 28 min 22-40% AcN (Elution), 2 min 40-50% AcN und  $5 \min 80\%$  AcN (Waschschritt). Die Elution wurde anschließend mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und mit einer Vakuumzentrifuge (RVC 2-18, Martin Christ) gefriergetrocknet.

#### 2.8 Herstellungsprotokoll der Seeds

Die A $\beta$ -Seeds wurden in einer 96er Multititerplatte (Half Area, non-binding surface, Corning 3881) in PBS mit 0,07% Natriumazid hergestellt. 100µl einer Konzentration von 5 oder 10µM Protein wurde dazu in eine Plattenvertiefung der Platte gegeben und mit einer Folie (Seal Plate film, Sigma-Aldrich) versiegelt und bei 37°C über Nacht (Heizschrank, Memmert GmbH + Co. KG) inkubiert. Vor dem Gebrauch wurden die Seeds 10 min im Ultraschallbad (Sonorex RK100H, Bandelin) sonifiziert.  $\alpha$ -Syn-Seeds wurden in einer Konzentration von 100  $\mu$ M in PBS mit 0,7 % Natriumazid in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß unter kontinuierlichen Schüttelbedingungen (600 rpm im Thermomixer comfort, Eppendorf) bei 37°C hergestellt.

Für die systematischen Optimierungsschritte des Amplifikationsvorgangs von α-Syn und A $\beta$  (ab Kapitel 3.3.2) wurden Stocks der Seeds angefertigt. 10 µM A $\beta$  wurden in 20 mM Phosphatpuffer pH 7,4 mit 0,03 % Proclin und 25 mM NaCl bei Raumtemperatur in einer 384er Multititerplatte (Microplate 384/V-PP, Eppendorf) für einen Tag inkubiert. Das Ziel war, eine möglichst hohe Diversität an Seeds zu generieren, da bisher nicht geklärt ist, in welcher Form natürliche Seeds erscheinen. Insbesondere Oligomere zeigen eine starke Heterogenität und können die unterschiedlichsten Strukturen aufweisen und weisen dadurch möglicherweise unterschiedliche Eigenschaften auf. Die A $\beta$ -Lösungen wurden daher in unterschiedlichen Volumina in die Vertiefungen pipettiert (16 × 30 µl, 16 × 50 µl und 16 × 100 µl). Die Seeds wurden anschließend vereint und mit einer Ultraschallsonde (Mikrosonde MS72, Bandelin) 3 × für 1 Sekunde sonifiziert. Es wurden Aliquotgrößen von 20 µl bei 4°C gelagert.

Die Diversität bei den  $\alpha$ -Syn-Seeds wurde durch die Verwendung von Glasperlen von unterschiedlicher Größe (0,75 - 1 mm und 2,85 - 3,45 mm Glasperlen, ROTH) erzielt. Eine 96er Multititerplatte (Half Area, non-binding surface, Corning 3881) wurde pro Vertiefung mit 50 µl einer 100 µM  $\alpha$ -Syn-Konzentration in PBS mit 0,03 % Proclin befüllt. Jeweils ein Drittel der Ansätze wurde mit einer kleinen oder großen Glasperle oder ohne Glasperle bei 37°C und 600 rpm Schüttelbedingungen im Plattenlesegerät für 7 Tage inkubiert. Die Ansätze wurden vereint und mit einer Ultraschallsonde (Mikrosonde MS72, Bandelin) 3 × für 1 Sekunde sonifiziert. Anschließend wurden die Seeds auf 10 µM verdünnt und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Seeds wurden in einer Aliquotgröße von 20 µl bei -80°C gelagert.

#### 2.9 Proteinfällung mit PTA

Die Natrium-Phosphorwolframat (PTA)-Fällung wird für die Reinigung von krankhaften PrP<sup>Sc</sup>-Prionen aus Hirngewebe verwendet [53]. Der Mechanismus für die Proteinfällung konnte bisher noch nicht entschlüsselt werden, aber es wird eine Interaktion von negativgeladenen Wolframationen mit der positiven Oberfläche von Phospholipiden vermutet [54], wodurch die Zielproteine von Lipiden getrennt werden können [53].

In dieser Arbeit wurde nach dem Protokoll von Henke mit geringfügigen Abweichungen gearbeitet [1]. Das verwendete Protokoll ist in der unten stehenden Abbildung dargestellt (s. Abb. (8).

Es wurden 60 µl 20 % iges Gehirnhomogenat der Mauslinie TgM83<sup>+/-</sup> (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Erdem Gültekin Tamgüney) mit 240 µl PBS zu einer Gesamtkonzentration von 5 % verdünnt und 5 Minuten bei  $5000 \times \text{g}$  zentrifugiert. 50 µl wurden jeweils

1:1 mit Sarkosyl und PTA gemischt, sodass eine Endkonzentration von 2% Sarkosyl und 2% PTA in PBS erreicht wurde. Die Lösung wurde für eine Stunde bei 37°C und 650 rpm auf einem Thermomixer (Thermomixer comfort, Eppendorf) geschüttelt. Danach erfolgte erneut ein Zentrifugationsschritt für 30 Minuten bei 14.000 × g bei RT. Zum Zellsediment wurden erneut 100 µl 2% PTA und 2% Sarkosyl in PBS gegeben und weitere 30 Minuten geschüttelt. Das Zellsediment wurde in 250 µl 0,2% Sarkosyl in PBS verdünnt und mit einer Ultraschallsonde (Mikrosonde MS72, Bandelin) für  $3 \times 0,1$  Sekunden mit 1 Sekunde Pause und 10% Amplitude sonifiziert. Die Hirnhomogenatkonzentration betrug rechnerisch 1%.



Abb. 8: PTA-Protokoll modifiziert nach Henke [1].

#### 2.10 Rasterkraftmikroskopie

Die Rasterkraftmikroskopie (AFM) wurde für die Visualisierung der Seed-Struktur verwendet. Dafür wurden die Seeds im Puffer auf einem Mica (AFM Mica Disk, Plano) – gehört zu der Gruppe der Schichtsilikate – gebunden. Ein Volumen von 10 µl Aβ- oder α-Syn-Seeds wurden auf die Mica Disk aufgetragen und für 30 Minuten in einer Kunststoffschale inkubiert. Bei Aβ-Proben wurde der Deckel verschlossen und ein feuchtes Tuch in die Schale gegeben, um eine Trocknung der Probe und damit Trocknungsartefakte zu verhindern. Bei α-Syn war eine Trocknung der Probe anders als für Aβ erforderlich. Die Proben wurden anschließend  $3 \times \text{mit}$  100 µl H<sub>2</sub>O gewaschen. Das überschüssige H<sub>2</sub>O wurde mit einem Tuch aufgefangen. Nachdem die Probe mit gasförmigem Stickstoff getrocknet wurde, konnte sie mit dem Rasterkraftmikroskop (JPK NanoWizard III, Bruker) vermessen werden. Dafür wurde ein OMCL-AC160TS-Cantilever im intermittierenden Kontaktmodus (AC mode) verwendet.

#### 2.11 Dot-Blot

Bei der Dot-Blot-Methode wird ein Protein an eine Membran gebunden und über Antikörper spezifisch nachgewiesen, ähnlich wie bei einem klassischen Western-Blot.

In dieser Arbeit wurden 1,5 µl einer Probe auf eine Nitrocellulose-Membran aufgetragen und für 30 Minuten getrocknet. Alle weiteren Schritte erfolgten ebenfalls bei Raumtemperatur. Die Membran wurde anschließend für 30 Minuten in einer 5%-igen Milchpulverlösung in TBST auf einem Schüttler (Tischschüttler, Behr) blockiert. Die Membran wurde für  $3 \times 10$  Minuten mit TBST gewaschen und die Antikörper Nab228 und 6E10 (Wirt: Maus) in einer Konzentration von  $0.5 \,\mu\text{g/ml}$  in 5%-iger Milchpulverlösung/TBST für eine Stunde inkubiert. Es erfolgte ein erneuter Waschschritt für  $3 \times 10$  Minuten mit TBST. Ein Goat anti-Mouse-IgG-HRP, der gegen die anti-A $\beta$ -Antikörper gerichtet ist, wurde für eine Stunde in einer Verdünnung von 1:5.000 in 5%-iger Milchpulverlösung/TBST inkubiert. Es erfolgte ein letzter Waschschritt für  $3 \times 10$  Minuten mit TBST. Der Goat anti-Mouse-IgG-HRP ist mit einer Meerrettichperoxidase konjugiert, die die chemische Substanz Luminol in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid katalysiert, wodurch Energie in Form von Licht emittiert wird (= Chemilumineszenz). Mit den entsprechenden Reagenzien (Super Signal First Pico, Thermo) wurde das Signal nach 5 Minuten Inkubation in einer Geldokumentation (Chemi-Doc, Biorad) detektiert.

#### 2.12 Oberflächenplasmonenresonanz

Die Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) ist ein sehr genaues spektroskopisches Verfahren um Bindungseigenschaften von Proteinen und Liganden zu untersuchen. In dieser Arbeit wurde die SPR-Methode zur Ermittlung der Bindungsstärke der Fängerantikörper und ein Blockierungspeptid genutzt. Die Experimente wurden an einem Biacore T200 instrument (GE Healthcare) bei 25°Cin PBS durchgeführt. Zunächst wurde CM5 Sensorchip (GE Healthcare), die eine Dextranmatrix enthält, mit 200 mM EDC und 50 mM NHS für 400 Sekunden aktiviert. Die Blockierungspeptide wurden in 10 mM Natriumacetat bei pH 5 bis ca. 100 RU (relative Einheit) immobilisiert. Anschließend wurde der Sensor mit 1 M Ethanolamin bei pH 8,5 deaktiviert. Anschließend wurden die Fängerantikörper zyklenweise mit steigender Konzentration (0,01 nM - 300 nM) unter kontinuierlichem Fluss inkubiert. Es erfolgte eine 5-minütige Assoziationsphase + 15 min Dissoziationsphase. Die Fließgeschwindigkeit betrug 30 µl/min. Die Sensorgramme wurden mit der Biacore T200 Evaluation Software v3.2 analysiert unter Anwendung des *bivalent analyte fit.* 

### Software

- sFIDAta
- Origin 2019
- ZEN 3.0 blue edition
- LAT<sub>E</sub>X
- Inkscape
- Python-Script (mit Unterstützung von Marie Schützmann)
- Citavi 6

## 3 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war es, einen Assay zu entwickeln, in dem A $\beta$ -Oligomere zunächst amplifiziert werden und dann nach dem sFIDA-Prinzip detektiert und quantifiziert werden. Dadurch sollen die geringen Mengen an Oligomeren in Körperflüssigkeiten wie Blut oder CSF sensitiver analysiert werden, um eine verlässliche Unterscheidung von Alzheimer-Patienten und Kontrollen zu gewährleisten.

Da das Aβ-Peptid zur Selbstaggregation neigt, im Folgenden auch als "spontane Aggregation" bezeichnet, sollten Bedingungen optimiert werden, in der die spontane Aggregation des eingesetzten Substrats möglichst gering ist, während die kontrollierte Amplifikation der Seeds möglichst stark ist.

Um das Prinzip der Amplifikation auf der Glasoberfläche nachzuweisen und um die Amplifikationsbedingungen zu optimieren, wurden in den folgenden Experimenten ausschließlich synthetisch hergestellte Aβ-Seeds verwendet.

#### 3.1 Amplifikation von Aβ-Seeds auf der Glasoberfläche

Um zu überprüfen, ob synthetisch hergestellte Seeds amplifiziert werden können, wurde eine hohe Konzentration Fluorochrom-konjugierter Seeds an einen Fängerantikörper gebunden und anschließend mit monomerem A $\beta$ -Substrat inkubiert.

Der Reaktionsansatz wurde zu drei verschiedenen Zeitpunkten gemessen. Da die Amplifikation mit HiLyte647-konjugiertem Substrat (=,,rot-markiert") erfolgte, ist eine Zunahme des Signals im roten Fluoreszenzkanal zu erwarten. Anhand des integrierten Histogramms (Abb. 9A) wurden nach einer Stunde Pixel mit einem maximalen Intensitätswert von ca. 6.400 (Graustufenwert) detektiert – die mikroskopischen Bildaufnahmen besitzen eine 16 Bit-Tiefe, wodurch jeder Pixel einen von insgesamt 65.536 Graustufenwerten einnehmen kann. Die Angaben der Pixelanzahl beziehen sich immer auf die durchschnittliche Pixelanzahl pro aufgenommenes Bild. Nach 5,5 Stunden erreichten einzelne Pixel einen Wert von 12.700 und nach 57 Stunden einen Wert von 49.900. Das Signal nahm wie erwartet über die Zeit zu. Die Quantifizierung der Pixel bei einem bestimmten Intensitätswert kann durch die Anwendung eines *CutOffs* erfolgen. Dieser berechnet in der Regel einen Schwellenwert anhand einer Kontrolle, sodass die verbliebenen Pixel folglich über dem Hintergrundrauschen gezählt werden können.



Abb. 9: Amplifikation von synthetischen  $A\beta_{42}$ -Seeds über die Zeit im sFIDA

1 μM 10% grün-markierte Seeds wurden an den Fängerantikörper gebunden und mit 100 nM 10% rot-markiertem Substrat in TBS Puffer bei RT inkubiert. Die Glasoberfläche wurde nach dem PEG Protokoll präpariert. (A) Integriertes Histogramm über die Zunahme des Signals des roten Fluoreszenzkanals mit der Zeit. Die Y-Achse gibt die Anzahl der Pixel bei ihrem jeweiligen Intensitätswert (X-Achse) wieder. (B) Balkendiagramm der Pixelanzahl bei einem gesetzten CutOff von 3.000 im roten Fluoreszenzkanal nach 1, 5,5 und 57 h. (C) Ko-lokalisierte Beispielbilder der grün-markierten Seeds und des rotmarkierten Substrats. Die ko-lokalisierten Pixel sind in Gelb dargestellt.

In diesem Experiment wurde der CutOff allerdings bei einem Intensitätswert von 3.000 festgelegt. Nach einer Stunde Substratinkubation lagen 50 Pixel über dem CutOff und 725 bzw. 1.384 Pixel lagen nach 5,5 bzw. 57 Stunden über dem CutOff. Die Pixelanzahl stieg somit um den Faktor 14,5 oder 27,7 nach 5,5 und 57 Stunden entsprechend (Abb. 9B). Die Seeds und das Substrat wurden jeweils mit unterschiedlichen Fluorochromen konjugiert und die Ko-Lokalisation der Signale als Amplifikation interpretiert. Signale, die in nur einem Fluoreszenzkanal erschienen, können entweder auf nicht-amplifizierte Seeds oder spontan entstandene Aggregate hindeuten.

Repräsentative Bilder aus diesem Experiment zeigten eine Zunahme des ko-lokalisierten

Signals, welches in Gelb dargestellt ist (Abb. 9C). Nach einer Stunde Amplifikation waren ausschließlich die mit dem Fluorochrom HiLyte488 konjugierten Seeds (=,,grün-markiert") zu erkennen und nach 5,5 h konvertierte das grüne Signal der Seeds zu ko-lokalisiertem amplifiziertem Signal mit zusätzlichen roten Rändern der Seeds, die vermutlich die vergrößerte Oberfläche der Seeds darstellen. Nach 57 Stunden ist eine weitere Zunahme des rot-markierten Substrats an den Seeds zu verzeichnen.

 In diesem Experiment konnte die Amplifikation synthetisch hergestellter Aβ-Seeds bei hoher Konzentration auf der Glasoberfläche nachgewiesen werden.

### 3.2 Spontane Aggregation des Substrats und erhöhter Hintergrund durch das Fluorochrom-markierte Substrat

Amyloide Peptide und Proteine neigen definitionsgemäß zur Aggregation. Insbesondere das  $A\beta_{42}$ -Peptid zeigt eine starke Tendenz zur Selbstaggregation [55], das auch in den folgenden sFIDA-Assays beobachtet wurde. Nachdem im vorherigen Experiment prinzipiell gezeigt wurde, dass die synthetisch hergestellten Seeds auf der Glasoberfläche amplifiziert werden können, wurde im nächsten Schritt die verwendete Seedkonzentration reduziert, um in den Bereich der physiologischen Oligomer-Konzentration zu gelangen, der vermutlich weit unterhalb einer pikomolaren Konzentration liegt. Die Verwendung einer Seedkonzentration bis in den femtomolaren Konzentrationsbereich erforderte zusätzlich die Anpassung der Belichtungsparameter, da die Reduktion der Seedkonzentration um den Faktor 10<sup>9</sup> von  $\mu$ M zu fM erwartungsgemäß mit einer starken Signalreduktion einhergeht. So wurde beispielsweise die Belichtungszeit von 35 ms aus dem vorherigen Experiment auf 500 ms verlängert. Mit einer stärkeren Belichtungszeit ist auch eine Zunahme des Signals zu erwarten. Dadurch wurde in diesem Experiment erhöhtes Hintergrundrauschen in den Proben mit Substratzugabe beobachtet.

Im folgenden sFIDA-Experiment wurden die Auswirkung auf das Signal durch die spontane Aggregation des Substrats, sowie die Auswirkung auf das Hintergrundrauschen durch die Verwendung von Fluorochrom-konjugiertem Substrat, getestet. Die kritische Selbst-Aggregationskonzentration gibt die benötigte Mindestkonzentration für die spontane Bildung von Aggregaten an und liegt für A $\beta_{42}$  bei ca. 60 - 120 nM in PBS Puffer [56]. Durch die Verwendung von 100 nM Substrat im sFIDA-Experiment ist demzufolge die Entstehung von Aggregaten nicht auszuschließen. Das Substrat wurde für ca. 20 Stunden auf der mit Antikörper-beschichteten Glasoberfläche inkubiert und mögliche spontan entstandene Aggregate anschließend mit einem Detektionsantikörper nachgewiesen. Um Hintergrundrauschen aufgrund unspezifischer Wechselwirkungen des Detektionsantikörpers mit der Glasoberfläche auszuschließen, wurde eine Kontrolle ohne Substrat, aber mit einem Detektionsantikörper, mitgeführt. Außerdem wurde eine Probe mit 10 % rot-markiertem Substrat verwendet, um das Hintergrundrauschen aufgrund einer potenziellen Bindung des Fluorochrom-konjugierten Substrats an den Fängerantikörper zu analysieren. Das detaillierte Protokoll ist in Tabelle 6.2 zu finden.



Abb. 10: Spontane Aggregation des Substrats und erhöhtes Hintergrundrauschen durch die Verwendung von markiertem Substrat

(A) Integriertes Histogramm der Pixelanzahl (Y-Achse) zu den jeweiligen Intensitätswerten (X-Achse) einer Kontrolle ohne Substrat (gelb), einer Probe mit 100 nM Substrat (magenta) und einer Probe mit 10% rot-markiertem Substrat (rot). CutOff bei 0,1% der hellsten Pixel in der Kontrolle ohne Substrat (=5.062). Graue Balken markieren die Intensitätsbereiche, in denen die meisten Pixel des Hintergrunds liegen. (B) Balkendiagramm bei CutOff 0,1%. (C) Beispielbilder des roten Fluoreszenzkanals der entsprechenden Proben. Schwarze Pfeile weisen auf Partikel hin. In den Probenansätzen ohne markiertes Substrat wurde ein CF633-konjugierter Nab228-Detektionsantikörper verwendet.

Die Kontrolle ohne Substrat wies erwartungsgemäß das schwächste Signal auf. Die meisten Pixel befanden sich in einem Intensitätsbereich des Graustufenwerts 3.000 - 5.000, wie durch die stark abfallende Kurve im Histogramm zu erkennen ist (10A). Bei einem CutOff von 0,1% der hellsten Pixel dieser Probe werden ca. 250 Pixel gezählt (10B). In dieser Probe sind keine partikelartigen Strukturen zu erkennen (10C). Die Zugabe von 100 nM Substrat verursachte im Bereich der niedrigeren Pixelintensitäten von 3.000-5.000 im Vergleich zur Kontrolle kein stärkeres Hintergrundrauschen. Das Histogramm ist in diesem Bereich nicht von der Kontrolle zu unterscheiden (s. grau-gekennzeichneter Bereich in Abbildung 10A). Erst ab einem Intensitätswert von ca. 5.000 erscheinen hellere Pixel. Die Intensitätskurve im Histogramm setzt sich hier deutlich ab und verläuft über der Kontrolle (10A). Bei einem CutOff von 0,1% steigt die Pixelanzahl auf 791 um den Faktor 3,2 (10B). Auf den Bildern sind einzelne Partikel zu erkennen (10C), die als spontan entstandene Aggregate gedeutet wurden und durch die schwarzen Pfeile angezeigt werden. Das erhöhte Hintergrundrauschen wurde demnach vermutlich durch spontan entstandene Aggregate erzeugt.

Das stärkste Signal erzeugte das rot-markierte Substrat, das zum einen ebenfalls spontane Aggregation zeigte und zum anderen die Gesamthelligkeit des Bildes veränderte. Letzteres ist insbesondere in dem integrierten Histogramm zu erkennen, das sich deutlich von den anderen unterscheidet. Das Histogramm verläuft hinsichtlich der Pixelintensität über den Histogrammen der Kontrolle ohne Substrat und der Probe mit nicht-markiertem Substrat, da die meisten Pixel in einem Intensitätsbereich von 6.000-11.000 liegen (10A). Das stärkere Hintergrundrauschen wird auch durch ein gleichmäßig helleres Bild im Vergleich zu den Bildern der anderen Proben deutlich (10C). Dieser Effekt ist vermutlich auf die Bindung des Fluorochrom-markierten Substrats an den Fängeranikörper zurückzuführen. Im Balkendiagramm ist eine Sättigung der Pixelanzahl zu sehen, da alle Pixel über dem 0,1 % Cutoff liegen (10B). Das Fluorochrom-markierte Substrat erzeugt einerseits erhöhtes Hintergrundrauschen durch die Bindung an den Fängerantikörper und andererseits durch die zusätzliche spontane Bildung von Aggregaten.

• In diesem Experiment wurde erhöhtes Hintergrundrauschen beobachtet, das durch die spontane Selbstaggregation des Substrats und durch die Bindung von Fluorochrom-markiertem Substrat an den Fängerantikörper verursacht wurde.

### 3.2.1 Minimierung von falsch-positiven Signalen durch die Einführung eines Blockierungspeptids

Da spontan entstandene Aggregate und Fluorochrom-markierte Substrate an die freien Fängerantikörper binden können und dadurch störendes Hintergrundrauschen und falschpositive Signale verursachen, sollte im Weiteren eine Strategie entwickelt werden, die die unbesetzten Antikörper sterisch blockiert.

Dazu wurden N-terminale Aβ-Fragmente verwendet, die die hier verwendeten Fängerantikörper spezifisch binden können und dadurch freie Stellen, die nicht von den Zielproteinen besetzt wurden, binden und blockieren können. Das Konzept ist in Abbildung 11 zu sehen: die Probe wird an einen Fängerantikörper gebunden und anschließend werden die unbesetzten Stellen mit dem Blockierungspeptid (BP) besetzt. Das Substrat wird dann hinzugefügt, sodass potenziell entstandene Aggregate oder das Substrat in monomerer Form nicht an den Fängerantikörper binden können. Demzufolge sollte ausschließlich richtig-positives Signal gewährleistet sein.

Als möglicherweise geeignetes Blockierungspeptid wurde das N-terminale A $\beta$ -Fragment der ersten 14 Aminosäuren, im Folgenden als A $\beta_{14}$  bezeichnet, ausgewählt und untersucht. A $\beta_{14}$  enthält das Epitop für die hier verwendeten Fängerantikörper 6E10 und Nab228, die das Epitop von A $\beta$  im Bereich der Aminosäuren von 3-8 beziehungsweise von 1-11 binden. Das A $\beta_{14}$ -Peptid beinhaltet einen überwiegenden Anteil polarer und geladener Aminosäuren, die dem Peptid eine hohe Löslichkeit verleihen, wodurch Aggregation nicht zu erwarten ist.



Abb. 11: Strategie zur Verhinderung falsch-positiver Signale

Falsch-positives Signal wird durch die Bindung spontan entstandener Aggregate oder Fluorochrom-konjugiertes Substrat an den Fängerantikörper erzeugt. Das Blockierungspeptid wird in einem zusätzlichen Schritt nach der Probeninkubation in den Assay eingeführt und blockiert die freien Fängerantikörper. Das Substrat wird anschließend hinzugegeben und amplifiziert die Seeds. Die Bindung des Substrats oder neu entstandener Aggregate wird durch das Blockierungspeptid verhindert. Ausschließlich richtig-positives Signal der amplifizierten Seeds kann detektiert werden.

# Aggregationsverlauf der spontanen A $\beta_{42}$ -Aggregation und der Amplifikation in Anwesenheit von A $\beta_{11-42}$

Bei der Auswahl eines Blockierungspeptids soll insbesondere die  $A\beta_{42}$ -Aggregation beziehungsweise die kontrollierte Amplifikation nicht beeinträchtigt werden. Der Einfluss des  $A\beta_{14}$ -Peptids auf die  $A\beta_{42}$ -Aggregation wurde in einem Aggregationsassay mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Thioflavin T (ThT) untersucht, der spezifisch  $\beta$ -Faltblattstrukturen bindet und dadurch die Anregungs- und Emmissionswellenlänge des Fluoreszenzfarbstoffs verändert werden [57, 52]. Dies ermöglicht praktisch die Aufzeichnung des Aggregationsverlaufs in Echtzeit.

Im folgenden Experiment wurde die spontane  $A\beta_{42}$ -Aggregation unter dem Einfluss von einem bis zu 75-fachen Überschuss an  $A\beta_{14}$  gegenüber dem  $A\beta_{42}$ -Substrat untersucht. Der Einfluss des  $A\beta_{14}$ -Peptids auf die Amplifikation wurde zusätzlich durch die Zugabe von  $A\beta_{42}$ -Seeds getestet (s. Abb. 12A+B).

Im Falle einer inhibierenden Wirkung des A $\beta_{14}$  auf die A $\beta_{42}$ -Selbstaggregation oder -Amplifikation wäre eine abflachende Steigung im linearen Aggregationsbereich mit steigender A $\beta_{14}$ -Konzentration zu erwarten. Im Falle einer aggregationsfördernden Wirkung wäre eine steigende lineare Aggregationsphase zu erwarten.

Die Steigungen aller Aggregationsverläufe wurden in dem Zeitfenster von 4,5-5,5 Stunden bestimmt und sind in den Tabellen in Abbildung 12C+D angegeben. Bei der spontanen Aggregation lagen die Steigungen im Bereich von 1.336-1.554. Der Mittelwert aller Steigungen bei insgesamt drei unterschiedlichen A $\beta_{14}$ -Konzentrationen (0, 7,5 und 75 µM) betrug 1.448±66. Die geringe Streuung der Werte unterstreicht die Ähnlichkeit der Aggregationsverläufe unabhängig von der Zugabe des A $\beta_{14}$ -Peptids und weist darauf hin, dass A $\beta_{14}$  keine Auswirkungen auf die spontane A $\beta_{42}$ -Aggregation hatte.

Die Steigungen der amplifizierten Proben (12D) waren im Durchschnitt mit einem Wert von  $854 \pm 52$  überraschenderweise geringer als die Steigungen der spontanen Aggregation und würden auf einen langsameren Aggregationsprozess hinweisen.

Für die Berechnung des detektierbaren Start der Aggregation (engl. lag phase, im Folgenden auch als *lag-Phase* bezeichnet) wurde der lineare Aggregationsbereich bestimmt, der in diesem Fall zwischen 4,5 und 5,5 Stunden lag. Zusätzlich wurde eine Regressionsgerade gezogen. Anschließend wurde der X-Achsenschnittpunkt bei Y=0 als *lag-Phase* definiert. Die *lag-Phase* der Amplifikation hingegen setzte mit einem durchschnittlichen Wert von 3,4 h ± 0,1 um 0,6 h (= 36 min) eher ein als die *lag-Phase* der spontanen Aggregation (12E+F), wodurch anders als durch den Wert der Steigung und wie zu erwarten ein schnellerer Aggregationsprozess angedeutet wurde.

Da die *lag-Phase* der Amplifikation mit steigender  $A\beta_{14}$ -Konzentration weder verzögert, noch verkürzt wurde, wurde eine inhibierende oder aggregationsfördernde Wirkung des Blockierungspeptids ausgeschlossen.



Abb. 12: Der Einfluss von A $\beta_{14}$  auf die spontane A $\beta_{42}$ -Aggregation und Amplifikation

Einfluss verschiedener A $\beta_{14}$ -Konzentrationen, 0 µM (braun), 7,5 (grün) oder 75 µM (blau), (A) auf die spontane Aggregation von 1 µM A $\beta_{42}$  oder (B) auf die Amplifikation von 100 nM Seeds in PBS Puffer bei RT. n = 2. Grau-markierte Bereiche zeigen den zeitlichen Abschnitt der linearen Aggregationsphase, in der die Steigung berechnet wurde für (C) die Reaktionsansätze ohne Seeds oder (D) mit Seeds. *Lag-Phase* der Reaktionsansätze (E) ohne Seeds oder (F) mit Seeds. Horizontale graue Linien kennzeichnen den Mittelwert.

 Die Aβ<sub>42</sub>-Aggregation wurde nicht durch das Aβ<sub>14</sub>-Peptid beeinflusst, da sowohl der Verlauf der spontanen Aggregation als auch der Amplifikationsverlauf durch die Aβ<sub>14</sub>
-Zugabe unbeeinflusst blieben. Weder die *lag-Phase*, noch die Steigung in der linearen Phase der Aggregation unterschieden sich durch die Zugabe von verschiedenen Aβ<sub>14</sub>
-Konzentrationen voneinander.

# Untersuchung der Blockierungseffektivität der Fängerantikörper durch A $\beta_{14}$ und einem weiteren N-terminal trunkiertem A $\beta$ -Fragment im sFIDA

Das hier untersuchte Blockierungspeptid  $A\beta_{14}$  wurde anschließend auf die Anwendbarkeit und Blockierungseffektivität im sFIDA geprüft (Protokoll in Tabelle 6.3). Dazu wurden im folgenden Experiment die an der Glasoberfläche gebundenen Antikörper durch das Blockierungspeptid besetzt und anschließend wurden rot-markierte Oligomere als Simulierung der spontan entstandenen Aggregate hinzugefügt.

Bei erfolgreicher Blockierung durch das  $A\beta_{14}$ -Peptid ist zu erwarten, dass die Bindung der Aggregate verhindert ist. Es wurde außerdem ein weiteres Peptid getestet: das um eine Aminosäure längere  $A\beta_{15}$ -Peptid mit einem C-terminalen Cysteamin, das eine Thiolgruppe besitzt und dadurch potenziell zu Dimeren oxidieren kann. Beide Peptide wurden jeweils in den Konzentrationen von 300 und 1.000 nM eingesetzt.



Abb. 13: Der Effekt von A $\beta_{14}$  und A $\beta_{15}$ -Cysteamin auf die Blockierung der freien Fängerantikörper im sFIDA zur Verhinderung der Bindung spontan entstandener Aggregate

Blockierung des Fängerantikörpers Nab228 durch  $A\beta_{14}$  oder  $A\beta_{15}$  für 30 min vor Oligomerzugabe als Simulierung der spontanen Aggregation. Die Oligomere wurden für eine Stunde inkubiert. Kontrolle ohne Blockierungspeptid (BP) in Gelb und Blockierungspeptide in den Konzentrationen von 300 und 1.000 nM  $A\beta_{14}$  oder  $A\beta_{15}$  im Farbgradienten von pink bis blau-violett. CutOff = 0,01 % der Kontrolle ohne Blockierungspeptid. Gezeigt ist die Analyse des roten Fluoreszenzkanals.

Aus diesem Experiment gehen keine systematischen Reduktionen der Bindung hervor, wie im Balkendiagramm in Abbildung 13 zu erkennen ist. Einzelne Signalreduktionen sind beispielsweise bei einer Oligomerkonzentration von 0,1 pM zu erkennen, bei der die Zugabe der Blockierungspeptide in allen Bedingungen eine Reduktion des Signals im Vergleich zur Kontrolle ohne Blockierungspeptid verursachte. Bei einer Oligomerkonzentration von 1 pM lagen die Signale teilweise und anders als erwartet höher im Vergleich zur Kontrolle. Auch bei den anderen Oligomerkonzentrationen ist keine Systematik zu erkennen, wodurch kein eindeutiger Effekt der Blockierungspeptide in diesem Experiment erzielt werden konnte.

Kleine Peptide haben in der Regel einen größeren Diffusionskoeffzienten im Vergleich zu großen Molekülen wie zum Beispiel Aggregate und sind daher in ihrer Assoziation an den Fängerantikörper kinetisch begünstigt. Da die Fängerantikörper der Immunglobulin G (IgG) Klasse angehören, besitzen sie divalente Antigenbindestellen, die bei der Bindung eines Aggregats mit polyvalenten Epitopen eine 10<sup>3</sup> - 10<sup>7</sup>-fach stärkere Bindung eingehen können, als die Affinität der entsprechenden monovalenten Bindung [58]. Dies hätte zur Folge, dass die Blockierungspeptide durch die stärkere Bindung und folglich niedrigeren Dissoziationsrate der Aggregate verdrängt würden.

 In diesem Experiment konnte der angestrebte Blockierungseffekt der freien Fängerantikörper durch Aβ<sub>14</sub> nicht erzielt werden, da die Oligomere aufgrund einer polyvalenten Bindung vermutlich die Peptide mit monovalenter Bindung verdrängen konnten.

#### 

Da im vorherigen Experiment der verwendete Fängerantikörper Nab228 nicht erfolgreich blockiert werden konnte, wurde die Affinität des A $\beta_{14}$ -Peptids zu den Fängerantikörpern 6E10 und Nab228 mittels SPR bestimmt und verglichen.

Dazu wurde das Blockierungspeptid A $\beta_{14}$  auf einen Chip immobilisiert und zyklenweise mit steigender Antikörperkonzentration unter kontinuierlichem Fluss beladen. In dieser Phase wurde die Assoziation beobachtet. Anschließend wurde die Beladung unterbrochen und eine Dissoziationsphase erfolgte. Die  $K_d$  gibt an, bei welcher Antikörperkonzentration die Hälfte der immobilisierten Peptide gebunden sind.

Für den 6E10-Antikörper wurde eine  $K_d$  von 22 nM ermittelt und für den Nab228-Antikörper lag der Wert bei 99 nM. Beide  $K_d$ -Werte befinden sich in derselben Größenordnung, jedoch zeigt der 6E10-Antikörper eine stärkere Bindung zum A $\beta_{14}$ -Peptid. Anhand der Sensorgramme wurde außerdem eine schwächere Dissoziation im Vergleich zum Nab228 Antikörper beobachtet (Abb. 14).



Abb. 14: Affinität des A $\beta_{14}$ -Peptids zu den Fängerantikörpern

SPR Sensorgramme der A $\beta_{14}$  (A) -6E10 oder (B) -Nab228 Interaktion. 5 min Assoziationsphase + 15 min Dissoziationsphase in PBS bei 25 °C. Fließgeschwindigkeit = 30 µl/min. Steigende Antikörperkonzentration von 0,01 nM - 300 nM in einem Farbgradienten von braun nach blau dargestellt. Kinetische Parameter berechnet durch Anwendung des *bivalent analyte fit* der Biacore T200 Evaluation Software v3.2.

• In diesem Experiment wurde eine affinere A $\beta_{14}$ -Antikörperbindung des 6E10 gegenüber des Nab228 ( $K_d$ : 22 nM vs. 99 nM) gemessen.

# Untersuchung der Blockierungseffektivität der Fängerantikörper durch Präinkubation oder permanenter Inkubation von A $\beta_{14}$ oder A $\beta_{15}$

Im Folgeexperiment wurden aufgrund der stärkeren A $\beta_{14}$ -6E10-Bindung die Blockierungsaktivität der Peptide für den 6E10-Antikörper mittels sFIDA getestet. Außerdem wurde überprüft, ob ein stärkerer Blockierungseffekt zu erkennen ist, wenn die Peptide dauerhaft in der Lösung verbleiben und somit permanent um die Bindestellen mit den Aggregaten konkurrieren (s. Abbildung 15A). Dazu wurden die Blockierungspepide entweder für 30 Minuten präinkubiert und anschließend aus der Lösung gewaschen oder sie verblieben in der Lösung für die permanente Inkubation (Protokoll: 6.4). Ein Blank, der lediglich Puffer beinhaltete, wurde als Referenz mitgeführt.

Bei der Verwendung des 6E10-Fängerantikörpers ist ein Blockierungseffekt in den Histogrammen mit steigender Peptidkonzentration zu erkennen (Abb. 15B). Die Präinkubation von A $\beta_{14}$  verursachte eine Verschiebung der Pixelintensitätsverteilungen in Richtung



Abb. 15: Der Effekt von  $A\beta_{14}$  und  $A\beta_{15}$  auf die Fängerantikörper Nab228 und 6E10 bei Präinkubation oder permanenter Inkubation

(A) Schematische Übersicht des Versuchsaufbaus. Oben: Darstellung der Präinkubation der Blockierungspeptide; unten: Darstellung der permanenten Inkubation der Peptide. Zugabe von 100 nM 10 % rot-markierten Oligomeren. (B+C) Histogramme der Pixelintensitätsverteilung der einzelnen Proben für den 6E10-Fängerantikörper oder Nab228. Jeweils oben links: Präinkubation von  $A\beta_{14}$ , oben rechts: permanente Inkubation von  $A\beta_{15}$ . Inter links: Präinkubation von  $A\beta_{15}$ . Der Blank beinhaltet lediglich Puffer, die Kontrolle K1 beinhaltet 100 nM rot-markierte Oligomere und die weiteren Proben zusätzlich 300 nM oder 1.000 nM Blockierungspeptid (BP). Die Zahlen kennzeichnen Beispielbilder, die in (F) jeweils dargestellt sind. Violetter Pfeil deutet die Signalreduktion mit steigender  $A\beta_{14}$ -Konzentration an. (D) Absolute Intensitätswerte der Peakmaxima der jeweiligen Proben und (E) relative Signalreduktion durch die Blockierungspeptide bezüglich der Kontrolle K1 mit unblockierten Oligomeren. Die Kontrolle K2 enthält Oligomere in Anwesenheit der Blockierungspeptide ohne vorzeitiger Peptidinkubation und wurden gleichzeitig mit den Oligomeren hinzugegeben. Die Werte wurden Blank-korrigiert und in Relation gesetzt.

Blank-Signal, das für gewöhnlich sehr niedrige Pixelintensitäten des Hintergrundrauschens abbildet (Abbildung 15B oben links). Der Intensitätswert des Blank-Signals lag im Maximum des Histogramms bei 6.200 (15D). Der Intensitätswert des Peakmaximums von 100 nM unblockierten Oligomeren (=Kontrolle K1) lag bei 43.200. Die Präinkubation von 300 nM oder 1.000 nM A $\beta_{14}$ -Blockierungspeptid verursachte eine Signalreduktion der Peakmaxima auf 38.700 bzw. 33.500. Dies entspricht einer relativen Signalreduktion, bei der zuvor der Blank subtrahiert wurde, von 12% bzw. 26% (15E). In den Bildern ist vornehmlich die Reduktion der Gesamthelligkeit des Bildes zu erkennen (15F).

Verblieb das A $\beta_{14}$  permanent in der Lösung, konnte eine Verschiebung des Peakmaximums auf einen Wert von 11.700 oder 11.000 bei 300 bzw. 1.000 nM A $\beta_{14}$  erreicht werden (15D). Das Signal reduzierte sich entsprechend um 29 % und 38 % (15E).

Die Verwendung des Blockierungspeptids  $A\beta_{15}$ , das aufgrund einer Thiolgruppe am C-Terminus Dimere ausbilden kann, zeigte stärkere Effekte sowohl bei der Präinkubation, indem das Signal um etwa 87%-85% reduziert wurde, als auch bei einer permanenten Inkubation von 300 nM bzw. 1.000 nM  $A\beta_{15}$  mit einer Signalreduktion um 96 % in beiden Fällen. Bei permanenter Peptidinkubation war sogar eine Überlappung der Histogramme mit dem Blank zu erkennen (15B). Die Peakmaxima befanden sich bei einem Intensitätswert von 7.600 und 7.800 entsprechend, bei 300 nM oder 1.000 nM Peptidinkubation.

Bei der Verwendung des Nab228-Fängerantikörpers lag das Maximum des Histogramms für K1 (unblockierte Oligomere) bei einem Intensitätswert von ca. 13.200 (15C + D). Die Präinkubation von 1.000 nM A $\beta_{14}$  verschob das Maximum des Histogramms auf 12.500 in Richtung Blank (15C oben links + D). Die Signalreduktion betrug hier ca. 11 % (15E). Bei dauerhaftem Verbleib von A $\beta_{14}$  wird das Histogramm gleichermaßen in Richtung Blank-Signal verschoben (15C oben rechts) und das Signal um etwa 29 % oder 38 % bei den eingesetzten Konzentrationen reduziert (15E). A $\beta_{15}$  verursacht durch die vorherige Inkubation eine Signalreduktion von 45 - 35 % und bei dauerhaftem Verbleib 59 - 83 % bei einer verwendeten Konzentration von 300 oder 1.000 nM.

Insgesamt ist auffällig, dass weniger Seeds an den Nab228-Antikörper gebunden haben als an den 6E10-Antikörper. Werden die Blank-Werte jeweils von K1 subtrahiert, erhält man Intensitätswerte von 37.000 für den 6E10-Antikörper und 7.100 für den Nab228. Der Intensitätswert des Peakmaximums der K1-Kontrolle liegt somit für den 6E10-Antikörper um ein 5,2-faches höher als bei dem Nab228-Antikörper.

 In diesem Experiment konnte der stärkste Blockierungseffekt bei der Verwendung des 6E10-Fängerantikörpers erreicht werden, sofern die Blockierungspeptide während der kompletten Assayprozedur in Lösung verblieben. Durch Aβ<sub>15</sub> konnte das Signal gegenüber unblockierten Fängerantikörper um 96% reduziert werden.

# $\label{eq:amplifikation} \begin{array}{l} \text{Amplifikation von } A\beta_{42} \text{-} \text{Seeds im sFIDA-Experiment in Anwesenheit von} \\ Blockierungspeptiden \end{array}$

Abschließend wurden beide Blockierungspeptide im sFIDA-Assay auf die Anwendbarkeit für den Amplifikationsassay getestet. Als Fängerantikörper wurde der 6E10 gewählt. Die Seeds wurden an den Fängerantikörper gebunden und anschließend wurden die nicht besetzten Antikörper mit 1 µM A $\beta_{14}$  oder A $\beta_{15}$  blockiert. 100 nM 10 % rot-markiertes Substrat wurden für die Amplifikation hinzugegeben (s. Protokoll 6.5). Die Proben wurden nach 6 und nach 21 Stunden gemessen.

In diesem Experiment wurde eine starke Zunahme des Signals mit der Zeit durch die Amplifikation der Seeds angestrebt. Die Verwendung der Blockierungspeptide mit hoher Affinität zum 6E10-Antikörper sollen nach dem oben beschriebenen Schema (s. *Strategie zur Verhinderung falsch-positiver Signale* in Abb. 11) ausschließlich richtig-positives Signal gewährleisten.



Abb. 16: Amplifikation im sFIDA unter Verwendung der Blockierungspeptide  $A\beta_{14}$  und  $A\beta_{15}$  für den 6E10-Fängerantikörper

Amplifikation der Seeds im sFIDA unter Zugabe von 1.000 nM A $\beta_{14}$  (grün) oder A $\beta_{15}$ (blau) und der Kontrolle ohne Blockierungspeptide (grau). 100 nM Substrat, davon 10 % rot markiert, wurden zu allen Proben hinzugegeben. CutOff 0,1 % der jeweiligen Kontrollen ohne Seeds des roten Fluoreszenzkanals. Messung nach 6 h = hellere Balken und nach 21 h dunklere Balken.

Die Ergebnisse zeigen keinen eindeutigen Trend im Hinblick auf stärkere Signale nach 21 h Substratinkubation im Vergleich zu 6 h. Nicht konsistente Ergebnisse zeigen sich auch bei dem Vergleich von Proben mit und ohne Blockierungspeptide. In der Probe, die beispielsweise 10 pM Seeds enthält, liegen nach 6 h Substratinkubation 540 Pixel über dem 0,1 % CutOff und nach 21 h lediglich 450 Pixel. Bei der Anwesenheit von A $\beta_{14}$  oder A $\beta_{15}$  liegen nach 6 Stunden Substratinkubation jeweils 330 bzw. 560 Pixel und nach insgesamt 21 h 600 bzw. 200 Pixel über dem CutOff (s. Abbildung 16). Ebenso sind in den Proben mit 1 pM Seeds Inkonsistenzen zu beobachten. Zusätzlich erschweren hohe Standardabweichungen der einzelnen Proben die Interpretation. • In diesem Experiment konnte die angestrebte Signalzunahme durch die Amplifikation aufgrund von inkonsistenten Ergebnissen nicht beobachtet werden, wodurch ein Effekt der Blockierungspeptide nicht zu bewerten war.

Insgesamt zeichnete sich ein durchwachsenes Bild bei der Verwendung der Blockierungspeptide ab. Starke Blockierungseffekte konnten in einem kurzen Zeitraum von wenigen Stunden erzielt werden; bei längeren Amplifikationsassays hingegen können spontan entstandene Aggregate mit polyvalenten Bindestellen kleinere Blockierungspeptide mit monovalenten Bindestellen möglicherweise verdrängen und Hintergrundrauschen verursachen.

#### 3.2.2 BSA als potenzieller Inhibitor der spontanen Aggregation

Albumine sind dafür bekannt, dass sie A $\beta$  binden können. So wurde beobachtet, dass Plasma-A $\beta$  zu 95% durch Humanes Serumalbumin (HSA) und anderen Plasmakomponente gebunden wird [34]. Ein Mechanismus für die Bindung von Bovines Serumalbumin (BSA) und A $\beta$  wurde erst kürzlich vorgeschlagen und beschreibt die Bindung von A $\beta$ durch eine sogenannte "hydrophobe Furche" des BSA [59].

Im folgenden Experiment soll untersucht werden, ob BSA ein geeigneter Regulator der kontrollierten Amplifikation sein kann. Dabei soll BSA das freie A $\beta$  aus der Lösung binden und in Anwesenheit von Seeds wieder freigeben, sodass nach dieser Hypothese die spontane Aggregation unterdrückt wird, ohne die Amplifikation zu beeinflussen.

Die spontane Aggregation und die Amplifikation wurden unter dem Einfluss von BSA getestet, indem 1  $\mu$ M Substrat entweder ohne Seeds oder mit 100 nM Seeds unter dem Einfluss verschiedener BSA-Konzentrationen aggregierten (17A+B). Als Kontrolle dienten jeweils Proben ohne BSA. Für die Ermittlung der *lag-Phase* wurde der lineare Aggregationsbereich bestimmt und eine Regressionsgerade gezogen. Der X-Achsenschnittpunkt wurde bei Y = 1 als *lag-Phase* definiert. Für die Proben ohne BSA lag das lineare Zeitfenster für die spontane Aggregation und Amplifikation zwischen 4 und 6 Stunden und für die Proben mit BSA zwischen 6 und 10 Stunden (17A+B).

In den Proben ohne BSA war die spontane Aggregation nach 3,7 Stunden und die Amplifikation nach 3,4 Stunden messbar. Die Plateaus wurden in beiden Fällen nach 17 Stunden erreicht. Die einzelnen Aggregationskuven wurden für die Vergleichbarkeit durch den jeweiligen Minimalwert dividiert, wobei die Werte der ersten anderthalb Stunden aufgrund erhöhten Rauschens durch die ThT-Temperatursensitivität ausgeschlossen wurden. Das normalisierte ThT-Fluoreszenzsignal betrug jeweils bei der spontanen Aggregation und der Amplifikation ohne BSA ca. 1,7 (17A+B).



Abb. 17: Einfluss von BSA bei der Amplifikation

Aggregationsverlauf der (A) spontanen Aggregation von 1 µM A $\beta_{42}$ -Substrat oder (B) der Amplifikation durch Zugabe von 100 nM Seeds in PBS bei RT. Zugabe verschiedener BSA-Konzentrationen von 0,13 - 1% im Farbgradienten blau (0% BSA) bis braun (1% BSA) dargestellt. Jede Aggregationskurve wurde durch ihren minimalen Wert dividiert, nachdem die ersten 1,5 h aufgrund der ThT-Temperatursensitivität abgeschnitten wurden. Replikatanzahl n = 2. (C) AFM-Bilder der Proben mit 100 nM Seeds oder ohne Seeds  $\pm 1\%$  BSA. (D) Amplifikation von 1 - 1.000 fM A $\beta_{42}$ -Seeds im sFIDA mit 100 nM 10% HiLyte647-A $\beta_{42}$ -Substrat  $\pm 0,1\%$  BSA. Als Fängerantikörper wurde der 6E10 verwendet. CutOff 0,5% der Kontrollen ohne Seeds im roten Fluoreszenzkanal. Die Amplifikation erfolgte für 20 h bei RT. Die Zugabe von BSA zeigte insgesamt einen deutlichen inhibierenden Einfluss mit steigender Konzentration. Unabhängig von der Zugabe von Seeds sank die ThT-Fluoreszenz nach 17 Stunden Aggregation von 1,7 ohne die Zugabe von BSA auf ca. 1,5 bei 0,13 % BSA und ca. 1,1 bei 1 % BSA. Das Plateau wurde bei der höchsten BSA-Konzentration nach 17 Stunden noch nicht erreicht (17A+B). Die *lag-Phase* verschob sich bei der Amplifikation durch die Zugabe von 0,13 % BSA um 0,3 Stunden auf 3,7 Stunden und um weitere 0,3 Stunden auf 4 Stunden, wenn 0,25 % BSA hinzugefügt wurde (17B). Bei der spontanen Aggregation ist der Sprung deutlicher, da die Zugabe von 0,13 % BSA die *lag-Phase* um 2,1 Stunden auf 5,8 Stunden verzögerte (17A) und auch die Zugabe von 0,25 % BSA verzögerte die *lag-Phase* um insgesamt 1,8 Stunden (s. Abb. 17A). AFM-Bilder zeigen, dass in den Proben ohne BSA in Anwesenheit von Seeds viele Oligomere mit einer Höhe von etwa 1,5 nm zu finden waren, aber auch in der Probe ohne Seeds waren spontan entstandene Aggregate sichtbar (17C). Insgesamt sind in diesen Proben weniger Oligomere zu sehen, wenn 1 % BSA hinzugegeben wurde, dennoch konnte gezeigt werden, dass die spontane Aggregation nicht vollkommen unterdrückt werden konnte.

Basierend auf diesen Ergebnissen, die herausstellten, dass die spontane Aggregation durch BSA inhibiert werden kann, aber die gezielte Amplifikation ebenfalls in einem geringeren Ausmaß inhibiert wird, wurde die Anwendung von 0,1% BSA im sFIDA untersucht. Dazu wurden die Seeds an den Fängerantikörper gebunden und anschließend mit 10 nM 10 % rot-markiertem Substrat inkubiert (s. Protokoll in Tab. 6.6).

Entgegen den Erwartungen lassen sich die Signale in den Proben mit Seeds nicht durch Amplifikation von der Kontrolle ohne Seeds unterscheiden (Abb. 17D). Bei einer Seedkonzentration von 1 fM und 1.000 fM lagen die Signale zwar höher als in der Kontrolle, allerdings sind diese Ergebnisse in Hinblick auf die Seedkonzentratiosnreihe von 1 - 1.000 fM als vermutliche "Ausreißer" zu bewerten. Zum einen sind die Standardabweichungen recht groß in diesen Proben und zum anderen lassen sich die Signale bezüglich der Seedkonzentrationen nicht in eine Konzentrationsreihe einordnen. Die Signale in den Proben mit 10 und 100 fM Seeds waren nicht stärker als in der Kontrolle und lagen unterhalb der Signale, die 1 fM oder 1.000 fM Seeds durch Amplifikation erzeugten. Die Ergebnisse ließen darauf schließen, dass das HiLyte647-A $\beta_{42}$ -Substrat durch die Bindung an die freien Fängerantikörper derart hohes Hintergrundrauschen erzeugte, dass das Signal-Rausch-Verhältnis sehr klein wurde.

Auch die Zugabe von BSA erzielte nicht den erstrebten Effekt der kontrollierten Amplifikation mit gleichzeitiger Unterdrückung der spontanen Aggregation (Abb. 17D).

Das eingesetzte BSA wirkte sich möglicherweise im sFIDA-Assay entweder zu stark inhibierend auf die Amplifikation aus oder das Substrat konnte trotz der Verwendung von BSA an die Fängerantikörper binden und verursachte dadurch ein geringes Signal-Rausch-Verhältnis.  In diesen Experimenten sollte BSA als Aβ-bindendes Protein zur Regulierung der Amplifikation verwendet werden. Durch BSA konnte die spontane Aggregation stark unterdrückt werden, allerdings wurde auch die Amplifikation inhibiert, sodass BSA als Regulator zur kontrollierten Amplifikation nicht eingesetzt werden kann.

Die getesteten Strategien zur Verhinderung von falsch-positiven Signalen, die die Einführung der Blockierungspeptide  $A\beta_{14}$  oder  $A\beta_{15}$  oder die Verwendung von BSA als Regulator der Amplfikation beinhalteten, werden aufgrund mangelnder Wirksamkeit nicht weiter angewandt. Die Entwicklung neuer Strategien ist in den nachstehenden Experimenten erforderlich.

### 3.2.3 Minimierung von falsch-positiven Signalen durch die Verwendung von Substrat, das nicht an die Fängerantikörper binden kann

Da die Blockierungspeptide  $A\beta_{14}$  und  $A\beta_{15}$  die freien Antikörper nicht effektiv blockieren konnten, soll eine entgegengesetzte Strategie entwickelt werden, um falsch-positives Signal zu verhindern. In den folgenden Versuchen diente die N-terminal trunkierte A $\beta$ -Variante A $\beta_{11-42}$  als Substrat für die Amplifikation der A $\beta_{42}$ -Seeds. Bei dieser Variante fehlen die Aminosäuren, die das Epitop für die hier verwendeten Fängerantikörper bilden (s. Abbildung 18).



Abb. 18: Einführung des N-terminal trunkierten A<br/>  $\beta_{11\text{-}42}$ als potenzielles Substrat

Fängerantikörper, die das N-terminale Ende der A $\beta_{42}$ -Proteine binden. Entfernung des N-Terminus verhindert die Bindung des trunkierten Substrats A $\beta_{11-42}$ .

Folgende Kriterien mussten zunächst erfüllt sein, damit das  $A\beta_{11-42}$  als geeignetes Substrat für die Amplifikation im sFIDA getestet werden sollte:

- keine Bindung an den Fängerantikörper
- Aggregationsfähigkeit
- Ko-Aggregation mit Aβ<sub>42</sub>

Mithilfe einer Dot-Blot-Analyse wurden verschiedene Konzentrationen von  $A\beta_{11-42}$  und  $A\beta_{42}$  auf eine Membran aufgetragen und überprüft, ob die Fängerantikörper Nab228 und 6E10 den Analyten binden können. Der Nab228 oder 6E10 wurden hierfür als Primärantikörper verwendet und ein weiterer Antikörper mit einer Meerrettichperoxidase-Kopplung wurde gegen die beiden Primärantikörper eingesetzt, sodass bei erfolgreicher Bindung der Nachweis über Chemilumineszenz erfolgen konnte.

Wie zu erwarten, konnten beide Antikörper den A $\beta_{42}$ -Analyten binden, wohingegen bei A $\beta_{11-42}$  wie erwartet keine Bindung nachgewiesen wurde (19A).

Im Folgeversuch wurde die Fängerantikörper-unabhängige Bindung des 6E10-Antikörpers auch im sFIDA untersucht (Abb. 19D, Protokoll s. 6.7). Dazu wurden einige Plattenvertiefungen mit Fängerantikörper beschichtet und einige Vertiefungen nicht mit Antikörper versetzt. Anschließend wurden hohe Analytkonzentrationen von 100 oder 1.000 nM  $A\beta_{11-42}$  inkubiert sowie jeweils eine Kontrolle ohne  $A\beta_{11-42}$ . Die Detektion erfolgte über einen mit dem Fluorochrom CF488A konjugiertem 4G8-Antikörper, der das Epitop im Bereich der Aminosäuren 17-24 bindet. Der CutOff wurde anhand 0,1% der hellsten Pixel der Kontrolle mit Fängerantikörper und ohne Analyten im grünen Fluoreszenzkanal bestimmt. Insgesamt sind die Signale in den Proben und in der Kontrolle mit Fängerantikörper höher als in den Proben bzw. in der Kontrolle ohne Fängerantikörper. Im Durchschnitt liegt das Signal unter Verwendung des Fängerantikörpers  $2,39x \pm 0.77$  höher als in den Proben ohne Fängerantikörper. Dennoch unterscheidet sich das Signal in den Proben mit  $A\beta_{11-42}$  nicht signifikant<sup>4</sup> voneinander innerhalb einer verwendeten  $A\beta_{11-42}$ -Konzentration (19B), weshalb das Signal nicht auf die Fängerantikörper-Aβ<sub>11-42</sub>-Spezifität zurückzuführen ist. Als Referenz dienten 100 nM A $\beta_{42}$ -Oligomere, die durch eine spezifische Fängerantikörper-Bindung ein 57-fach stärkeres Signal erzeugten, als  $100 \text{ nM A}\beta_{11-42}$ in Anwesenheit des 6E10-Antikörpers. Die spezifische Fängerantikörper-Bindung von A $\beta_{42}$ wurde zuvor in unabhängigen Experimenten belegt (Daten nicht gezeigt).

Das erste Kriterium, das keine Bindung des potenziellen  $A\beta_{11-42}$ -Substrats an die Fängerantikörper nachweisen konnte, wurde durch eine Dot-Blot-Analyse und ein sFIDA-Experiment belegt (Abb. 19A+B).


Abb. 19: Kriterien des A $\beta_{11-42}$ -Substrats

(A) Dot-Blot zur Überprüfung der Bindung von A $\beta_{11-42}$  oder A $\beta_{42}$  an die Antikörper Nab228 oder 6E10. (B) Fängerantikörperkontrollen im sFIDA-Assay mit A $\beta_{11-42}$  als Analyten. Die Referenz zeigt 100 nM A $\beta_{42}$ -Oligomere (Balken mit Punktmuster). Detektion durch einen 4G8-CF488A-Antikörper. (C) Aggregationsverlauf der spontanen Aggregation von A $\beta_{11-42}$  und (D) Amplifikation mit A $\beta_{42}$ -Seeds in PBS bei 37°C. In (E) befinden sich die Puffer- und Seedkontrollen ohne Substrat. Replikatanzahl n = 2 oder n = 3 (Mittelwert + Standardabweichung). Des Weiteren wurde durch die Beobachtung des Aggregationsverlaufs mittels ThT-Fluoreszenzfarbstoff überprüft, ob A $\beta_{11-42}$  aggregationsfähig ist. Eine Konzentration von 5 µM oder 1 µM Substrat wurden dazu aggregiert. Die Messung erfolgte in Duplikaten. In beiden Aggregationskurven mit 5 µM Substrat wurde ein Anstieg der ThT-Fluoreszenz mit einer *lag-Phase* von weniger als einer Stunde beobachtet (Abb. 19C). Das Plateau wurde nach 2-2,5 Stunden erreicht, wohingegen ein Anstieg des ThT-Signals in der Konzentration von 1 µM nur in einem Fall nach etwa vier Stunden beobachtet wurde. Das Plateau wurde ca. 2,5 Stunden später erreicht (Abb. 19C). Die zweite Aggregationskurve zeigte während der gesamten Messdauer von 20 Stunden (hier nur das Zeitfenster bis 10 h gezeigt) keine Aggregation. Insgesamt wurde das zweite Kriterium, das die Fähigkeit zur Selbstaggregation beinhaltete, mithilfe des Aggregationsexperiments ebenfalls nachgewiesen.

Das dritte Kriterium umfasste die Amplifikation von  $A\beta_{42}$ -Seeds und wurde in einem weiteren Aggregationsexperiment nachgewiesen. Substratkonzentrationen von 5 oder 1 µM wurden mit 10 oder 100 nM  $A\beta_{42}$ -Seeds inkubiert (s. Abb. 19D). Die Messung erfolgte in Triplikaten. In allen Fällen war ein sofortiger Anstieg des ThT-Fluoreszenzsignals zum Zeitpunkt 0 zu erkennen, wodurch ein Unterschied in der *lag-Phase* nicht zu bestimmen war. Jedoch wurde das Plateau mit der höchsten Substrat- und Seedkonzentration am ehesten nach etwa 30 Minuten erreicht, gefolgt von der höchsten Substratkonzentration mit 10 nM Seeds nach etwa anderthalb Stunden. Die Proben mit 1 µM Substrat erreichten das Plateau unabhängig von den hier verwendeten Seedkonzentrationen nach ca. 2 Stunden. Bei dem Vergleich aller Proben mit einer Substratkonzentration von 1 µM ist auffällig, dass bei der Anwesenheit von Seeds in jedem Fall Aggregation/Amplifikation stattfand, wohingegen in den Proben ohne Seeds die Aggregation nur in einem von zwei getesteten Proben und mit deutlich zeitlicher Verzögerung stattgefunden hat.

 In diesen Vorexperimenten konnten die gesetzten Kriterien für das N-terminal trunkierte Aβ<sub>11-42</sub> (keine Bindung an den Fängerantikörper, Aggregationsfähigkeit des Aβ<sub>11-42</sub>-Peptids und Fähigkeit zur Ko-Aggregation mit Aβ<sub>42</sub>) erfüllt werden, weshalb es für die weiteren Experimente als Substrat verwendet werden kann.

#### $A\beta_{11-42}$ als Substrat für die Amplifikation von $A\beta_{42}$ -Seeds im sFIDA

Nachdem A $\beta_{11-42}$  die Kriterien für eine erfolgreiche Amplifikation der A $\beta_{42}$ -Seeds erfüllen konnte, wurde das Substrat in einem sFIDA-Assay im Hinblick auf eine Verstärkung des Signals durch die Amplifikation der Seeds im Vergleich zu nicht-amplifizierten Seeds getestet.

Dafür wurden 10 % rot-markierte A $\beta_{42}$ -Seeds an den Fängerantikörper gebunden und anschließend mit 100 oder 1.000 nM A $\beta_{11-42}$ -Substrat inkubiert (s. Abb. 20A und Protokoll 6.7). Um die Verstärkung des Signals durch die Amplifikation zu quantifizieren, wurde als Kontrolle eine Seedkonzentrationsreihe ohne Substratzugabe mitgeführt. Zusätzliche diente eine Fängerantikörperkontrolle (ohne Fängerantikörper und Seeds, ggfs. mit Substrat), um die spezifische A $\beta_{11-42}$ -Fängerantikörper-Bindung auszuschließen und um die Wechselwirkung des A $\beta_{11-42}$  mit der Glasoberfläche zu analysieren.

In Abbildung 20B sind die Signale der rot-markierten Seeds dargestellt, die zusätzlich mit dem CF488A-4G8-Antikörper detektiert wurden. Im roten Fluoreszenzkanal waren alle Signale der Proben, die Seeds enthielten, erwartungsgemäß stärker als die Signale der Kontrolle ohne Seeds (Abb. 20B). Im grünen Fluoreszenzkanal lagen die Signale ebenfalls ab einer Seedkonzentrationen von 10 pM über dem Signal der Kontrolle (Abb. 20B). Die Signale nahmen mit zunehmender Seedkonzentration erwartungsgemäß zu. Die Bildung der Ko-Lokalisation der Signale kann die Sensitivität und Spezifität erhöhen, indem der durch unspezifische Bindungen verursachte Hintergrund eliminiert wird, da lediglich im Falle einer Übereinstimmung des Signals – in diesem Experiment der Fluorochrom-konjugierten Seeds und Detektionsantikörper – das Signal gewertet wird. Durch die Bildung der Ko-Lokalisation konnten die Seeds ab einer Konzentration von 10 pM von der Kontrolle ohne Seeds unterschieden werden. Das Signal war in dieser Probe 6-mal stärker als in der Kontrolle ohne Seeds (20B).

Eine sensitivere Detektion geringerer Seedkonzentrationen wird durch die Amplifikation und die dadurch resultierende Verstärkung des Signals angestrebt. Dazu wurden 100 oder 1.000 nM A $\beta_{11-42}$ -Substrat für die Amplifikation der A $\beta_{42}$ -Seeds hinzugegeben.

Die Zugabe von sowohl 1.000 nM als auch 100 nM Substrat führten zu einer Zunahme des Signals im grünen Fluoreszenzkanal gegenüber den Kontrollen ohne Substrat, mit Ausnahme bei den höher eingesetzten Seedkonzentrationen von 100 und 500 nM, die sich bereits im Bereich der Signalsättigung befanden. Entgegen den Erwartungen stieg zudem das Signal besonders in den Substratkontrollen, die keine Seeds aber Substrat beinhalteten, in der durch die verhinderte Fängerantikörper-Substrat-Interaktion keine Signalzunahme zu erwarten wäre (20C). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass das A $\beta_{11-42}$ -Substrat unspezifisch mit der Glasoberfläche interagierte und dieser Effekt womöglich eine Signalsteigerung durch die Amplifikation überlagerte. Dadurch wurden keine steigenden Signale mit steigender Seedkonzentration beobachtet (20B), wie bei der Kontrolle (20A), in der eine Konzentrationsabhängigkeit der Seeds ohne Substrat anhand der gemessenen Signale festgestellt werden konnte.

Eine unspezifische  $A\beta_{11-42}$ -Oberflächenwechselwirkung wurde durch die Fängerantikörper-Kontrollen bestätigt, da in diesen Proben das Signal ebenfalls durch die Zugabe des Substrats Fängerantikörper-unabhängig stieg. Die Signale, die durch die Substrat-Oberflächen-Interaktion erzeugt wurden, unterschieden sich durch die Verwendung eines Fängerantikörpers nicht signifikant, wie bereits im vorherigen Experiment in Abbildung 19B gezeigt wurde<sup>5</sup>.

Beispielbilder aller Kontrollen ohne Seeds verdeutlichen die A $\beta_{11-42}$ -Bindung an der Glasoberfläche mit und ohne Fängerantikörper (s. Abbildung 20D). In den Proben ohne Substrat waren keine Partikel zu erkennen, wohingegen bei steigender A $\beta_{11-42}$ -Konzentration die Partikelanzahl zunahm (s. Abbildung 20D).

In den Balkendiagrammen der ko-lokalisierten Signale ist das Signal der Kontrollen ohne Substrat das maximale Signal, das technisch bedingt durch den Aufbau des Experiments angestrebt werden kann. Das Signal der rot-markierten Seeds war für das ko-lokalisierte Signal in diesem Fall limitierend.

Aus diesem Experiment ging hervor, dass ab einer eingesetzten Konzentration von 10 pM Seeds, durch die Zugabe von 1.000 nM A $\beta_{11-42}$  dasselbe Signal wie in der Kontrolle ohne Substrat erreicht wurde (20C). Bei den darunterliegenden Seedkonzentrationen, einschließlich der Kontrolle ohne Seeds, stieg das ko-lokalisierte Signal durch das Substrat. In diesem Fall handelte es sich möglicherweise um zufällige ko-lokalisierte Pixel, da die Wahrscheinlichkeit von zufälligen ko-lokalisierten Ereignissen zwischen Hintergrund und detektiertem Substrat mit steigender Substratkonzentration größer wird. Die Verwendung von 100 nM Substrat verursacht in den Proben mit 10 pM - 10 nM Seeds ein schwächeres Signal als das Signal der entsprechenden nicht-amplifizierten Seeds und wies darauf hin, dass 100 nM Substrat nicht ausreichend für die Amplifikation der A $\beta_{42}$ -Seeds sind. Eine andere Interpretation der Daten würde auf die bevorzugte Interaktion des Substrats mit der Glasoberfläche anstelle der Anplifikation der A $\beta_{42}$ -Seeds schließen.

Die Bestimmung des CutOffs anhand der Kontrolle ohne Seeds der jeweiligen Seed-Konzentrationsreihe eliminiert den Betrag des unspezifisch-verursachten Signals durch das  $A\beta_{11-42}$ -Substrat, sodass ausschließlich das Signal gewertet wird, das über das unspezifische Signal hinausgeht. Eine systematische Reduktion des Signals ist dadurch mit zunehmender Substratkonzentration zu beobachten (s. Anhang 39).

Durch die vermehrte unspezifische Interaktion des Substrats mit der Glasoberfläche erhöhte sich der Intensitätswert des CutOffs, sodass insgesamt weniger Pixel über dem CutOff detektiert werden konnten, als bei einem niedrigerem CutOff-Wert wie z. B. bei der Kontrolle ohne Substrat. Die Werte des CutOffs betrugen 5.934 für die Kontrolle ohne Substrat und 9.162 bzw. 34.106 für die Substratkontrollen mit 100 nM oder 1.000 nM Substrat.

 Insgesamt wurde durch dieses Experiment deutlich, dass die unspezifische Aβ<sub>11-42</sub>-Oberflächen-Interaktion störende Signale verursachte, die möglicherweise den Effekt einer Amplifikation überdeckten. Ob die Substratinkubation zu einer Amplifikation der Seeds führte, ging aus diesem Experiment daher leider nicht hervor.

 $<sup>^5\</sup>mathrm{Für}$  die Fängerantikörper-Kontrollen wurde derselbe Datensatz wie in Abbildung 19B verwendet



Abb. 20: Amplifikation von A $\beta_{42}$ -Seeds mittels A $\beta_{11-42}$ -Substrat im sFIDA

(A) Schematischer Aufbau der Amplifikation durch  $A\beta_{11-42}$ . 10% rot-markierte Seeds werden an den Fängerantikörper gebunden und anschließend mit Substrat für 24 h bei RT inkubiert. Die Detektion erfolgte durch CF488A-konjugierte 4G8-Antikörper. Die Kontrolle mit oder ohne Seeds wird ohne Substrat inkubiert und die Substratkontrolle enthält nur das Substrat ohne Seeds. (B) Balkendiagramme einer Konzentrationsreihe der rot-markierten Seeds ohne Substrat. FK = Fängerantikörperkontrolle ohne Fängerantikörper und ohne Seeds. Pixelanzahl des roten und grünen Fluoreszenzkanals und der ko-lokalisierten Pixel. Das Signal des roten Fluoreszenzkanals wurde durch die HiLyte647-konjugierten Seeds erzeugt; das Signal des grünen Fluoreszenzkanals erfolgte durch einen CF488A-konjugierten 4G8-Antikörper. Die Ko-Lokalisation wurde durch die Überlagerung der Signale aus beiden Fluoreszenzkanälen generiert. CutOff = 0,1% der Kontrolle ohne Seeds und ohne Substrat. (C) Vergleich der Seed-Konzentrationsreihe mit der Amplifikation der Seeds durch 100 oder 1.000 nM A $\beta_{11-42}$ -Substrat. Signalunterschiede sind durch Balkendiagramme des grünen Fluoreszenzkanals und der Ko-Lokalisation dargestellt. (D) Beispielbilder des grünen Fluoreszenzkanals der Kontrollen ohne Seeds  $\pm$  Fängerantikörper.

51

### Überprüfung verschiedener Blockierlösungen für eine effektive Blockierung der Glasoberfläche zur Verhinderung der unspezifischen Aβ<sub>11-42</sub>-Bindung

Aufgrund der unspezifischen Oberflächenwechselwirkungen des A<sub>β11-42</sub>-Substrats soll eine geeignete Blockierlösung für eine effektive Oberflächenblockierung gefunden werden. In den bisherigen Experimenten wurde dazu 0.5% BSA verwendet. Im Folgeexperiment wurden neben weiteren BSA-Konzentrationen auch die für sämtliche Methoden verwendete konventionelle Blockierlösung *Milchpulver* in verschiedenen Konzentrationen getestet. Außerdem wurden die kommerziell erwerblichen Lösungen The Blocking Solution, Smart-Block und Liquid Plate Sealer (CANDOR Bioscience) getestet. The Blocking Solution ist eine Casein-basierte Lösung. Caseine sind in Milch vorkommende Proteine mit einem Molekulargewicht von 20-25 kDa. Durch ihre relativ kleine Größe können sie schneller und tiefreichender durch das molekulare Netz aus Fängerantikörper zur unbesetzten Glasfläche diffundieren und diese blockieren. SmartBlock ist ein BSA-freier Peptid-basierter Blockierer und besitzt ebenso den Vorteil kleinerer Moleküle die Glasoberflächen gründlich zu blockieren. Aufgrund der bekannten Interaktion von A $\beta$  und BSA (s. Kapitel 3.2.2) wurde SmartBlock als BSA-freie Alternative gewählt. Liquid Plate Sealer dient zur Versiegelung von Antikörper-beschichteten Oberflächen für die Langzeitlagerung und wurde im folgenden Experiment unter der Annahme verwendet, dass eine versiegelte Oberfläche der blockierten Oberfläche gleichgestellt ist. Für das Protokoll s. Tab6.8.

Der Assayschritt, in der die Blockierlösung im sFIDA hinzugegeben wird, erfolgt immer nach der Fängerantikörperinkubation, um die freien Stellen der Glasoberfläche zu blockieren. In diesem Experiment wurden anschließend 1  $\mu$ M A $\beta_{11-42}$ -Oligomere hinzugegeben, um die unspezifische Substrat-Oberflächenwechselwirkung zu untersuchen (Abb. 21A). Eine entsprechende Kontrolle ohne Oligomere wurde für jede unterschiedlich blockierte Oberfläche mitgeführt, um den Einfluss der Blockierlösungen auf das Hintergrundrauschen zu ermitteln (Abb. 21A). In weiteren Kontrollen wurden anstelle der Blockierlösung Puffer aufgetragen, um das Hintergrundrauschen der reinen Detektionsantikörper-Oberflächen-Interaktion oder Oligomer-Oberflächen-Interaktion zu ermitteln (Abb. 21A).

Die Balkendiagramme in Abbildung 21 verdeutlichen, dass alle getesteten Blockierlösungen, ausschließlich SmartBlock und Liquid Plate Sealer, das Hintergrundrauschen reduzieren konnten. Die Effektivität von Milchpulver unterschied sich in den drei verwendeten Konzentrationen von 1 %, 3 % oder 5 % nicht voneinander und reduzierte den Hintergrund im Mittel um 85 % verglichen mit der unblockierten Oberfläche. Die Pixelanzahl über einem CutOff von 0,1 % betrug  $39 \pm 0,7$  Pixeln gegenüber 261 Pixeln pro aufgenommenes Bild (21A). Mit einer Hintergrundreduktion von 86 % oder 84 % erreichen 1 % BSA oder The Blocking Solution eine ähnliche Effektivität. SmartBlock oder Liquid Plate Sealer eignen sich durch mangelnde Effektivität nicht zur Hintergrundreduktion.



Abb. 21: Untersuchung verschiedener Blockierlösung zur effektiven Oberflächenblockierung gegen  $A\beta_{11-42}$ 

(A) Schematische Darstellung der Inkubation verschiedener Blockierungsreagenzien auf der Fängerantikörper-beschichteten Oberfläche. Zugabe von Oligomeren als Simulation spontan entstandener Aggregate. Der Detektionsantikörper bindet unspezifisch-gebundene Oligomere (+ Oligomere) an der Oberfläche oder verursacht selbst unspezifische Interaktionen (Kontrolle) (s. Def. Hintergrund in Tab. 2). Weitere Kontrollen auf der unblockierten Oberfläche. (B) Eine Konzentration von 1 µM Oligomeren wurde für 1 h inkubiert und anschließend mittels CF488A-konjugiertem 4G8-Antikörper detektiert (grüne Balken). Die Kontrolle ohne Oligomerinkubation ist in grauen Balken dargestellt. Die Pixelanzahl wurde bei einem CutOff von 0,1% der Kontrolle ohne Blockierlösung und ohne Oligomere bestimmt. (C) Signalreduktion durch die Verwendung der Blockierlösungen bezüglich der unblockierten sFIDA-Oberfläche in %. Das unspezifische Signal der Proben auf der blockierten Oberfläche wurde jeweils mit dem unspezifischen Signal der Probe auf der unblockierten Oberfläche ins Verhältnis gesetzt.

Da das  $A\beta_{11-42}$ -Peptid nicht spezifisch an den Fängerantikörper binden kann, wurde der Fokus bei der Analyse auf die maximale Reduktion des Hintergrundrauschens gelegt. Eine Spezifitätsanalyse, bei der das maximale Signal-Rausch-Verhältnis angestrebt wird, war daher nicht erforderlich. Bezüglich der Blockierungseffektivität in Anwesenheit von 1 µM A $\beta_{11-42}$ -Oligomeren konnte die stärkste Signalreduktion durch die Milchpulverlösungen erreicht werden, die das Signal aus Hintergrund und unspezifischer A $\beta_{11-42}$ -Bindungen um 81 - 88 % reduzierten (21B+C). Die kommerziellen Blockierlösungen hingegen schnitten im Vergleich zu Milchpulver und BSA am ineffektivsten ab (21B+C). Das Signal, das hauptsächlich durch die unspezifische A $\beta_{11-42}$ -Oligomer -Oberflächen -Interaktion erzeugt wurde, konnte durch die kommerziell erhältlichen Blockierlösungen nur um maximal 43 % reduziert werden im Vergleich zur unblockierten Oberfläche.

• Aufgrund der effektiven Oberflächenblockierung durch die Milchpulverlösungen wurde eine 5%-ige Lösung für die Oberflächenblockierung im folgenden sFIDA-Amplifikationsexperiment verwendet.

## Reduktion des unspezifisch-erzeugten Signals durch eine effektive Oberflächenblockierung für die Bewertung des Amplifikationseffekts auf die Signalsteigerung gegenüber nicht-amplifizierten Proben

Durch unspezifisch-erzeugtes Signal beziehungsweise durch erhöhtes Hintergrundrauschen konnte der Effekt der Amplifikation auf die Signalgewinnung durch eine Vergrößerung der Seedoberfläche oder der Anzahl der Epitope bisher nicht ermittelt werden (s. Kapitel 3.2.3,  $A\beta_{11-42}$  als Substrat für die Amplifikation von  $A\beta_{42}$ -Seeds im sFIDA, S. 34).

Daher soll der Einfluss einer 5 %-igen Milchpulverlösung im Vergleich zu der bisherigen verwendeten 0,5 %-igen BSA-Lösung auf die Hintergrundreduzierung und die daraus resultierende Signalsteigerung durch die Amplifikation geprüft werden.

Im nachstehenden Experiment wurden 10% rot-markierte A $\beta_{42}$ -Seeds auf die Fängerantikörperbeschichtete und BSA- oder Milchpulver-blockierte Oberfläche inkubiert (22A). Das Signal der Seedkonzentratiosnreihe ist in Abbildung 22B dargestellt. Die Zugabe von grünmarkiertem Substrat hat keinen Einfluss auf das Signal der rot-markierten Seeds, da allenfalls marginale Unterschiede zwischen der Kontrolle und den Seeds mit Substratinkbation zu erkennen sind (22B).

Für die Bewertung der Amplifikation wurden aufgrund der Verwendung von HiLyte488konjugiertem Substrat die Signale des grünen Fluoreszenzkanals analysiert (22C). Erwartet wurde eine Zunahme des Signals mit steigender Seedkonzentration in amplifizierten Proben. In den Kontrollproben ohne Substratinkubation war hingegen kein Signal zu erwarten, da diese nicht detektiert wurden. Das analysierte Signal wird in diesem Fall ausschließlich als Hintergrundrauschen interpretiert (22C).



Abb. 22: Amplifikation auf der mit BSA- oder Milchpulver-blockierten sFIDA-Oberfläche

(A) Schematische Abbildung der Amplifikation rot-markierter  $A\beta_{42}$ -Seeds durch grünmarkiertes  $A\beta_{11-42}$ -Substrat. (B) Balkendiagramme der Pixelanzahl im roten Fluoreszenzkanal 10 % HiLyte647-konjugierter Seeds in Abwesenheit von Substrat (=Kontrolle) oder in Anwesenheit von 100 nM 10 % HiLyte488-konjugiertem  $A\beta_{11-42}$ -Substrat (dunklere Balken). Die Oberfläche wurde mit einer 0,5 %-igen BSA-Lösung blockiert. CutOff = 0,1 % der Kontrolle ohne Seeds und ohne Substrat. (C) Balkendiagramme der Seedkonzentrationsreihen auf einer (links) 0,5 %-igen BSA- oder (rechts) 5 %-igen Milchpulverlösungblockierten sFIDA-Oberfläche. Die Proben wurden zusätzlich mit 100 nM 10 % grünkonjugiertem  $A\beta_{11-42}$ -Substrat inkubiert (dunklere Balken). CutOff = 0,1 % der Kontrolle ohne Seeds und ohne Substrat. (D) Beispielbilder des roten und grünen Fluoreszenzkanals der Proben mit 10 nM Seeds und 100 nM Substrat. Beispiele für die jeweils unterschiedlich blockierten Oberflächen. Die Ergebnisse zeigten anders als erstrebt, dass durch die Amplifikation keine Signalsteigerung erzielt werden konnte. Obwohl das Signal der Proben in Anwesenheit von Substrat auf der BSA-blockierten Oberfläche mit zunehmender Seedkonzentration tendenziell stieg, befanden sich die Signale bei einem CutOff von 0,1 % zwischen 158 und 348 Pixeln in derselben Größenordnung, obwohl die verwendeten Seedkonzentrationen von 10-10.000 pM vier Größenordnungen umfasste (22C). Solange das verwendete Substrat nicht vollständig für die Amplifikation aufgebraucht wird, ist eine lineare Abhängigkeit im Signal der Seedkonzentrationen bei linearer Verdünnung zu erwarten. Für den Fall, dass das Substrat in Anwesenheit von Seeds vollständig für die Amplifikation aufgebraucht wird und keine unspezifischen Wechselwirkungen zwischen Substrat und Oberfläche entstehen, ist von einer gleichmäßigen Signalsteigerung im Vergleich zu einer Kontrolle ohne Seeds, in allen Proben und unabhängig von der Seedkonzentration, auszugehen. Hinsichtlich des schwach zunehmenden Signals bei steigender Seedkonzentration war keine der beiden Annahmen zutreffend.

Auch auf der mit Milchpulver-blockierten Oberfläche stieg die Pixelanzahl im grünen Fluoreszenzkanal tendenziell mit zunehmender Seedkonzentration innerhalb einer Größenordnung von 10-31 Pixeln, obwohl die verwendeten Seedkonzentrationen ebenfalls vier Größenordnungen umfassten. Die entsprechende Kontrolle ohne Seeds wies aber das stärkste Signal auf, weshalb eine Signalzunahme mit zunehmender Seedkonzentration nicht durch einen Amplifikationseffekt begründet werden konnte. Im Vergleich zu den Kontrollen ohne Substratinkubation lagen hier sogar alle Signale deutlich unterhalb des Hintergrundrauschens der Proben ohne Substrat (22C).

Die Beispielbilder aus dem roten und dem grünen Fluoreszenzkanal der Proben mit 10 % rot-markierten Seeds und 100 nM 10 % grün-markiertem Substrat lassen viele Seeds im roten Kanal erkennen, wohingegen im grünen Kanal keine Strukturen zu erkennen sind (22D). Das Ziel des Experiments war die Beurteilung der Signalsteigerung durch die Amplifikation und die Minimierung der unspezifischen A $\beta_{11-42}$ -Oberflächenwechselwirkung, doch die Mikroskopiebilder weisen eindeutig darauf hin, dass keine Amplifikation durch das A $\beta_{11-42}$ -Substrat stattgefunden hat. Mögliche Gründe hierfür sind beispielsweise, dass der an den Fängerantikörper gebundene Seed sterisch schwer zugänglich ist oder dass die Lösungsbedingungen für die Amplifikation nicht optimal sind.

 In diesem Experiment sollte eine Oberflächenblockierung zur Minimierung des Hintergrundrauschens und dadurch zu einer Steigerung des Signal-Rausch-Verhältnis durch Amplifikation führen. In den Fluoreszenzaufnahmen wurde möglicherweise durch sterische Unzugänglichkeit der Seeds kein Amplifikationseffekt beobachtet.

# Amplifikation der A $\beta_{42}$ -Seeds durch A $\beta_{11-42}$ -Substrat in Lösung und anschließender sFIDA-Assay

Da die an den Fängerantikörper gebundenen Seeds womöglich sterisch für die Zugänglichkeit des Substrats benachteiligt sind, wurden die Seeds im folgenden Experiment zunächst in der Lösung amplifiziert und anschließend im sFIDA-Experiment auf der Fängerantikörper-beschichteten Oberfläche inkubiert (23A). Dass A $\beta_{11-42}$  und A $\beta_{42}$  ko-aggregieren können, wurde bereits in Aggregationsexperimenten nachgewiesen (s. Kapitel 3.2.3). Obwohl das gewählte A $\beta_{11-42}$ -Substrat nicht an den Fängerantikörper binden kann, könnte die anschließende Bindung der amplifizierten Seeds durch die Epitope der ursprünglichen A $\beta_{42}$ -Seeds erfolgten. Angestrebt wurde dabei eine starke Amplifikation, die das unspezifisch erzeugte Signal der A $\beta_{11-42}$ -Oberflächenwechselwirkung überschreitet.

Die Seeds wurden mit rot-markiertem  $A\beta_{42}$  hergestellt und die Amplifikation erfolgte durch unterschiedliche Konzentrationen an grün-markiertem  $A\beta_{11-42}$ -Substrat. Die Analyse des Signals des grünen Fluoreszenzkanals zeigte einen gleichmäßigen Signalanstieg nach Substratzugabe bei allen Seedkonzentration ohne dass das Signal mit zunehmender Seedkonzentration stieg (23B). Außerdem wurde insbesondere bei höchster Substratkonzentration in der Substratkontrolle ohne Seeds ein stärkeres Signal im Vergleich zur Kontrolle ohne Substrat beobachtet. Diese Ergebnisse deuten erneut auf eine unspezifische  $A\beta_{11-42}$ -Oberflächen-Wechselwirkung hin (23B).

Überraschenderweise zeigte die Analyse des roten Fluoreszenzkanals hingegen eine starke Reduktion der Signale mit steigender Substratkonzentration, das auf eine reduzierte Bindung der rot-markierten Seeds an die Fängerantikörper hinweist (23C). Eine systematische Reduktion der Seed-Bindung mit steigender Substratkonzentration wurde insbesondere bei 100 pM - 10 nM Seeds beobachtet. Bei Anwesenheit von 100 pM Seeds sank das Signal durch die Zugabe von 100 nM Substrat um 20 % gegenüber 100 pM nichtamplifizierter Seeds und durch die Zugabe von 1 oder 10 µM Substrat sank das Signal um 48 % beziehungsweise 75 % (23C).

Diese Beobachtung kann als indirekter Nachweis einer erfolgreichen Amplifikation interpretiert werden, da durch die Substratanlagerung, anders als vermutet, der ursprüngliche Seed möglicherweise nicht mehr für den Fängerantikörper zugänglich war.

Die Beispielbilder in Abbildung 23D verdeutlichen den Trend des abnehmenden Signals der rot-markierten Seeds mit steigender Substratkonzentration. Gleichzeitig bestätigen einzelne ko-lokalisierte Partikel, die besonders bei der höchsten Seedkonzentration von 100 nM mit steigender Substratkonzentration zunahmen, dass Ko-Aggregation beziehungsweise Amplifikation stattgefunden hat. Bei der Verwendung von 100 nM Seeds konnten die meisten Seeds bei einer Substratinkubation von 100 nM oder 1 µM die Fängerantikörper binden, da das Verhältnis von Substrat zu Seed vermutlich zu klein für eine gänzliche Verdeckung der A $\beta_{42}$ -Epitope war.



Abb. 23: Amplifikation von Aβ<sub>42</sub>-Seeds in Lösung mittels Aβ<sub>11-42</sub>-Substrat und anschließendes sFIDA-Experiment

(A) Schematische Abbildung der vorzeitigen Amplifikation in Lösung und anschließender Inkubation der amplifizierten Aβ<sub>42</sub>-Seeds auf der Fängerantikörper-beschichteten Glasoberfläche. Die Seeds waren 10% rot-markiert und wurden mit 10% grün-markiertem  $A\beta_{11-42}$ -Substrat in TBS-Puffer bei 37°C für ca. 20 h amplifiziert. Zugabe von 100 nM, 1 oder 10 µM Substrat zu einer Seedkonzentrationsreihe von 10 pM-100 nM. (B) Analyse der Signale des grünen Fluoreszenzkanals. Pixelanzahl bei einem CutOff von 0.01% der Kontrolle ohne Seeds und ohne Substrat. Das Signal der Proben, die nicht amplifiziert wurden, sind als grüne Balken dargestellt und das Signal der amplifizierten Proben sind als graue Balken (gemustert) dargestellt. (C) Analyse der Fängerantikörper-Seed-Bindung durch den roten Fluoreszenzkanal. Die Reduktion der Bindung bezüglich des Signals der nicht-amplifizierten Seeds (ohne Substratzugabe; dargestellt durch die rote horizontale Linie bei  $0^{\circ}$  ist in Prozent angegeben. Die Werte ergeben sich durch das Verhältnis des Signals der amplifizierten Seeds zu nicht-amplifizierten Seeds. (D) Ko-lokalisierte Beispielbilder aller getesteten Bedingungen mit steigender Substratkonzentration von links nach rechts und steigender Seedkonzentration von oben nach unten. Das Signal der Seeds ist in Rot dargestellt und das Signal des Substrats in Grün. Die Ko-Lokalisation ist gelb.

In diesem Experiment konnte eine Amplifikation der Aβ<sub>42</sub>-Seeds durch das Aβ<sub>11-42</sub>-Substrat indirekt nachgewiesen werden. Die vermutlich durch die Amplifikation verursachte Maskierung der ursprünglichen Aβ<sub>42</sub>-Epitope führte möglicherweise zu einer verminderten Seed-Fängerantikörper-Bindung. Der indirekte Nachweis der Amplifikation erfolgte hier ausschließlich durch die Verwendung von Fluorochromkonjugierten Seeds und kann daher nicht für den Nachweis natürlich vorkommender Seeds angewandt werden.

Durch die erneut beobachteten unspezifischen Wechselwirkungen wurden im Folgenden Bedingungen entwickelt, welche einerseits eine spontane Aggregation unterdrücken beziehungsweise hinauszögern und andererseits eine spezifische Amplifikation begünstigen.

#### Optimierung der Lösungsbedingungen für die Amplifikation durch Aß11-42

Bisher konnte die direkte  $A\beta_{42}$ - $A\beta_{11-42}$ -Ko-Aggregation nur in Aggregationsexperimenten nachgewiesen werden, aber bisher noch nicht in den sFIDA-Experimenten. Hier lag die Ursache für die fehlenden Amplifikationsereignisse möglicherweise in den Lösungsbedingungen, die hinsichtlich der für die Aggregation entscheidenden Faktoren, wie zum Beispiel der pH-Wert oder die Temperatur, optimiert werden müssen. Außerdem können Salze in der Lösung die Stabilität der Aggregate und somit auch den Aggregationsprozess beeinflussen [60, 61]. Die Aggregation wurde im folgenden Experiment für 1 µM A $\beta_{11-42}$  mit und ohne A $\beta_{42}$ -Seeds im pH-Bereich von 7-8,5 untersucht (Abb. 24).

Die spontane Aggregation trat erwartungsgemäß unter allen getesteten Lösungsbedingungen verzögert ein im Vergleich zu Proben, die Seeds enthielten (Abb. 24A). Die *lag-Phase* der spontanen Aggregation wurde mit zunehmendem pH-Wert größer und stieg von 1,7 Stunden bei pH 7 auf 3,1 Stunden bei pH 8,5 (Abb. 24B). In Anwesenheit von 10 nM Seeds wurde die *lag-Phase* durch die Änderung des pH von 7-8,5 von 1,4 Stunden auf 2,3 Stunden verzögert (Abb. 24B).

Die Differenz der *lag-Phase* von pH 7 auf pH 8,5 betrug 54 Minuten in Anwesenheit von 10 nM Seeds und war somit viel geringer als die Differenz der *lag-Phase* der spontanen Aggregation, die 84 Minuten umfasste (24C). Die Daten wiesen darauf hin, dass die *lag-Phase* in Anwesenheit von 10 nM Seeds weniger durch die Änderung des pH beeinflusst wird als die der spontanen Aggregation. Diese Beobachtung wurde durch die Steigung bestätigt, die durch die Mittelwerte der *lag-Phase* bei den jeweiligen pH-Werten gezogen wurde. Die Steigung von 0,97 in Abwesenheit von Seeds ist deutlich größer als die Steigung von 0,66 in Anwesenheit von 10 nM Seeds und zeigte dadurch eine stärkere pH-Abhängigkeit (s. Tabelle in Abb. 24B).

Anders verhielt sich die Signalabhängigkeit von dem pH-Wert in Anwesenheit von 100 nM Seeds (Abb. 24B). Aufgrund des anfänglichen Rauschens in der ThT-Fluoreszenz,

das vermutlich durch die ThT-Temperatursensitivität bei der Erwärmung der Messplatte auf 37°C verursacht wurde, wurden die Daten der ersten halben Stunden von den Analysen ausgeschlossen. Die Berechnung der laq-Phase war dennoch möglich, da der lineare Aggregationsbereich bestimmt werden konnte. Hier zeigte sich anders als in den Proben mit geringerer Seedkonzentration oder ohne Seeds eine umgekehrte pH-Abhängigkeit mit negativer Steigung von -0.39, was auf eine Beschleunigung der Amplifikation mit zunehmendem pH hindeuten würde (Abb. 24B). Die Steigungen der einzelnen Aggregationskurven waren bei der spontanen Aggregation steiler als die Steigungen der Amplifikation bei 100 nM Seeds. Dies könnte ein Hinweis sein, dass der Prozess der spontanen Aggregation mit demselben verkürzten Peptid schneller ablief als die Amplifikation mit der Volllängenvariante des A $\beta$ -Peptids. Insgesamt war die *lag-Phase* jedoch im Vergleich zu den Proben mit geringerer Seedkonzentration oder ohne Seeds unter allen getesteten pH-Bedingungen erwartungsgemäß kürzer (Abb. 24A+B). Die *lag-Phase* betrug ca. 32 Minuten bei pH 7 und 0 Minuten bei pH 8.5 (Abb. 24B). Die Differenz der lag-Phase von pH 7 bis pH 8,5 in Anwesenheit von 100 nM Seeds war mit 32 Minuten am geringsten (Abb. 24C). Die Amplifikation bei hoher Seedkonzentration ist vermutlich nur gering vom pH-Wert abhängig.

Zusätzlich wurde der Einfluss von 150 mM NaCl auf das Aggregationsverhalten in einem Zeitfenster von 30 Stunden bei den oben genannten pH-Werten untersucht (s. Anhang 40). Auffällig waren die stark sinkenden ThT-Fluoreszenzsignale unmittelbar nach Erreichen des maximalen Signals der ThT-Fluoreszenz, die darauf hindeuteten, dass in dem untersuchten Zeitraum kein stabiles Gleichgewicht zwischen der Assoziation und Dissoziation der Monomere an den Seed erreicht wurde. Die sinkenden ThT-Signale deuteten auf eine stärkere Dissoziation der entstandenen Aggregate und somit einem instabilen Zustand hin.

Dieser Effekt wurde ebenfalls bei einem pH-Wert von 9 und ebenso ohne die Verwendung von NaCl beobachtet (Daten nicht gezeigt), weshalb weitere Optimierungsschritte bei pH 9 oder unter Salzbedingungen nicht erfolgten.



Abb. 24: pH-Optimierung bei 37°C für die A $\beta_{42}$ -Amplifikation durch A $\beta_{11-42}$ 

(A) Aggregationsverlauf von 1 µM A $\beta_{11-42}$  in Abwesenheit (braun) oder in Anwesenheit von 10 (grün) oder 100 nM (blau) A $\beta_{42}$ -Seeds mittels ThT-Fluoreszenzfarbstoff. Oben links: bei pH 7; oben rechts: pH 7,5; unten links: pH 8; unten rechts: pH 8,5. Alle Puffer bestanden aus 40 mM Tris-HCl. Die Aggregationskurven wurden auf die Werte 0 und 1 normalisiert und anschließend mit einem gleitenden Mittelwert von einem Datenfenster von 5 aufeinanderfolgenden Werten geglättet. Replikatanzahl n = 2. (B) Darstellung der *lag-Phase* der einzelnen Aggregationskurven (quadratische Symbole) und der Mittelwerte der Duplikate (Kreis) mit zunehmendem pH-Wert. Lineare Regressionsgerade durch die Mittelwerte zur Bestimmung des pH-Einflusses auf die *lag-Phase* und dazugehöriger Steigung in nebenstehender Tabelle. (C) Balkendiagramm der Differenz der *lag-Phase* von pH 8,5.

Weitere Optimierungsschritte beinhalteten die Untersuchung der Temperatur bei verschiedenen pH-Werten. Von den getesteten Bedingungen bei pH 7; 7,5 oder 8 und einer Temperatur von 37°C; 30°C oder 25°C konnte die Lösungsbedingung pH 8 bei 25°C die längste *lag-Phase* von der spontanen Aggregation gegenüber der Amplifikation erzielt werden (s. Abb. 25; vollständiger Datensatz im Anhang 41). Die *lag-Phase* für die spontane Aggregation betrug  $1,9 \pm 0,2$  Stunden. Durch die Zugabe von 1 nM A $\beta_{42}$ -Seeds reduzierte sich die *lag-Phase* auf  $0,9 \pm 0,2$  Stunden und durch die Zugabe von 10 nM Seeds um weitere 0,4 Stunden auf  $0,5 \pm 0,2$ . Bei der höchsten Seedkonzentration stieg das ThT-Fluoreszenzsignal bereits nach 6 Minuten an (Abbildung 25B).



Abb. 25: Amplifikation von A $\beta_{42}$ -Seeds mittels A $\beta_{11-42}$ -Substrat bei pH 8 und 25°C

(A) Aggregationsverlauf von 5  $\mu$ M A $\beta_{11-42}$  bei pH 8 und 25°C. Die Aggregationskurven wurden auf die Werte 0 und 1 normalisiert und anschließend gemittelt. Die verwendeten A $\beta_{42}$ -Seedskonzentrationen sind 1, 10 oder 100 nM im Farbgradienten von grün bis blau oder 0 nM für die Kontrolle (braun). Darstellung der Mittelwerte der Triplikate (n = 3) + Standardabweichung. (B) Berechnete *lag-Phase* der Aggregationskurven für die jeweilige Seedkonzentration mit Standardabweichung.  Nach Optimierung der Lösungsbedingungen für die Aβ<sub>42</sub>-Aβ<sub>11-42</sub>-Ko-Aggregation konnte die *lag-Phase* der spontanen Aggregation deutlich verzögert werden im Vergleich zu den Reaktionsansätzen mit einer Seedkonzentration von bis zu 1 nM. Durch die Übertragung der optimierten Lösungsbedingungen auf den Amplifikationsschritt im sFIDA (s. Anhang 45) konnte trotzdem keine zuverlässige Amplifikation auf der Oberfläche beobachtet werden. Aufgrund dessen wurde im nächsten Abschnitt der Arbeit ein anderes amyloides Protein als Anwendungsbeispiel für die Amplifikation im sFIDA-Assay herangezogen.

Die bisherigen Optimierungsarbeiten für A $\beta$  beinhalteten die Blockierung spontan entstandener A $\beta_{42}$ -Aggregate an die freien Fängerantikörper mit einem Blockierungspeptid. Außerdem wurde BSA als Regulator für die A $\beta$ -Amplifikation getestet. Beide Strategien konnten falsch-positive Signale durch spontan entstandene Aggregate nicht zuverlässig verhindern.

Als weitere Möglichkeit wurde das N-terminal trunkierte  $A\beta_{11-42}$  verwendet, das durch die fehlenden Epitope per se nicht an die Fängerantikörper binden konnte. Für die Amplifikation der  $A\beta_{42}$ -Seeds mit  $A\beta_{11-42}$  wurden die Lösungsbedingungen mittels ThT-Aggregationsexperimente optimiert. Entgegen den Erwartungen konnte die Amplifikation auf der Glasoberfläche im sFIDA bei den optimierten Bedingen von 25°C und pH 8 nicht nachgewiesen werden.

Daher werden im Folgenden die Optimierungsarbeiten sowohl für  $\alpha$ -Synuclein als auch für A $\beta_{42}$  parallel durchgeführt, um auch geeignete Lösungsbedingungen für die kontrollierte Amplifikation mit Volllängen-A $\beta_{42}$ -Substrat zu finden.

# 3.3 Adaption der Amplifikation von immobilisierten $\alpha$ -Synuclein-Seeds im sFIDA

Im folgenden Kapitel dieser Arbeit wurde α-Syn, ein weiteres amyloides Protein mit einem Molekulargewicht von 14 kDa, das hauptsächlich mit der Parkinson-Krankheit (PD) assoziiert wird, untersucht. Die Parkinson-Krankheit ist unter den neurodegenerativen Erkrankungen die zweithäufigste Krankheit und geht mit der Aggregation von α-Syn einher, das sich intrazellulär vor allem in Neuronen in sogenannten Lewy-Körperchen ablagert. Diese Einschluss-Körperchen beinhalten neben aggregiertem α-Syn mehr als 70 weitere Bestandteile [62], darunter auch Ubiquitin, ein Protein, das den Abbau von Proteinen durch posttranslationale Modifikation (Ubiquitinierung) signalisiert und anschließend durch das Proteasom, einem regulatorischem Proteinkomplex, vollzogen wird. Die Anwesenheit von Proteinen des Proteasoms in Lewy-Körperchen deuten auf eine beeinträchtigte Regulierung des Proteinabbaus hin. Auch die Anwesenheit des Proteasoms selbst ist ein Indikator für einen gestörten Proteinabbau. Obwohl Lewy-Körperchen im Zusammenhang mit Neuronensterben stehen, ist die Ursache für das Neuronensterben nicht geklärt. Ähnlich wie bei der Alzheimer-Krankheit, bei der die Bedeutung von Aβ-Oligomeren vermutlich hauptsächlich für Neurodegeneration verantwortlich ist, rückt die Bildung von α-Syn-Oligomeren für die PD-Pathogenese ebenfalls in den Fokus [63].

Zwischen A $\beta$  und  $\alpha$ -Syn sind hinsichtlich der Krankheits-assoziierten Aggregation oder der Ablagerung dieser Proteine in kompakte Strukturen wie den extrazellulären Plaques bzw. intrazellulären Lewy-Körperchen Parallelen zu ziehen. Auch die Eigenschaft der beschleunigten Aggregation bzw. Amplifikation in Anwesenheit von Seeds haben beide Proteine gemeinsam.

 $\alpha$ -Syn weist im Vergleich zu A $\beta$  eine geringere Neigung zur spontanen Aggregation auf, weshalb diagnostische Verfahren, die auf Amplifikation basieren, für CSF-Proben zuverlässig eingesetzt werden und eine Sensitivität von bis zu 95 % und eine Spezifität von bis zu 100 % erreichen [64].

Aufgrund der gemeinsamen Eigenschaften und des Vorteils der geringeren Tendenz von  $\alpha$ -Syn zur spontanen Aggregation, soll anhand von  $\alpha$ -Syn das Prinzip der Amplifikation auf der sFIDA-Oberfläche überprüft werden. Das Ziel ist hierbei  $\alpha$ -Syn als Anwendungsbeispiel für die Amplifikation eines kankheitsassoziierten Proteins zu nutzen und gegebenenfalls weitere Parallelen zur A $\beta$ -Amplifikation im sFIDA zu entschlüsseln.

#### 3.3.1 Konzeptnachweis der α-Syn-Amplifikation auf der Glasoberfläche

In einem ersten Experiment wurde die Inkubationsdauer der  $\alpha$ -Syn-Amplifikation durch die Beobachtung des Aggregationsverlaufs mittels ThT und in Anwesenheit von  $\alpha$ -Syn-Seeds oder ohne Seeds ermittelt (26B). Für die folgenden Experimente wurde in *E. coli* 

BL21 (DE3) synthetisiertes Wildtyp (WT)-α-Syn hergestellt (s. Materialien und Methoden 2.6). Die hier verwendeten Seeds wurden zusätzlich mittels Rasterkraftmikroskopie vermessen und zeigten fibrillenartige Strukturen mit einer Länge von mehreren 100 nm und einem Durchmesser von ungefähr 10-12 nm (26A). Die Fibrillen wurden unmittelbar vor dem Start des Experiments mit einer Ultraschallsonde sonifiziert, um die Anzahl der Seeds zu erhöhen. Eine Substratkonzentration von 1 µM oder 10 µM (Daten nur von Bedingungen mit 10 µM Substrat gezeigt) und Pufferbedingungen bei pH 7,5 und 37°C wurden für dieses Experiment gewählt (Abb. 26). In Anwesenheit von 100 nM Seeds ist die Amplifikation durch einen sofortigen Anstieg der ThT-Fluoreszenz zu beobachten. In Anwesenheit von 100 pM Seeds und in der Kontrolle ohne Seeds wurde auch nach 3 Tagen Inkubation kein Anstieg in der ThT-Fluoreszenz beobachtet, da entweder keine Amplifikation in Anwesenheit von 100 pM Seeds oder spontane Aggregation in der Kontrolle ohne Seeds stattfand. Eine weitere Erklärung wäre möglicherweise, dass die Beobachtung des Aggregationsverlaufs durch ThT unter den gewählten Bedingungen in einem Plattenlesegerät nicht ausreichend sensitiv bei sehr niedriger Seedkonzentration ist.

Da im nachfolgenden sFIDA-Experiment Fluorochrom-konjugiertes  $\alpha$ -Syn verwendet werden sollte, wurde bereits für die Ermittlung der Inkubationsdauer Fluorochrom-konjugiertes  $\alpha$ -Syn eingesetzt.

Die Fluorochrom-Markierung erfolgte über die spezifische Maleimide-Thiol-Konjugation. Da Wildtyp-α-Syn keine thiolhaltigen Cysteine enthält, wurde eine α-Syn-Mutante hergestellt, an der das Tyrosin an Position 136 durch ein Cystein ausgetauscht wurde und die Fluorochrom-Konjugation mit HiLyte488-Maleimide oder HiLyte647-Maleimide somit spezifisch an das Cystein erfolgen konnte.

In einem nachfolgenden sFIDA-Experiment wurden wie im Experiment zuvor Pufferbedingungen für den Amplifikationsschritt bei pH 7,5 und eine Temperatur von 37°C gewählt. Der Farbstoff-Markierungsgrad des  $\alpha$ -Syn lag ebenfalls bei einem Prozent. Anders als im Experiment zuvor wurden die Proben für vier Tage amplifiziert. Beispielbilder aus den kolokalisierten Fluoreszenzkanälen zeigen insbesondere die Proben mit 100 nM und 10 nM Seeds sehr deutlich, dass sich fibrillenartige Strukturen an einen Seed gebildet haben (26C). Die eingesetzten Seeds wurden somit stark amplifiziert. In diesem Experiment konnte die Amplifikation eines amyloiden Proteins auf der Glasoberfläche nachgewiesen werden. Auf dieser Grundlage und durch zusätzliche Optimierungsarbeiten sollen im Folgenden geeignete Bedingungen für die Amplifikation von A $\beta$  und  $\alpha$ -Syn gefunden werden.



Abb. 26: Ermittlung der Inkubationsdauer für die α-Syn-Amplifikation durch die Beobachtung des Aggregationsverlaufs mittels ThT und Visualisierung der Amplifikation im sFIDA-Assay

(A) AFM-Aufnahme von  $\alpha$ -Syn-Seeds, davon 1% mit dem Fluorochrom HiLyte488 konjugiertes Y136C- $\alpha$ -Syn. (B) Amplifikation von 100 pM (grün) oder 100 nM (blau)  $\alpha$ -Syn-Seeds aus A) mit 10 µM  $\alpha$ -Syn-Substrat, davon 1% mit dem Fluorochrom HiLyte647 konjugiertes Y136C- $\alpha$ -Syn. Die Amplifikation erfolgte bei pH 7,5 und 37°C. Die Substratkontrolle (braun) enthielt 10 µM  $\alpha$ -Syn. Die Aggregationskurven wurden in Triplikaten gemessen und für die Darstellung gemittelt (+ Standardabweichung). (C) Kolokalisierte Beispielbilder der  $\alpha$ -Syn-Amplifikation im sFIDA bei pH 7,5 und 37°C für 4 Tage. 1% HiLyte488-konjugierte Seeds (in den Bildern violett-weiß dargestellt) + 10 µM 1% HiLyte647-konjugiertes Substrat (schwarz dargestellt). Substratkontrolle = 10 µM Substrat ohne Seeds.

### 3.3.2 Optimierung von Pufferbedingungen und Substratkonzentration zur Amplifikation von α-Syn-Seeds

Die spontane Aggregation ist von vielen Faktoren und insbesondere von den Umgebungsbedingungen des Proteins abhängig. Dazu gehört beispielsweise der pH, da bei niedrigerem pH die Protonierung des negativ-geladenen C-Terminus des  $\alpha$ -Syn verursacht werden kann, wodurch die spontane Aggregation gefördert würde [65]. Auch bei A $\beta$  wurde eine Abhängigkeit der Aggregation von dem pH-Wert beobachtet [66, 67]. Auch die Temperatur kann die Aggregation fördern, wobei eine hohe Temperatur mit der Bildung von stabilen Aggregaten einhergeht [68]. Zusätzlich kann die Salzkonzentration der Umgebung die Proteinaggregation beeinflussen, indem Ionen die Ladung von positiven oder negativen Aminosäureseitenketten abschirmen können, wodurch es zu inter- und intramolekularen Ladungsanziehungen oder -Abstoßungen kommt [68].

Neben den Puffer- bzw. Lösungsbedingungen und der Temperatur ist außerdem die Konzentration des Proteins ein wichtiges Kriterium, da die spontane Aggregation eine kritische Proteinkonzentration erfordert. So liegt diese im physiologischen pH-Bereich und einer NaCl-Konzentration von etwa 140 mM für A $\beta$  bei 60-120 nM monomeres Protein [56] und für  $\alpha$ -Syn bei mindestens 10  $\mu$ M monomeres Protein [69].

In den folgenden Experimenten sollen die genannten Parameter untersucht werden. Die Substratinkubation erfolgte in den nachstehenden Experimenten für ca. 20 Stunden. Die Amplifikation von  $\alpha$ -Syn erfolgte grundsätzlich bei 37°C, die von A $\beta$  dagegen bei Raumtemperatur, da aufgrund der starken spontanen Aggregation von A $\beta$  eine kältere Temperatur von ca. 25°C bevorzugt wurde.

#### Optimierung des pH-Werts und der Substratkonzentration

Untersucht wurden die spontane Aggregation und Amplifikation in Anwesenheit von 0,1 oder 1 nM Seeds im pH-Bereich von 7,5 bis 8,5. Aufgrund der verstärkten Aggregation unter sauren Bedingungen [70] wurden nur pH-Werte über 7,5 getestet. Zusätzlich wurden für das Protein  $\alpha$ -Syn Substratkonzentrationen von 1, 5 oder 10 µM getestet und für A $\beta$  Substratkonzentrationen von 500 nM, 1 oder 5 µM getestet. Der Nachweis erfolgte in diesem Experiment ausschließlich durch Fluorochrom-konjugierte Detektionsantikörper (s. schematische Abbildung 27).



Abb. 27: Schematischer Aufbau des sFIDA-Experiments zur Optimierung des pH-Werts und der Substratkonzentration

Für die Amplifikation der Seeds werden  $\alpha$ -Syn- oder A $\beta_{42}$ -Seeds an den Fängerantikörper gebunden und mit  $\alpha$ -Syn- bzw. A $\beta_{42}$ -Substrat für 20 h inkubiert. Die verwendeten Detektionsantikörper mit unterschiedlichen Fluorochromen können die Seeds binden und erzeugen nach Anregung Signal im sFIDA-Assay. Bei der Kontrolle werden die Seeds an den Fängerantikörper gebunden. Alternativ wird nur Puffer für die Bedingung ohne Seeds inkubiert. Die an den Seeds gebundenen Detektionsantikörper erzeugen nach Anregung Signal im sFIDA wohingegen bei Bedingungen ohne Seeds kein Signal erzeugt werden kann. Als Substratkontrolle werden Bedingungen bezeichnet, die mit Substrat aber ohne Seeds inkubiert werden. Gegebenenfalls entstehen spontan Aggregate, die an den Fängerantikörper binden können. Diese können zusätzlich durch Detektionsantikörper gebunden werden und erzeugen unspezifischen Hintergrund. Im Folgenden sind die Ergebnisse für die Bedingungen gezeigt, die die höchsten Signale in den amplifizierten Proben im Vergleich zur spontanen Aggregation, der jeweiligen Substratkontrolle, aufwiesen. Diese sind in nachstehender Tabelle unter allen getesteten Bedingungen durch ein "X" angegeben.

α-Syn				Αβ			
pH Substrat	7,5	8,0	8,5	pH 7,5 8,0	8,5		
1 µM				500 nM			
5 µM				1 µM			
10 µM		Х		5 μM X X			

Tabelle 4: getestete pH-Werte und Substratkonzentration

Für α-Syn ergab die Amplifikation bei einem pH-Wert von 8 und einer Substratkonzentration von 10 µM die stärksten Signale im Vergleich zur spontanen Aggregation (Abb. 28). Durch die Ko-Lokalisation der Signale aus beiden Fluoreszenzkanälen ist zwar ein Anteil der spontanen Aggregation zu erkennen, dennoch sind die Signale in Proben, die Seeds enthielten höher als in der Probe ohne Seeds (28C). Außerdem konnte durch die Amplifikation der Seeds eine größere Signalsteigerung bezüglich der Probe ohne Seeds erzielt werden als in den nicht-amplifizierten Seeds (=Kontrolle). Das Signals der einzelnen Proben wurde für diese Beurteilung durch die jeweilige Probe ohne Seeds (= Hintergrund) dividiert. Das Signal in der Kontrolle (ohne Substrat) ist somit bei einer Seedkonzentration von  $0,1\,\mathrm{nM}$ um 1,5-fach höher als in der Kontrolle ohne Seeds und bei einer Seedkonzentration von 1 nM 3.7-fach höher. Durch die Amplifikation ist der Faktor bzw. die Signalsteigerung bezüglich der Kontrolle ohne Seeds höher und betrug 1,8 bzw. 4,2 bei den entsprechenden Seedkonzentrationen von 0,1 nM oder 1 nM (28C). In den Bildaufnahmen ist die Amplifikation der Seeds durch größere Partikel bei Substratzugabe und durch mehrere detektierbare Partikel zu erkennen (28D). Aufgrund der kürzeren Inkubationszeit des Substrats im Vergleich zum Experiment zuvor, sind noch keine fibrillenartigen Strukturen erkennbar, da diese vermutliche erst durch längere Inkubationszeiten ausgebildet werden.

Für A $\beta$  ergab die Amplifikation bei einer Substratkonzentration von 5µM und einem pH-Wert von 7,5 oder 8 die stärksten Signale im Vergleich zur spontanen Aggregation (Abb. 29). Die Signalsteigerung im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle ohne Seeds beträgt in den nicht-amplifizierten Proben für die Seedkonzentrationen von 0,1 und 1 nM den Faktor 2 bzw. 70,9 und für die amplifizierten Proben bei pH 7,5 den Faktor 1,5 bzw. 4,3 bei einer Seedkonzentration von 0,1 nM und 1 nM Seeds. Bei pH 8 konnte entsprechend eine Signalsteigerung von 2,4 bzw. 5,5 erzielt werden. Somit wurde bei einer niedrigeren Seedkonzentration von 0,1 nM ein *Signalgewinn* durch die Zugabe des Substrats im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. Als *Signalgewinn* wird die durch die Amplifikation erzeugte Signalverstärkung gegenüber nicht-amplifizierten Proben bezeichnet. Bei einer höheren Seedkonzentration von 1 nM ist durch die spontane Aggregation des Substrats das Signal-Rausch-Verhältnis kleiner im Vergleich zur Kontrolle, weshalb hier kein Signalgewinn erzielt werden konnte. Außerdem ist in den Histogrammen in Abbildung 29B und in den ko-lokalisierten Beispielbildern (29D) zu erkennen, dass die spontane Aggregation des Substrats bei pH 7,5 stärker ist als bei pH 8.

Für die weiteren Experimente wurde aufgrund dessen und aufgrund des stärkeren Signalgewinns durch die Amplifikation bei pH 8 im Vergleich zu pH 7,5 der höhere pH-Wert ausgewählt.



Abb. 28: Optimierung der α-Syn-Amplifikation bei pH 8 und 10 µM α-Syn-Substrat

Ausgewählter Bereich der Histogramme der (A) Kontrolle (K) ohne Substrat für die Signale der CF633-konjugierten (links) und CF488A-konjugierten (rechts) Detektionsantikörper und (B) der Proben, die für 20 Stunden mit 10  $\mu$ M Substrat inkubiert wurden. Die Seedkonzentration betrug 0, 0,1 oder 1 nM. Der CutOff von 0,1 % ist durch die horizontale Linie dargestellt. (C) Balkendiagramme der Signale der Kontrolle K und der Proben, die mit 10  $\mu$ M Substrat bei pH 8 inkubiert wurden. Signale des CF633-konjugierten und CF488A-konjugierten 211-Antikörper und der Ko-Lokalisation. (D) Ko-lokalisierte Beispielbilder der Kontrollen ohne Seeds oder mit 1 nM  $\alpha$ -Syn-Seeds und  $\pm$  Substrat.



Abb. 29: Optimierung der A $\beta$ -Amplifikation bei pH 7,5 oder 8 und 5  $\mu$ M A $\beta$ -Substrat

Ausgewählter Bereich der Histogramme der (A) Kontrolle (K) ohne Substrat für die Signale der CF633-konjugierten (links) und CF488A-konjugierten (rechts) Detektionsantikörper und (B) der Proben, die für 20 Stunden mit 5  $\mu$ M Substrat bei pH 7,5 oder 8 inkubiert wurden. Die Seedkonzentration betrug 0, 0,1 oder 1 nM. Der CutOff von 0,1% ist durch die horizontale Linie dargestellt. (C) Balkendiagramme der Signale bei einem CutOff von 0,1%. Signale des CF633-konjugierten Nab228-Antikörper und AF488-konjugierten 6E10-Antikörper sowie der Ko-Lokalisation. (D) Ko-lokalisierte Beispielbilder der Kontrollen ohne Seeds oder mit 1 nM  $\alpha$ -Syn-Seeds und  $\pm$  Substrat bei pH 7,5 oder 8.

### Amplifikation der Seeds in Lösung und Verwendung von Fluorophor-konjugiertem Substrat

Da bei α-Syn trotz der geringeren Neigung zur spontanen Aggregation durch die Zugabe des Substrats erhöhter Hintergrund beobachtet wurde, erfolgte die Amplifikation in den nachstehenden Experimenten vorab in Lösung mit anschließender Inkubation der amplifizierten Seeds auf der Antikörper-beschichteten Glasoberfläche (s. schematische Abbildung 30).

Durch die Bindung des Substrats an die freien Fängerantikörper wird lokal eine erhöhte Monomerkonzentration verursacht, wodurch vermutlich die Bildung von spontanen Aggregaten gefördert wird. Die spontane Bildung eines Nukleationskeims hingegen wird in Lösung bei geringerer lokalen Konzentration unwahrscheinlicher, insbesondere wenn in unmittelbarer Nähe ein frei zugänglicher Seed vorliegt.

Ein weiterer Vorteil ergibt sich durch die erhöhte Anzahl der Freiheitsgrade des ungebundenen Seed in Lösung im Vergleich zu dem an den Fängerantikörper gebundenen Seed, wodurch die Zugänglichkeit für das Substrat erhöht wird. Denn durch die Bindung der Seeds an die Fängerantikörper werden potenzielle Bindestellen für das Substrat verdeckt, wodurch die Amplifikation der Seeds auf der Oberfläche möglicherweise eingeschränkt ist.

In den folgenden Experimenten wurde für die Amplifikation außerdem 1-5% Hi<br/>Lyte647-konjugiertes A $\beta$  oder Y136C- $\alpha$ -Syn verwendet.

Die Amplifikation erfolgte grundsätzlich bei pH 8 und einer Seedkonzentration zwischen  $1 \,\mathrm{pM}$  und  $10 \,\mathrm{nM}$ .

Wie im vorherigen Experiment wurden nur die Ergebnisse für die Bedingungen gezeigt, die das stärkste Signal durch Amplifikation aufwiesen. Diese sind in nachstehender Tabelle unter allen getesteten Bedingungen durch ein "X" angegeben. In einem unabhängigen Experiment zeigte die Verwendung von 2% und 5% HiLyte647-konjugiertes Y136C- $\alpha$ -Syn starkes Hintergrundrauschen weshalb diese Bedingungen nicht erneut getestet wurden und aufgrund dessen in der Tabelle nicht mehr aufgeführt werden. Für die Amplifikation von  $\alpha$ -Syn-Seeds wurde optional der Einfluss von 12,5 mM NaCl getestet.



Abb. 30: Schematischer Aufbau des sFIDA-Experiments zur Optimierung des (Fluorochrom-konjugierten) Substrats in Lösung

Bei der Amplifikation der Seeds in Lösung werden  $\alpha$ -Syn- oder A $\beta_{42}$ -Seeds mit  $\alpha$ -Synbzw. A $\beta_{42}$ -Substrat für 20 h inkubiert und anschließend an den Fängerantikörper gebunden. Optional wird Fluorochrom-konjugiertes Substrat in Rot verwendet. In diesem Fall erfolgt die Detektion zusätzlich mit einem Detektionsantikörper in Grün anstatt mit zwei Detektionsantikörpern in Rot und Grün. Das Fluorochrom-konjugierte Substrat und die verwendeten Detektionsantikörper erzeugen nach Anregung Signal im sFIDA-Assay. Bei der Kontrolle werden die Seeds an den Fängerantikörper gebunden. Alternativ wird nur Puffer für die Bedingung ohne Seeds inkubiert. Die an den Seeds gebundenen Detektionsantikörper erzeugen nach Anregung Signal im sFIDA wohingegen bei Bedingungen ohne Seeds kein Signal erzeugt werden kann. Als Substratkontrolle in Lösung werden Bedingungen bezeichnet, die mit Substrat aber ohne Seeds inkubiert werden. Gegebenenfalls entstehen spontan Aggregate, die an den Fängerantikörper binden können. Diese können zusätzlich durch Detektionsantikörper gebunden werden und erzeugen unspezifischen Hintergrund.

a-Syn		
Fluorochrom Substrat	0%	1%
$5 \ \mu M$		
10 µM	X	
$5 \ \mu M + NaCl$	Х	
$10 \ \mu M + NaCl$		

	Αβ	
76	Substrat	$5 \ \mu M$
	0%	Х
	1%	Х
	2%	

5%

Tabelle 5: Getestete Konzentration des Fluorochrom-konjugierten Substrats

Für  $\alpha$ -Syn konnte das stärkste Signal durch die Amplifikation erneut bei der Verwendung von unkonjugiertem Substrat in einer Konzentration von 10 µM beobachtet werden oder bei der Verwendung von 5 µM Substrat unter NaCl-Zugabe (Abb. 31).

Erstaunlicherweise waren die Signale in den amplifizierten Proben bei allen getesteten Seedkonzentrationen höher als in der entsprechenden Kontrolle ohne Seeds wohingegen nicht-amplifizierte Seeds ab einer Konzentration von 100 pM stärkere Signale als die entsprechende Kontrolle ergaben. Wenn auch die Signale der amplifizierten Seeds bei



Abb. 31: Optimierung der  $\alpha$ -Syn-Amplifikation in Lösung mit 10 µM Substrat oder 5 µM Substrat und 12,5 mM NaCl

Balkendiagramme der Signale von 0 und 1 pM-10 nM amplifizierter Seeds bei einer Substratkonzentration von 10 µM oder 5 µM  $\alpha$ -Syn-Substrat + 12,5 mM NaCl und der Kontrolle K (ohne Substrat). CutOff = 0,1 %.

der Verwendung von  $10\,\mu$ M Substrat mit zunehmender Seedkonzentration nur schwach steigen, wird bereits bei einer Seedkonzentration von  $1\,\mu$ M eine Signalsteigerung in der Ko-Lokalisation von Faktor 4,4 erreicht und bei der Verwendung von  $10\,\mu$ M Seeds eine Signalsteigerung von 12,8 erreicht im Vergleich zur Probe ohne Seeds (Abb. 31).

Die Amplifikation durch  $5 \mu$ M Substrat in Anwesenheit von  $12,5 \,\mathrm{mM}$  NaCl erzeugte ein durchschnittlich 8,5-faches  $\pm 1,7$  höheres ko-lokalisiertes Signal als die Probe ohne Seeds. Das Signal steigt in diesem Fall nicht stetig mit steigender Seedkonzentration (Abb. 31).

Durch die Optimierungsschritte konnte mittels Amplifikation ein Signalgewinn des unteren Seed-Konzentrationsbereich erzielt werden. Dadurch konnten Seeds auch unterhalb von 100 pM nachgewiesen werden, die ohne Amplifikation kein Signal über dem Hintergrundrauschen verursachten.

Die Amplifikation von A $\beta$ -Seeds liefert ebenfalls einen Signalgewinn im unteren Seed-Konzentrationsbereich bei der Verwendung von 5  $\mu$ M unkonjugiertem oder 1 % Fluorochrom-markiertem Substrat (s. Abb. 32).



Abb. 32: Optimierung der Aβ-Amplifikation in Lösung mit unkonjugiertem oder 1% Fluorochrom-konjugiertem Substrat

Balkendiagramme der Signale von 0 und 1 pM - 10 nM amplifizierter Seeds bei einer Substratkonzentration von 5 µM oder 5 µM A $\beta_{42}$ -Substrat, davon 1 % HiLyte647-konjugiert und der Kontrolle ohne Substrat. Die Detektion erfolgte durch einen AF488-konjugierten 6E10-Antikörper und durch das HiLyte647-konjugiert Substrat oder optional einen CF633-konjugierten Nab228-Antikörper CutOff = 0,1 %.

Insgesamt konnten durch die Optimierungsschritte der Amplifikation sowohl für  $\alpha$ -Syn als auch für A $\beta$  Seeds unterhalb einer Konzentration von 100 pM nachgewiesen werden, die ohne Amplifikation kein Signal über dem Hintergrundrauschen erzeugten (Abb.32).

Anhand von  $\alpha$ -Syn konnte zunächst das Prinzip der Amplifikation auf der Oberfläche nachgewiesen werden, allerdings erfolgte während der Optimierungsarbeit der entscheidende Wechsel von der Amplifikation auf der Oberfläche zur Amplifikation in Lösung. Denn selbst bei einem Protein mit geringerer Aggregationsneigung wurden in der höchst sensitiven sFIDA-Methode störende spontan entstandene Aggregate des Substrats beobachtet.

In dieser Arbeit konnten konsistente Ergebnisse bezüglich der α-Syn-Amplifikation insofern erzielt werden, als dass die Amplifikation im angestrebten Bereich der niedrigeren Seedkonzentrationen zu einer Signalverstärkung gegenüber nicht-amplifizierter Seeds führte.

Für A $\beta$  konnten hinsichtlich der Amplifikation keine Bedingungen ermittelt werden, die eine kontrollierte Amplifikation von A $\beta$ -Seeds reproduzierbar ermöglichte.

Der Übergang zur Amplifikation in Lösung war jedoch im Zusammenspiel mit der Optimierung der Lösungsbedingungen ein entscheidender Schritt in der gezielten Amplifikation der Aβ-Seeds. Für eine angestrebte Routineanwendung in der Diagnostik sind ergänzende Optimierungsschritte erforderlich.

#### 3.3.3 Amplifikation von α-Syn-Seeds aus Hirnhomogenat einer transgenen Maus

Um die Amplifikation von  $\alpha$ -Syn-Seeds aus einer biologischen Probe zu überprüfen, wurde Hirnhomogenat transgener Mäuse der Linie TgM83<sup>+/-</sup> verwendet. Diese produziert das mutierte humane A53T  $\alpha$ -Syn-Protein, das bei einer familiären Parkinson-Erkrankung vorkommt [71]. Es wurde Hirnhomogenat von jeweils einer erkrankten Maus, die mit 50 µg humanen WT- $\alpha$ -Syn-Fibrillen intrazerebral infiziert wurde oder einer Kontrolle, die alternativ 50 µg BSA verabreicht bekommen hat, verwendet (für Details s. Lohmann et al. [72]). Erkrankte Mäuse starben nach etwa 133 Tagen und zeigten pathologische Auffälligkeiten in Form von  $\alpha$ -Syn-Fibrillen und phosphoryliertem  $\alpha$ -Syn in Hirngewebeschnitten [72]. Die Kontrollen hingegen zeigten keine pathologischen Auffälligkeiten und überlebten innerhalb des beobachteten Zeitraums von 500 Tagen [72]. In den Arbeiten von Birkmann et al. [31] und erst kürzlich von Kass et al. [73] wurden amyloide Partikel aus Hirnhomogenat wie PrP-Partikel aus Rindern oder A $\beta$ -Partikel aus humanen Hirnproben auf der Oberfläche im sFIDA konzentriert und nachgewiesen.

Da die Amplifikation von synthetischen  $\alpha$ -Syn-Seeds in dieser Arbeit ebenfalls auf der Oberfläche erfolgreich nachgewiesen werden konnte (s. 3.3.1), sollte das erste Experiment der Amplifikation von  $\alpha$ -Syn-Seeds aus einer biologischen Probe ebenfalls auf der Oberfläche erfolgen. Mögliche Matrixeffekte (Maskierung der Seedoberfläche, störende Wechselwirkungen des Substrats oder der Detektionsantikörper mit Probenkomponenten) würden minimiert werden, da nach Bindung der Seeds an die Fängerantikörper die Probe gewaschen wird. Um die Amplifikation gemäß Optimierungsarbeiten in Lösung zu vollziehen, müssen in weiteren Schritten Probenverdünnungs-Untersuchungen durchgeführt werden. In diesem Experiment wurde zusätzlich das von Henke etablierte Protokoll der Protein-



fällung mittels PTA getestet [1].

Abb. 33: Amplifikation von  $\alpha$ -Syn-Seeds aus TgM83<sup>+/-</sup>-Hirnhomogenat

(A) Balkendiagramm einer synthetischen  $\alpha$ -Syn-Seedkonzentrationsreihe in Puffer, die mit 10 µM Substrat, davon jeweils 1 % mit HiLyte488 oder mit HiLyte647 konjugiertes Y136C- $\alpha$ -Syn, 4 Tage bei 37°C bei pH8 inkubiert wurden. (B) Beispielbilder der Konzentrationen von 100 pM - 10 nM Seeds und der Substratkontrolle ohne Seeds (0). (C) Balkendiagramme von jeweils 1 % Hirnhomogenat einer Kontrolle oder erkrankten TgM83<sup>+/-</sup> Maus, die mit 50 µg BSA beziehungsweise WT  $\alpha$ -Syn-Seeds intrazerebral behandelt wurde. Das Hirnhomogenat wurde entweder unbehandelt für den sFIDA verwendet oder nach dem PTA-Protokoll vorbereitet (s. 2.9). Die Substratinkubation erfolgte unter den in (A) beschriebenen Bedingungen. (D) Beispielbilder der amplifizierten Hirnhomogenate von (C). Dargestellt sind ausschließlich ko-lokalisierte Signale in den Balkendiagrammen und in den Bildern. Der CutOff von 0,1 % wurde anhand der Substratkontrolle (keine Seeds aber Substrat) bestimmt.

Anhand einer synthetisch hergestellten  $\alpha$ -Syn-Seedkonzentrationsreihe sind nach vier Tagen Substratinkubation klare Fibrillen ab einer Seedkonzentration von 100 pM zu erkennen (33B). In den darunterliegenden Konzentrationen und der Kontrolle ist ein partikelartiger Hintergrund zu erkennen (33B). Im Balkendiagramm nimmt das Signal ab einer Konzentration von 100 pM stetig zu (33A). Das Signal bei 100 pM Seeds übersteigt jedoch nicht das Signal von 100 fM Seeds, das aber auch über der Kontrolle liegt (33A).

Überraschenderweise sind in den amplifizierten Seeds aus dem Maushirnhomogenat neben vereinzelten Fibrillen überwiegend ko-lokalisierte Partikel zu erkennen (33D). Das Hirnhomogenat wurde entweder unbehandelt aufgetragen oder mittels PTA-Fällungsprotokoll behandelt. Bei der Amplifikation der Seeds aus den unbehandelten Hirnhomogenaten ist kein deutlicher Unterschied zwischen dem erkrankten Tier und der Kontrolle zu erkennen (33C). Das Signal des erkrankten Tiers liegt mit 57 ko-lokalisierten Pixeln über dem CutOff lediglich um den Faktor 1,2 höher als die Kontrolle. Die Durchführung des Fällungsprotokolls bewirkte eine starke Zunahme des Signals in der Kontrolle und dem Erkrankten Tier. Dabei wurde das Protokoll in einem Fall auch ohne PTA durchgeführt (-PTA), um den Einfluss der Zentrifugationsschritte und der Inkubation mit eine Detergenz zu überprüfen. Dadurch konnte das Signal in dem Kontrolltier um den Faktor 13,7 gegenüber dem unbehandelten Homogenat und in dem erkrankten Tier um den Faktor 15,8 gesteigert werden. Interessanterweise führte die Zugabe von Wolframat zu einem Verminderten Signal in der Kontrolle im Vergleich zum Signal der Kontrolle ohne PTA-Zugabe, aber zu einer weiteren Signalsteigerung in "Erkrankt" (33C). Dadurch wurde der Unterschied nach PTA-Zugabe zwischen der Kontrolle und dem erkrankten Tier deutlicher. Das Signal war in diesem Fall 3,5-mal stärker. In den Bildern waren bei dem Hirnhomogenat des erkrankten Tiers große ko-Lokalisierte Partikel zu erkennen, wohingegen in der Kontrolle kleinere Partikel erschienen (33D).

Zusammenfassend wurde in diesem Experiment deutlich, dass allein die Durchführung des PTA-Fällungsprotokolls (ohne PTA-Zugabe) zu einer deutlichen Signalsteigerung führte. Vermutlich konnten die Seeds mittels Detergenz von anderen Proteinen oder Lipiden gelöst werden und durch Zentrifugation von störenden Komponenten getrennt werden. Die Zugabe von PTA erhöhte das Signal-Rauschverhältnis von 1,4 (- PTA) auf 3,5 (+ PTA).

Im Rahmen der Präanalytik sollte zusätzlich der Einfluss von Detergenzien auf eine biologische Matrix und die damit einhergehende Signalsteigerung untersucht werden.

 In den Experimenten wurde f
ür die Amplifikation der α-Syn- oder Aβ-Seeds die optimale Substratkonzentration und der pH-Wert ermittelt. Die Amplifikation erfolgte zun
ächst auf der Glasoberfl
äche und ergab das st
ärkste Signal-Rausch-Verh
ältnis f
ür beide Proteine im basischen pH-Bereich von 8. Die optimale Substratkonzentration betrug 10 µM f
ür α-Syn und 5 µM f
ür Aβ.

Durch die Substratzugabe wurde auch bei α-Syn erhöhtes Hintergrundrauschen be-

obachtet, weshalb der Amplifikationschritt in den Folge<br/>experimenten vorab in Lösung vollzogen wurde. Dabei wurde alternativ Fluorochrom-konjugi<br/>ertes Substrat für die Amplifikation und gleichzeitig Detektion verwendet. Für <br/>  $\alpha$ -Syn konnte aber das stärkste Signal-Rausch-Verhältnis durch unmarkiertes Substrat und anschließender Detektion mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern erzielt werden. Die Substrat<br/>konzentration von 10 µM konnte auf 5 µM reduziert werden, wenn eine geringe NaCl-Konzentration hinzugegeben wurde. Bei der Amplifikation von Aβ-Seeds konnte das stärkste Signal-Rausch-Verhältnis durch unmarkiertes oder 1 % Fluorochrom-konjugiertes Substrat erreicht werden.

Zuletzt konnte die Amplifikation von  $\alpha$ -Syn-Seeds aus Gehirnhomogenat einer TgM83<sup>+/-</sup>-Mauslinie auf der Glasoberfläche nachgewiesen werden, wenn vorab ein PTA-Proteinfällungsprotokoll zur Reinigung der Seeds aus dem Hirngewebe angewandt wurde.

## 4 Diskussion

Der Nachweis von Oligomeren wurde in den vergangenen Jahren in der Alzheimer-Diagnostik zunehmend relevanter. Zum einen wird vermutet, dass kleine und lösliche Oligomere schädlicher als unlösliche und kompakte Plaques seien [26]. Zum anderen wurde eine starke Korrelation zwischen der Quantität der Oligomere und dem Krankheitsbild beobachtet [9]. Viele Studien bestätigen einen Zusammenhang zwischen erhöhten A $\beta$ -Oligomerkonzentrationen in CSF und der Alzheimer-Krankheit; auch wenn große Überschneidungen mit der Kontrollgruppe festgestellt wurden [50].

Aus diesem Grund sind ultrasensitive und zuverlässige Methoden zur Quantifizierung der Aβ-Oligomere erforderlich.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Amplifikation von Aβ-Oligomeren mit der ultrasensitiven sFIDA-Technologie kombiniert werden, um eine höhere Sensitivität zu erreichen. Nach zahlreichen Optimierungsschritten und Strategien zur Verhinderung falsch-positiver Signale konnte eine Verstärkung des Signals erreicht werden, aber aufgrund begrenzter Reproduzierbarkeit konnte der Assay für die Routine-Diagnose noch nicht angewandt werden.

Mithilfe eines weiteren amyloiden Proteins –  $\alpha$ -Synuclein, das in aggregierter Form charakteristisch für Morbus Parkinson ist – konnte zum ersten Mal die Amplifikation eines Proteins im sFIDA nachgewiesen werden. Das Konzept der Amplifikation auf der Oberfläche konnte an  $\alpha$ -Synuclein erfolgreich erzielt werden. Weitere Optimierungsschritte resultierten jedoch in einen Amplifikationsschritt, der zunächst in Lösung vollzogen werden sollte, bevor die amplifizierten Seeds an die Fängerantikörper gebunden werden. Durch die Amplifikation in Lösung konnte im Puffersystem letztlich eine gesteigerte Sensitivität gegenüber nicht-amplifizierten Seeds erreicht werden. Abschließend konnten in dieser Arbeit erstmalig  $\alpha$ -Syn-Seeds aus einer biologischen Probe durch präanalytische Behandlung im sFIDA amplifiziert werden.

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse unter Einbeziehung der wissenschaftlichen Literatur diskutiert und bewertet.

## 4.1 Hohe Seedkonzentration ermöglicht Amplifikation von Aβ-Oligomeren auf der Oberfläche

Die Aggregation, darin eingeschlossen die Amplifikation, ist von der Konzentration der Monomere und Seeds abhängig [56, 74]. Monomere und Aggregate befinden sich in einem thermodynamischen Gleichgewicht. In *in vitro* Experimenten wurde beobachtet, dass Fibrillen bei sehr geringer Monomerkonzentration wieder zu monomeren Einheiten dissoziieren können [74]. Das Gleichgewicht verschiebt sich dann in Richtung Monomer. Auch bei kleineren Oligomeren wurde beobachtet, dass sie im Bereich der sehr geringen physiologischen Konzentrationen mit der Zeit kleiner wurden und wieder vermutlich zu Monomeren dissoziierten [75]. In einer schematischen Zeichnung sind die Tendenzen des Gleichgewichts bei hoher und niedriger Proteinkonzentration dargestellt:



Abb. 34: Vereinfachte Darstellung möglicher Gleichgewichtsszenarien von Monomeren und Aggregaten

(A) Dynamisches Gleichgewicht zwischen Monomeren und Aggregaten. Die Hin- und Rückreaktionen sind durch die Pfeile mit der Assoziatrionsrate  $(k_a)$  bzw. Dissoziationsrate  $(k_d)$  dargestellt. (B) Bei hoher Proteinkonzentration [P] verschiebt sich das Gleichgewicht auf die Seite der Aggregate und bei (C) niedriger Proteinkonzentration verschiebt sich das Gleichgewicht auf die Seite der Monomere. Dieses Schema ist stark vereinfacht und bildet keine Intermediatzustände (z.B. Nukleus) ab und differenziert nicht zwischen einzelnen Aggregationsspezies wie z.B. Oligomeren oder Fibrillen.

Zur Überprüfung der Amplifikation synthetisch hergestellter A $\beta$ -Oligomere auf der Oberfläche wurde eine sehr hohe Seedkonzentration von 1  $\mu$ M (Monomere in Seeds) an die Fängerantikörper gebunden (s. Kapitel 3.1). In diesem Experiment lag das Gleichgewicht bei der eingesetzten Seedkonzentration von 1  $\mu$ M womöglich stark auf der Seite der aggregierten Seeds, weshalb die Amplifikation in diesem Fall auf der Oberfläche deutlich zu erkennen war (Abb. 9).

Für die Detektion war aufgrund der hohen Konzentration nur eine geringe Belichtungszeit nötig, weshalb vermeintliches Hintergrundrauschen möglicherweise nicht erfasst wurde. Nachdem in den Folgeexperimenten eine Anpassung der technischen Parameter aufgrund von geringeren Seedkonzentrationen nötig war, wurde eine starke Zunahme des Hintergrundrauschens durch die Verwendung des Substrats und insbesondere des Fluorochrommarkierten Substrats beobachtet (s. Kapitel 3.2). Das erzeugte Hintergrundrauschen führte
zu einem geringeren Signal-Rausch-Verhältnis, wodurch eine Signalverstärkung durch eine mögliche Amplifikation bei geringer Seedkonzentration nicht festgestellt werden konnte. Es ist anzunehmen, dass bei hoher Seedkonzentration und einer geringen Belichtungszeit lediglich ein geringer Anteil der gebundenen und amplifizierten Seeds detektiert wurde (Abb. 9). Diese Vermutung wird durch die relativ geringe Partikelanzahl gestützt, die im Vergleich zur Partikelanzahl aus weiteren Experimenten mit geringerer Seedkonzentration reduziert war. Auf den Beispielbildern von 100 nM Seeds mit angepasster Belichtungszeit waren vergleichsweise viele Partikel zu erkennen (für Beispiele s. Experimente in Kapitel: 3.2.1, 3.2.3 und 3.2.3).

## 4.2 Strategien zur Verhinderung falsch-positiver Signale sind unzureichend bei starker Selbstaggregation und bei der Bildung von polyvalenten Aggregaten

#### Die Verwendung von Blockierungspeptiden

Falsch-positive Signale können durch Fluorochrom-markiertes Substrat oder spontan entstandene Aggregate entstehen, die spezifisch mit den Fängerantikörpern interagieren können (s. schematische Abbildung 11). Eine sterische Blockierung sollte daher durch ein Blockierungspeptid erfolgen, das an die freien Fängerantikörper bindet. Die Peptide  $A\beta_{14}$ und A $\beta_{15}$  beinhalteten das Epitop für die Fängerantikörper 6E10 oder Nab228. Durch einen bis zu 10-fachen molaren Überschuss der Blockierungspeptide über dem A $\beta_{42}$ -Monomer (=Substrat) oder in aggregierter Form (zur Simulierung spontan entstandener Aggregate) sollten die freien Fängerantikörper besetzt werden. Kleine Peptide sind aufgrund eines größeren Diffusionskoeffizienten im Vergleich zu größeren Aggregaten kinetisch begünstigt und können schneller zu den Fängerantikörpern gelangen (s. u. Abb. 35A). Daher konnten in unseren Experimenten eine effektive Blockierungseffektivität für spontan entstandene Aggregate bis zu etwa einer Stunde erreicht werden. Die Fängerantikörper aus der Immunglobulin G (IgG) Klasse besitzen divalente Antigenbindestellen, die durch die Blockierungspeptide lediglich durch eine monovalente Bindung besetzt werden können (s. u. 35A). Dies ist möglicherweise der Grund für eine stärkere Blockierung durch das  $A\beta_{15}$ -Peptid, das durch ein zusätzliches Cysteamin am C-Terminus Dimere durch die Oxidation der Thiole ausbilden kann. Die Blockierungseffektivität konnte von  $26\,\%$  durch die Verwendung von A $\beta_{14}$  auf 87% durch die Verwendung von A $\beta_{15}$  (potenzielles Dimer) gesteigert werden (s. Abb. 15E). Zur Auflösung einer divalenten Bindung, wie es bei einem A $\beta_{15}$ -Dimer der Fall wäre, müssten beide Bindungen gleichzeitig gelöst werden [58]. Die Wahrscheinlichkeit, dass dieses Ereignis eintritt, ist im Vergleich zur Auflösung einer Einzelbindung viel geringer, weshalb die Bindung um  $10^3 - 10^7$ -fach stärker im Vergleich zur entsprechenden monovalenten Bindung sein kann [58]. Trotz der starken Bindung des  $A\beta_{15}$ -Peptids konnte keine ausreichend stabile Blockierung über einen längeren Zeitraum während eines Amplifikationsassays hergestellt werden (s. Kapitel 3.2.1). Oligomere, beziehungsweise spontan entstandene Aggregate, die aus mehreren Aβ-Einheiten bestehen, haben mit großer Wahrscheinlichkeit mehrere zugängliche Epitope (s. u. 35B) und bieten daher gegenüber einem Molekül mit nur einem oder zwei Epitopen polyvalente Bindungsstellen. Dadurch können die Blockierungspeptide durch Oligomere verdrängt werden (s. u. 35C). Hinzu kommt eine reziproke Abhängigkeit des Diffusionskoeffizienten von der Größe des Moleküls. Mit zunehmender Molekülgröße wird der Diffusionskoeffizient dementsprechend kleiner und das Molekül bewegt sich langsamer in Lösung (Formel 2).

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_0} \tag{2}$$

D = Diffusionskoeffizient  $[m^2 \cdot s^{-1}]$ ,  $k_B$  = Bolzmann-Konstante  $[J \cdot K^{-1}]$ , T = Temperatur [K],  $\eta$  = dynamische Viskosität des Lösungsmittels  $[N \cdot s \cdot m^{-2}]$ ,  $R_0$  = hydrodynamischer Radius der diffundierenden Teilchen [m].

Dies führt dazu, dass ein kurzzeitig von dem Fängerantikörper gelöstes Oligomer aufgrund der geringen Diffusionsgeschwindigkeit und einer weiteren Bindung in räumlicher Nähe zum Fängerantikörper verweilt, wodurch eine erneute Bindung unmittelbar eingegangen werden kann (s. u. 35D). Die Oligomer-Antikörper-Bindung ist aus diesen Gründen als nahezu irreversibel anzusehen.



Abb. 35: Verdrängung der Blockierungspeptide durch polyvalente Bindungsmöglichkeiten der Oligomere

(A) Kleine Blockierungspeptide mit großem Diffusionskoeffizienten D gelangen schnell zu den Fängerantikörpern und binden monovalent an eine von zwei Bindestellen. (B) Große Oligomere mit kleinem Diffusionskoeffizienten diffundieren langsam zu den Fängerantikörpern und bilden eine starke divalente Bindung. (C) Oligomere verdrängen Blockierungspeptide mit einfacher Bindung. (D) Bei Lösung einer einfachen Bindung des Oligomers bleibt die räumliche Nähe zum Fängerantikörper aufgrund einer weiteren Bindung und einem geringen D bestehen. Die divalente Bindung kann unmittelbar wieder hergestellt werden.

#### Inhibierung der spontanen Aggregation durch BSA

Eine weitere Strategie umfasste die Inhibierung der spontanen Aggregation durch die Verwendung von Bovines Serumalbumin (BSA), einem ca. 70 kDa schweren Protein, das aus Rinderplasma gewonnen wird und als Äquivalent zum Humanen Serum-Albumin (HSA) eingesetzt werden sollte. HSA ist mit einer Konzentration von über 600 µM das häufigste Plasmaprotein und bindet bis zu 89% Plasma-Aß [76, 77]. In CSF ist die HSA-Konzentration mit  $3 \mu M$  sehr viel geringer als in Plasma [78]. Durch die Verwendung von BSA sollte in den Amplifikationsassays dieser Arbeit eine schnelle Inhibierung der spontanen Aggregation durch die Bindung der Monomere erzielt werden [59, 34]. Das BSA und die Seeds sollten dabei um die Monomere konkurrieren. Hierbei wurde angenommen, dass die Bindung von Aβ zu BSA viel schwächer als die spezifische Aβ-Seed-Bindung sei. Die Dissoziationskonstanten  $(K_d)$  von etwa 5-10  $\mu$ M von HSA und A $\beta$  [77] und etwa 5  $\mu$ M von BSA und A $\beta$  [59] können wie vermutet als schwach eingestuft werden, wohingegen beispielsweise eine  $K_{\rm d}$  von 500 nM für das A $\beta_{40}$ -Fibrillenwachstum [79] sehr viel stärker ist. Idealerweise sollte nach dieser Hypothese die Amplifikation der Seeds nicht beeinträchtigt werden, da sich das gebundene Monomer bei räumlicher Annäherung zum Seed und hoher Affinität wieder lösen sollte.

Die Experimente zeigten wie erwartet eine starke Inhibierung der spontanen Aggregation, wie durch eine Verzögerung der *lag-Phase* bereits bei der niedrigst gewählten BSA-Konzentration deutlich wurde (s. Kapitel 3.2.2). Zusätzlich deuteten reduzierte ThT-Plateau-Werte in Anwesenheit von BSA auf einen viel geringeren aggregierten Anteil und dementsprechend höherem monomeren Anteil im Gleichgewicht der Reaktion hin (17A). Entgegen den Erwartungen zeigte sich aber auch eine starke Inhibierung der Amplifikation in Anwesenheit von Seeds (17B+D), da die ThT-Plateau-Werte ebenfalls durch BSA stark reduziert wurden. Die *lag-Phase* war im Vergleich zur spontanen Aggregation weniger stark durch die Zugabe von BSA beeinflusst, weshalb von einer stärkeren Inhibierung der spontanen Aggregation auszugehen ist (17B).

Dass BSA die Amplifikation inhibieren kann, wurde bereits von anderen Forschungsgruppen durch eine verminderte Wachstumsrate von A $\beta$ -Fibrillen festgestellt [80, 78]. Inwieweit BSA unterschiedliche A $\beta$ -Spezies binden kann ist jedoch nicht vollständig geklärt und muss in weiteren Experimenten untersucht werden [81]. Wang et al. schlagen eine Bindung von A $\beta$  in der hydrophoben Furche von BSA in einer 1:1 Stöchiometrie vor, wodurch Monomere nicht mehr für das Fibrillenwachstum zur Verfügung stünden [59]. Milojevic et al. beobachteten Bindungen von HSA und A $\beta$ -Oligomeren, nicht aber Monomeren oder Fibrillen [81, 82]. Auch Bohrmann et al. konnten keine Interaktion von monomerem A $\beta$  mit HSA oder BSA beobachten [78]. Eine Interaktion von Fibrillen mit HSA und BSA konnte aber nachgewiesen werden [78]. In der Literatur ergibt sich bezüglich der A $\beta$ -HSA/BSA-Interaktion kein einheitliches Bild.

Aus den Experimenten in dieser Arbeit lassen sich keine klaren Aussagen über den Me-

chanismus der Inhibierung treffen. Da aber die *lag-Phase* der spontanen Aggregation in Anwesenheit von BSA verzögert wurde, ist eine BSA-Aβ-Monomer Bindung wahrscheinlich. Ob dies auch die Ursache für die Inhibierung der Amplifikation ist oder ob BSA an die Seeds bindet und dadurch Bindungsmöglichkeiten der Monomere blockiert [81], geht aus diesen Experimenten nicht hervor.

#### Die Verwendung von trunkiertem Substrat, dessen Bindung an den Fängerantikörper durch das fehlende Epitop verhindert ist

Eine zu den Blockierungspeptiden komplementäre Strategie sollte die Verwendung eines Substrats bieten, das nicht an die Fängerantikörper binden kann (s.Kapitel 3.2.3). Die Fängerantikörper 6E10 und Nab228 binden die Epitope im Bereich der Aminosäuren 3-8 beziehungsweise 1-11. Mit der Wahl des A $\beta$ -Substrats  $A\beta_{11-42}$  wurde das erforderliche Epitop für eine spezifische Interaktion ausgelassen, wodurch Hintergrundrauschen durch das Substrat oder spontan entstandene Aggregate nicht erzeugt werden sollte. Eine spezifische A $\beta_{11-42}$ -Antikörper-Interaktion konnte in Kontrollexperimenten ausgeschlossen werden (18A+B).

Ein weiteres Kriterium für die Eignung als Substrat war die Ko-Aggregation von A $\beta_{11-42}$ -Substrat mit  $A\beta_{42}$ -Seeds, obwohl die ersten zehn N-terminalen Aminosäuren des Substrats fehlten. Selbst das Fehlen von nur zwei Aminosäuren am C-Terminus, wie bei der  $A\beta_{40}$ -Variante, kann eine Ko-Aggregation mit  $A\beta_{42}$  verhindern [83]. N-terminal trunkierte A $\beta$ -Varianten, insbesondere an den Positionen einer Glutaminsäure (E): A $\beta_{3-x}$  und  $A\beta_{11-x}$ , wurden überraschender Weise zusammen mit Volllängen- $A\beta$  in Plaques gefunden [84]. In in vitro Experimenten von Barritt et al., die auf Größenanalysen mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)-Messungen basierten, konnte eine Ko-Aggregation von  $A\beta_{42}/A\beta_{11-42}$  nachgewiesen werden [85]. In dieser Arbeit wurde die Ko-Aggregation durch Beobachtung des Aggregationsverlaufs mittels ThT bestätigt, indem  $A\beta_{11-42}$  Substrat in Anwesenheit von  $A\beta_{42}$ -Seeds aggregierten (18A+B). Eine geringe  $A\beta_{11-42}$ -Konzentration aggregierte in Abwesenheit von  $A\beta_{42}$  nur in einem von zwei Fällen mit starker zeitlicher Verzögerung (18C+D). In einer unabhängigen Wiederholung dieser Bedingung wurde keine Aggregation von  $1 \,\mu M \, A\beta_{11-42}$  ohne Seeds beobachtet (s. Anhang 42A), während durch Zugabe von A $\beta_{42}$ -Seeds eine Aggregation beziehungsweise Amplifikation durch einen sofortigen Anstieg der ThT-Fluoreszenz zu erkennen war.

Obwohl die Voraussetzungen für ein geeignetes Substrat zur A $\beta_{42}$ -Amplifikation A $\beta_{11-42}$ gegeben waren, wurde unspezifisches Signal im sFIDA gemessen, das auf eine unspezifische A $\beta_{11-42}$ -Oberflächeninteraktion zurückgeführt wurde (s. Kapitel 3.2.3). Unspezifische Oberflächenwechselwirkungen sind oftmals ein Problem in der Assayentwicklung, weshalb die Oberfläche inklusive Blockierungsschritt für jeden Assay angepasst werden muss [86]. Neben gängigen Blockierlösungen, die auf BSA oder Milchpulver basieren, sind auch kommerzielle Blockierlösungen erhältlich. Einige wurden in Kapitel 3.2.3 für die Blockierung von A $\beta_{11-42}$  getestet. Eine Verhinderung der unspezifischen Wechselwirkungen trägt zu einem größeren Signal-Rausch-Verhältnis bei [86], das aber wegen der erwähnten unspezifischen Bindung der spontan entstandenen Aggregate an die Oberfläche in diesen Experimenten zu gering war. Ein möglicher Amplifikationseffekt war dadurch vermutlich nicht zu erkennen. Blockierlösungen aus BSA oder Milchpulver konnten unter allen getesteten Blockierungsreagenzien spontan entstandene A $\beta_{11-42}$ -Aggregate am effektivsten blockieren (Abb. 22). Ein erwarteter Amplifikationseffekt auf der Oberfläche konnte trotz alle dem im sFIDA nicht beobachtet werden (Abb. 22). Mögliche Gründe hierfür werden im nachfolgenden Kapitel diskutiert.

## 4.3 Sterisch eingeschränkte Zugänglichkeit der Seeds als mögliche Ursache für fehlende Amplifikation

Das Aβ-Peptid ist mit einem Molekulargewicht von ca. 4,5 kDa ein relativ kleines Peptid. Unter der Annahme, dass ein A $\beta$ -Oligomer aus 10 dicht gepackten monomeren Einheiten bestünde, kann das gebundene Oligomer durch einen dreifach schwereren IgG Antikörper räumlich bedeckt werden (s. schematische Abb. 36A). Durch die Verdeckung potenzieller Bindestellen für das Substrat, kann die Amplifikation gehemmt werden. Genau diese Eigenschaft wird zum Teil in der therapeutischen Entwicklung für die Inhibierung der Amyloidbildung genutzt. Galant et al. entwickelten einen konformationsspezifischen Antikörper, der schädliche und stabile Oligomere des humanen Serum-Transportprotein Transthyretin einfängt und inaktiviert. Transthyretin liegt nativ als Tetramer vor, dessen Monomere sich bei Dissoziation umfalten können und amyloide Strukturen ausbilden können. Zunächst bilden die Monomere dabei einen stabilen Nukleus, der für das weitere Fibrillenwachstum erforderlich ist [87]. Der entwickelte Antikörper soll die stabile Konformation des Nukleus unterbrechen und dadurch die lag-Phase erheblich verzögern [87]. Des Weiteren basiert die Bindung des Antikörpers an Fibrillenenden, die die Autoren als Cap bezeichnen, ebenfalls auf eine sterische Blockierung, wodurch die Bindung der Monomere an die Fibrillenenden verhindert wird [87].

Auch A $\beta$ -Oligomere sind von begrenzter Stabilität und erfahren in einem dynamischen Gleichgewicht zahlreiche Konformationsänderungen innerhalb des Aggregationsprozesses, bis sich letztlich strukturell hochgradig geordnete Strukturen ausgebildet haben [88]. Ein ähnlicher Mechanismus der Inhibierung, wie bei dem oben beschriebenen therapeutischen Antikörper, wäre denkbar. Die Bindung des Antikörpers an die konformativ flexiblen Oligomere verursacht möglicherweise eine Störung der dynamischen Struktur, die für die Anlagerung weiterer Monomere nötig wäre. Die Bindung würde dann auch entropischen Änderungen bewirken, die die Amplifikation behindern (Abb. 36B). Die Entropie (S) ist ein Maß für die Zahl der verschiedenen äquivalenten Energiezustände oder räumlichen Anordnungen, in denen ein System auftreten kann. Je mehr Freiheitsgrade ein System aufweist (z.B. durch Schwingungen oder Rotation), desto größer ist die Entropie. Über die Änderung der Entropie in einem System lässt sich ableiten, ob eine Reaktion (z.B. Anlagerung des Substrats an einen Seed) freiwillig und spontan ablaufen würde. Bindungen sind aber in den meisten Fällen entropisch ungünstig, da sie Bewegungsfreiheiten einschränken [89]. Bezüglich des an den Fängerantikörper gebundenen A $\beta$ -Oligomers besitzt ein in der Lösung freies Oligomer mehr Freiheitsgrade, da es frei durch die Lösung diffundieren kann (Translationsenergie), frei rotieren kann und die Möglichkeiten der Schwingungen größer im Vergleich zum gebundenen Seed sind (s. schematische Abb. 36B). Der Entropiegewinn kann zur Spontaneität einer Reaktion führen, jedoch ist eine Reaktion nicht allein von der Entropie abhängig, sondern auch von der Stärke der Bindung und der intermolekularen Kräfte, was sich quantitativ in der Enthalpie (H) (die bei einer Reaktion abgegebene Wärme an die Umgebung) niederschlägt.

Aufgrund der oben erläuterten Einschränkungen wurde der Amplifikationsschritt in den weiteren Experimenten zunächst in Lösung, das heißt mit geringerem Entropieverlust, vollzogen und die amplifizierten Seeds anschließend an den Fängerantikörper gebunden (s. Kapitel 3.2.3).



Abb. 36: Sterische und entropische Einschränkungen der gebundenen Seeds

(A) Der gebundene Seed ist sterisch eingeschränkt wodurch nicht die gesamte Seedoberfläche für das Substrat zugänglich ist. Der freie Seed in Lösung ist hingegen von allen Seiten für das Substrat zugänglich. (B) Die Entropie S des gebundenen Seeds wird aufgrund geringerer Freiheitsgrade kleiner. Der Seed ist in seiner Rotationsbewegung und Schwingung eingeschränkt und kann auch strukturelle Flexibilität verlieren. Der ungebundene Seed in Lösung verfügt über mehr Freiheitsgrade und kann sich im dreidimensionalem Raum in alle Richtungen drehen. Verglichen mit dem gebundenen Seed sind mehr Schwingungen möglich. Die Entropie wird größer.

# 4.4 Indirekter Nachweis der Amplifikation in Lösung durch das A $\beta_{11-42}$ -Substrat

Damit A $\beta_{42}$ -Seeds durch das A $\beta_{11-42}$ -Substrat ohne sterische oder entropische Einschränkungen amplifiziert werden können, sollte der Amplifikationsschritt vorab in Lösung erfolgen. Da das Substrat nachweislich nicht spezifisch an den Fängerantikörper binden konnte (s. Kapitel 3.2.3), sollte die Bindung durch den ursprünglichen A $\beta_{42}$ -Seed erfolgen. Dies würde voraussetzen, dass zumindest einige Epitope auch nach der Amplifikation zugänglich blieben, wie bei einem linearen Wachstum von Fibrillen [74] zum Beispiel anzunehmen wäre.

Ein umgekehrter Effekt zeigte sich in diesem Experiment, bei dem mit stärkerer Am-

plifikation weniger Bindung an den Fängerantikörper erfolgte (s. 23C). Die Ursache liegt möglicherweise an dem angelagerten  $A\beta_{11-42}$ -Substrat, das die Epitope der Seeds überdecken konnte (s. schematische Abbildung 37). Neben der linearen Polymerisation gibt es weitere Aggregationswege, die eine Verdeckung des ursprünglichen Seeds durch Substratanlagerung erklären würden. Es können zum Beispiel Oligomere mit unterschiedlichen Größen oder amorphe Aggregate entstehen [49, 90]. Zhang et al. beobachteten eine beschleunigte Bildung von globulären Oligomeren unterschiedlicher Größe in Anwesenheit von Zn<sup>2+</sup>-Ionen. Diese enthielten im Vergleich zu Fibrillen weniger β-Faltblatt-Anteile und waren unfähig zur Fibrillenbildung oder linearem Wachstum [91]. Zhu et al. fanden in Studien zur Oberflächen-katalysierten Amplifikation einer variablen Domäne einer amyloiden Leichtkette Fibrillen, die aus einer amorphen Ansammlung von Aggregaten wuchsen [92]. Ein weiterer möglicher Aggregationsweg wurde für das Hormon Glukagon beobachtet, bei dem kontinuierlich neue Fibrillen durch Verzweigungen der Hauptfibrille entstanden [93]. Ob diese Art der Aggregation auch in dem Fall von A $\beta_{11-42}$  erfolgte, müsste jedoch in weiteren Experimenten untersucht werden. Es ist aber festzuhalten, dass in vorherigen Amplifikations-Studien von Ban et al. und Andersen et al. mit  $A\beta_{40}$  ein verzweigtes Längenwachstum wie bei Glukagon ausgeschlossen wurde [94, 93].





 $A\beta_{42}$ Seeds werden durch das  $A\beta_{11-42}$ Substrat stark amplifiziert, wodurch die Epitope der Seeds verdeckt werden. Eine Bindung zum Antikörper ist dadurch verhindert.

In dieser Arbeit konnte die Amplifikation der A $\beta_{42}$ -Seeds in Lösung durch das A $\beta_{11-42}$ -Substrat indirekt nachgewiesen werden, da mit zunehmender Substratkonzentration weniger Bindung der amplifizierten Seeds an den Fängerantikörper erfolgte. In vorherigen Experimenten konnte jedoch eine unspezifische A $\beta_{11-42}$ -Oberflächenwechselwirkung beobachtet werden (s. Abb. 18B, 20C+D, 21). Auch in diesem Experiment des indirekten Amplifikationsnachweis zeigte sich vermutlich eine unspezifische Oberflächenwechselwirkung bei der interessanterweise das ko-lokalisierte Signal der rot-markierten Seeds und des grün-markierten Substrats mit steigender Substratkonzentration zunahm (s. 23D).

Der indirekte Nachweis der Amplifikation wurde nur anhand der Nutzung einer Kontrolle möglich, in der kein Substrat hinzugegeben wurde. Dieses Signal diente als Referenz des zu erwartenden Signals, da die A $\beta_{42}$ -Seeds uneingeschränkt an die Fängerantikörper binden konnten und in diesem Experiment das stärkste Signal erzeugten. Der indirekte Nachweis ist jedoch für die Amplifikation natürlich vorkommender Seeds, das heißt für die Diagnose, bedauerlicher Weise nicht anwendbar.

#### 4.5 Amplifikation von α-Synuclein auf der Oberfläche

Das in der Pathologie der Parkinson-Krankheit (PD) hoch relevante Protein α-Synuclein besitzt im Vergleich zu A $\beta$  eine geringere Neigung zur spontanen Aggregation und ist für die Amplifikation auf der Oberfläche im sFIDA geeignet. Besonders bei neutralem pH ist die spontane Aggregation von α-Synuclein in Abwesenheit von aggregationsfördernden Mitteln, zum Beispiel Schüttelbedingungen oder die Zugabe von Tensiden, stark eingeschränkt und in *in vitro*-Experimenten mit einer Zeitskala von einigen Stunden oder wenigen Tagen nicht nachweisbar [95]. In einem ThT-Aggregationsexperiment<sup>6</sup> mit einer  $\alpha$ -Synuclein-Konzentration von 10  $\mu$ M bei pH 7,5 konnte auch in dem ThT-Experiment dieser Arbeit selbst nach drei Tagen keine spontane Aggregation nachgewiesen werden (s. 26B). In vitro kann  $\alpha$ -Synuclein sogar über Wochen bei milden Bedingungen<sup>7</sup> kinetisch stabil bleiben ohne zu aggregieren [96]. Während die spontane Aggregation unter neutralen pH-Bedingungen stark unterdrückt wird, ist in Anwesenheit von fibrillären α-Synuclein -Seeds die Verlängerung der Fibrillen (auch *Elongation*) der dominierende Aggregationsprozess [95]. In dem ThT-Experiment dieser Arbeit konnte selbst in Anwesenheit von  $100 \,\mathrm{pM}$  Seeds keine Amplifikation innerhalb von drei Tagen durch Zugabe von  $10 \,\mathrm{\mu M}$  (s. 26B) oder 30 µM (Daten nicht gezeigt) nachgewiesen werden. ThT-Assays in einer Mikrotiterplatte ermöglichen die Beobachtung des Aggregationsverlaufs eines Proteins in Lösung und liefern Signale als Gesamtfluoreszenz, wodurch die Sensitivität begrenzt ist und Unterschiede in den Signalen bei sehr geringeren Proteinkonzentrationen nicht erfasst werden können.

Bei der Messung einer A $\beta_{42}$ -Konzentrationsreihe mittels ThT-Fluoreszenz im Plattenlesegerät erzeugte beispielsweise keine der getesteten Konzentrationen (bis zu 100 nM) ein deutlich stärkeres Signal als die Kontrolle (s. Anhang 44). Im Gegensatz zu den ThT-Fluoreszenzsignalen wird bei der sFIDA-Technologie die Sensitivität durch die Detektion auf Partikelebene und durch die Automatisierung stark erhöht [32, 33]. Dadurch konnte im sFIDA eine A $\beta$ -Konzentration ab 10 pM deutlich von der Kontrolle unterschieden werden (s. Anhang 44C).

Für  $\alpha$ -Syn konnte im weiteren Verlauf dieser Arbeit, nachdem die Lösungsbedingungen für die Amplifikation und Detektion mittels sFIDA entwickelt wurde, die Nachweisgrenze im unteren Konzentrationsbereich herabgesetzt werden (s. u.).

Die kritische Aggregationskonzentration liegt für  $\alpha$ -Syn-Monomere im physiologischen pH-Bereich und NaCl-Zugabe bei etwa 10-15  $\mu$ M [69, 97]. Im Vergleich zu A $\beta_{42}$  – mit einer kritischen Aggregationskonzentration von 60-120 nM und ähnlichen Pufferbedin-

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup>ThT-Aggregationsexperimente wurden in einer 96er Mikrotiterplatte durchgeführt und mit einem Plattenlesegerät vermessen

 $<sup>^7</sup> eine physiologischen Proteinkonzentrationen von etwa 50\,\mu\mathrm{M},$ neutraler pH, Raumtemperatur und in Abwesenheit von katalytischen Oberflächen

gungen [56] – liegt die kritische  $\alpha$ -Synuclein-Konzentration für die spontane Aggregation um etwa zwei Größenordnungen höher. In ThT-Aggregationsexperimenten ist bei einer A $\beta_{42}$ -Konzentration im mikromolaren Bereich die spontane Aggregation bereits innerhalb der ersten Stunden zu beobachten [98]. In dieser Arbeit konnte die spontane Aggregation von 5  $\mu$ M A $\beta_{42}$  bei pH 7 bereits nach einer halben Stunde durch ein stark ansteigendes ThT-Signal detektiert werden (s. Anhang 43). Auch die geringen *lag-Phasen* von wenigen Stunden der spontanen Aggregation bei höheren pH-Werten demonstrieren die hohe Aggregationsneigung von A $\beta_{42}$ .

Aufgrund dieses entscheidenden Vorteils wurde α-Syn als Anwendungsbeispiel für die Amplifikation und Detektion im sFIDA mit dem Ziel zur diagnostischen Anwendung beziehungsweise Diagnoseunterstützung gewählt. Erste Experimente, bei denen die Seeds zunächst an die Fängerantikörper gebunden wurden und anschließend durch das Substrat während einer langen Inkubationszeit amplifiziert wurden, zeigten Mikrometer-lange Fibrillen, die mit einem Seed ko-lokalisierten (s. Abb. 26C). Dies war der erste Nachweis, dass ein amyloides Protein im sFIDA amplifiziert werden konnte. Dieser Konzeptnachweis verdeutlicht, dass bei geringer Neigung zur spontanen Aggregation, die Seeds prinzipiell auf der Oberfläche amplifiziert werden können. Die Substratkontrolle dieses Experiments, in der keine Seeds hinzugegeben wurden, wies nämlich keine Fibrillen oder spontan entstandene Aggregate auf (s. Abb. 26C). Dadurch konnten Proben mit einer Mindestkonzentration von 100 pM Seeds zunächst ohne weitere Optimierungsschritte durch die Bildung von Fibrillen klar von der Kontrolle unterschieden werden (s. Abb. 26C). Der Einfluss der spontanen Aggregation wird hier noch einmal besonders deutlich, da diese bei Aβ hohes Hintergrundrauschens in der Kontrolle erzeugte, woraus ein reduziertes Signal-Rausch-Verhältnis resultierte. Eine Amplifikation konnte dadurch oftmals nicht nachgewiesen werden (s. o.).

## 4.6 Optimierungsschritte resultierten in der Amplifikation in Lösung unter basischen Bedingungen

Die Bedingungen für eine optimale Amplifikation mit dem geringstmöglichen Anteil spontaner Aggregation wurden parallel für die Proteine  $\alpha$ -Syn und A $\beta$  angepasst. Insgesamt wurden der pH-Wert, die Substratkonzentration, der Anteil an Fluorochrom-konjugiertem Substrat und die Zugabe von NaCl variiert. Außerdem wurde die Amplifikation auf der Oberfläche und in Lösung getestet (s. Kapitel 3.3.2).

Im Allgemeinen ist ein niedrigerer pH mit einer schnelleren Aggregation verbunden [70, 99]. Kobayashi et al. untersuchten die A $\beta$ -Aggregation in einem breiten pH-Spektrum von 3,4-9,5 und beobachteten die stärkste Aggregation im Bereich von pH 6-8 und konnten überraschenderweise keine Aggregation bei pH-Werten unter 5 oder über 9,5 feststellen. Kobayashi et al. betonten die Relevanz der intra- und intermolekularen Salzbrücken, die sich zwischen dem Aspartat(23) und dem Lysin(28) ausbilden und für die Stabilität der Oligomere und Fibrillen entscheidend sind. In dem pH-Bereich von 6-8 liegen Aspartat(23)-COO<sup>-</sup> deprotoniert und Lysin(28)-NH<sub>3</sub><sup>+</sup> protoniert vor, wodurch die Salzbrücke ausgebildet werden kann [66].

Erst vor Kurzem sahen Schützmann et al. eine stark beschleunigte Bildung von A $\beta$ -Oligomeren unter endo-lysosomalen pH-Bedingungen von ~ 4,5-5,5 [100]. Gleichzeitig wurde die Fibrillenbildung mit steigender Oligomerbildung unter sauren Bedingungen verzögert [100]. Diese Ergebnisse bestätigen, dass A $\beta$  auch im niedrigeren pH-Bereich aggregieren kann und dass insbesondere in sauren Bedingungen die Aggregation stark beschleunigt ist. Gremer et al. konnten sogar mithilfe eines sehr sauren pH von 2 homogene A $\beta$ -Fibrillen herstellen, deren Struktur mittels Cryo-Elektronenmikroskopie gelöst werden konnte [101].

Bei  $\alpha$ -Syn dominieren sekundäre Nukleationsprozesse im sauren pH-Bereich von 3,6-5,6 [102]. Bei diesem Prozess wird die Oberfläche des eigenen Proteins (i. d. R. Fibrillen) für die Bildung von Nukleationskeimen genutzt, die wiederum zu weiteren Fibrillen wachsen können. Dieser Prozess ist aufgrund der multiplen Generierung neuer Fibrillen exponentiell. Außerdem stellten Hoyer et al. fest, dass ein pH-Wert in der Nähe des isoelektrischen Punkts<sup>8</sup> von  $\alpha$ -Syn ( $\sim$ 4,4) zu einer stark beschleunigten Aggregation führt [65].

Aufgrund der verstärkten Aggregation unter sauren pH-Bedingen wurden sowohl für Aβals auch für α-Syn-Amplifikation nur pH-Werte über 7,5 getestet. Interessanterweise resultierten die Optimierungsschritte in dieser Arbeit für α-Syn in ähnliche Parameter, wie sie bereits für die Bedingungen der *Real-Time Quaking Induced Conversion* (RT-QuIC)-Methode ermittelt wurden, die eine Amplifikations-basierte diagnostische Methode ist. Der pH-Wert der Lösungsbedingungen in den RT-QuIC-Messungen von humanen Hirnhomogenaten und CSF-Proben betrugen in den Studien von Han et al., Fairfoul et al. und Bargar et al. pH 8-8,2 und die Substratkonzentration reichte von 7-10 µM [103, 104, 105]. In dieser Arbeit wurden auch niedrigere Substratkonzentrationen von  $5\,\mu\mathrm{M}$  und  $1\,\mu\mathrm{M}$  getestet, jedoch stellte sich heraus, dass eine Konzentration von 1 μM α-Syn zu gering für eine Signalsteigerung durch Amplifikation war (s. Tabelle 4). Eine Konzentration von  $5\,\mu\mathrm{M}$  Substrat mit Zugabe von NaCl führte hingegen zu den stärksten Signalsteigerungen durch Amplifikation (Abb. 31). Salzionen können die Ladungen der Proteine abschirmen und dadurch die Konformation, Löslichkeit und die Aggregation beeinflussen [106]. Dieser Vorgang ist von der Salzkonzentration und von der spezifischen oder unspezifischen Interaktion der Ionen mit dem Protein abhängig [106]. In dem Experiment dieser Arbeit wurde eine Konzentration von 12,5 mM NaCl genutzt. Ramis et al. beobachteten eine aggregationsfördernde Wirkung bei moderaten Salzkonzentrationen von 100 mM und eine hemmende Wirkung auf die Aggregation bei hoher Salzkonzentration von über 1 M [106].

Ähnlich wie bereits für die A $\beta$ -Amplifikation beobachtet wurde, ist auch die Substratund Seedkonzentration für die Amplifikation bedeutend (s. o. Abb. 34). Afitska et al. untersuchten die Amplifikation von  $\alpha$ -Syn-Fibrillen und ermittelten eine kritische Konzen-

 $<sup>^{8}\</sup>mathrm{pH}\text{-Wert},$  bei dem die Nettoladung des Proteins 0 beträgt

tration von  $400 \,\mathrm{nM}$  in Anwesenheit von Seeds und eine kritische Konzentration von  $10 \,\mu\mathrm{M}$  für die spontane Bildung von Aggregaten [69].

Während für  $\alpha$ -Syn schon zahlreiche Ergebnisse zur Amplifikations-basierten Diagnostik existieren [38], wurden für A $\beta$  nur wenige Daten zur Amplifikation mit diagnostischem Hintergrund publiziert. Bei A $\beta$  mangelt es insbesondere an der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, wie sich auch in dieser Arbeit herausstellte. Die Schwierigkeiten der kontrollierten A $\beta$ -Aggregation sind allgemein bekannt [107]. Dies ist vermutlich der Grund, weshalb die Amplifikations-basierte Diagnostik für  $\beta$ -Amyloid-Erkrankungen im Vergleich zu Synucleinopathien wenig fortgeschritten ist. Daher sind die bisherigen Erfolge in diesem Bereich besonders wertzuschätzen.

Bei der RT-QuIC-Methode findet die Amplifikation in Lösung unter Schüttelbedingungen statt. Durch das Brechen der Seeds steigt die Zahl der Fibrillen exponentiell an, wodurch eine starke Amplifikation mit Signalsteigerung erfolgt. Das gemessene Signal ist die Gesamtfluoreszenz aggregierter Spezies, die durch einen Aggregat-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff erfolgt, wie zum Beispiel Thioflavin T (ThT). Die sFIDA-Methode ermöglicht hingegen durch fluoreszenzmikroskopische Bildaufnahmen Einzelpartikelsensitivität und die Quantifizierung einzelner Partikel aus den Proben. In dieser Arbeit konnte der Amplifikationsschritt für  $\alpha$ -Syn optional in Lösung oder direkt auf der Oberfläche vollzogen werden. Für die zukünftigen diagnostischen Anwendungsziele können zur zusätzlichen Sensitivitätssteigerung die Proben ähnlich wie bei RT-QuIC geschüttelt werden und anschließend auf die Oberfläche gebunden werden. In diesem Fall würde die Quantifizierung der ursprünglichen Partikelanzahl einer Probe aber nicht mehr möglich sein.

In den Experimenten dieser Arbeit wurde anders als in den Arbeiten von Pitschke et al., Salvadores et al. und An et al., nach umfangreichen Optimierungsarbeiten ein basischerer pH für die Amplifikation gewählt. Die Arbeiten der genannten Autoren wurden bei pH 7,2-7,4 durchgeführt [40, 38, 41, 42]. In dieser Arbeit wurde der pH-Bereich von 7,5-8,5 getestet und das Optimum der Amplifikation bei pH 8 aufgrund der geringe geringeren spontanen Aggregation ermittelt (29). Ein weiterer entscheidender Schritt war der Übergang der Amplifikation in Lösung, der als gemeinsame Überschneidung in der Durchführung der Amplifikation in den genannten Forschungsgruppen ist. Die Vorteile der Amplifikation in Lösung wurden ausgiebig in Kapitel 4.3 diskutiert. Für zukünftige Experimente der Amplifikation biologischer Seeds sollte aufgrund der unterdrückten spontanen Aggregation und bleibender Fähigkeit der Amplifikation ein basischer pH von 8 in Betracht gezogen werden.

## 4.7 Erster Nachweis der Amplifikation von α-Syn-Seeds aus einer biologischen Probe im sFIDA

Die  $\alpha$ -Syn-Amplifikation konnte zum ersten Mal anhand einer biologischen Probe im sFIDA gezeigt werden (Abb. 33). Hirnhomogenate transgener TgM83<sup>+/-</sup>-Mäuse wurden nach dem Protokoll von Henke behandelt [1], wodurch nach zusätzlicher Amplifikation die Probe der erkrankten Maus deutlich von der Kontrolle zu unterscheiden war (Abb. 33C). Die TgM83<sup>+/-</sup>-Linie produziert eine humane  $\alpha$ -Syn-Mutante, die bei einer familiären Parkinson-Erkrankung auftritt [71]. Nachdem einige Mäuse synthetische WT- $\alpha$ -Syn-Seeds intrazerebral verabreicht bekommen haben, zeigten sie starke pathologische Veränderungen im Gehirn und Rückenmark durch hohe  $\alpha$ -Syn-Aggregatlevel, die letztlich zu Entzündungsprozessen im zentralen Nervensystem führten [72]. Obwohl die A53T- $\alpha$ -Syn im Vergleich zum Wildtyp eine sehr starke Aggregationsneigung hat [108], entwickelten die Kontrollmäuse, die BSA anstatt Fibrillen verabreicht bekommen haben, keine Pathologien [72].

In dem Amplifikations-Experiment dieser Arbeit wurde nach Durchführung des PTA-Protokolls auch in der Kontrolle eine Signalzunahme beobachtet (Abb. 33C). Dies ist vermutlich hauptsächlich durch die Zentrifugationsschritte und nicht durch die PTA-Proteinfällung selbst zu erklären. Das PTA bewirkte nämlich eine Signalreduktion im Vergleich zur gleichbehandelten Kontrolle ohne PTA (Abb. 33C).

In der Probe der erkrankten Maus konnte die PTA-Proteinfällung anders als bei der Kontrolle das Signal zusätzlich steigern, weshalb unter den getesteten Bedingungen die PTA-Proteinfällung das größte Signal-Rauchverhältnis ergab (Abb. 33C). Der Mechanismus der PTA-Proteinfällung ist noch nicht vollständig verstanden. In der Prion-Diagnostik wird sie zur Reinigung von krankhaften PrP<sup>Sc</sup>-Partikeln aus Hirngewebe genutzt [53]. Es wurde beobachtet, dass negativ-geladene Wolframationen mit den positiven Ladungen der Phospholipide interagieren, wodurch die Lipide von den Proteinen gelöst werden können [54, 53].

In der physiologischen Funktion ist  $\alpha$ -Syn an regulierenden Prozessen und Interaktionen der Membran beteiligt [109], die hauptsächlich aus Phospholipiden besteht. Abhängig von der lokalen Ladung der Membran und der Anzahl der Membran-Bindungsplätze, wird die  $\alpha$ -Syn-Aggregation gefördert oder inhibiert [109]. Basierend auf dieser Erkenntnis ist in dieser Arbeit die relativ starke  $\alpha$ -Syn-Aggregation in der Kontrolle, in der die Lipide durch PTA nicht von den Proteinen getrennt werden konnten, die mögliche Ursache für die relativ starke Aggregation. Protein-Lipid-Komplexe wurden zudem vermutlich durch die Zentrifugationsschritte in dem PTA-Protokoll konzentriert und stellten ihre Lipidoberfläche für Aggregationsereignisse des  $\alpha$ -Syn-Substrat zur Verfügung. Dieser Ansatz der Begründung ist eher spekulativ; viel wahrscheinlicher ist die spontane Aggregation des endogenen Monomers aufgrund der Protokollabläufe, die sich fördernd auf die spontane Aggregation auswirken. Während der Durchführung des PTA-Protokolls wird die Probe für insgesamt 3 Stunden bei 37°C unter Schüttelbedingungen inkubiert (s. Protokoll in Abb. 8). Bekannterweise wirken sich solche Bedingungen fördernd auf die Aggregation aus, da die Seeds unter mechanischem Einfluss gebrochen werden und die Anzahl an Fibrillenenden für die lineare Polymerisation steigt [95].

Obwohl das Modell der TgM83<sup>+/-</sup>-Mauslinie für diese Art von Amplifikationsassays aufgrund der hohen Aggregationsneigung der α-Syn-A53T-Mutante nicht ideal ist, konnten die Seeds der erkrankten Maus nach der PTA-Proteinfällung amplifiziert werden. Dies ist der erste Nachweis der Ampifikation im sFIDA von Seeds aus einer biologischen Probe. Das Experiment ist aber aufgrund des geringen Probenumfangs mit Hirnhomogenat von jeweils einer Kontrollmaus und einer erkrankten Maus vorerst als Konzeptnachweis zu verstehen. In weiteren Experimenten sollte daher der Probenumfang erweitert werden, damit statistische Signifikanzen berechnet werden können.

Aufgrund von möglichen Matrixeffekten, wie der Maskierung der Seedoberfläche oder störende Wechselwirkungen des Substrats mit Proteinen oder Lipiden, wurde das Experiment zunächst auf der Oberfläche mit einer langen Inkubationszeit durchgeführt. Dabei wurde, anders als bei einer Seedkonzentrationsreihe in Puffer, eine weniger stark ausgeprägte Fibrillenbildung beobachtet (Abb. 33B+D). Vielmehr waren nach PTA-Proteinfällung und Amplifikation große ko-lokalisierte Partikel zu erkennen. Dies gibt einen Einblick in die Aggregation von Seeds aus biologischen Proben. Aufgrund des hohen Polymorphismus in natürlichen Aggregaten und der Schwierigkeit, die Struktur bei der Isolierung natürlicher Aggregate aus biologischen Proben durch harte Extraktionsbedingungen zu erhalten [49, 110], ist die Struktur natürlich vorkommender Aggregate noch nicht vollständig aufgeklärt. Die mikroskopischen Aufnahmen der amplifizierten Seeds erlauben eine Vorstellung des Amplifikationsmechanismus. Zukünftig soll das in dieser Arbeit optimierte Amplifikationsprotokoll für die natürlichen Seeds angepasst werden.

#### 4.8 Ausblick

In dieser Arbeit wurde die sFIDA-Technologie mit der Amplifikation von amyloiden Proteinen kombiniert. Für  $\alpha$ -Syn und A $\beta_{42}$  konnte jeweils ein Amplifikationsprotokoll erstellt werden, bei dem eine Signalsteigerung im unteren Seedkonzentrationsbereich gegenüber nicht-amplifizierten Proben erreicht wurde. Darüber hinaus wurde die Amplifikation von  $\alpha$ -Syn-Seeds aus Hirnhomogenat einer transgenen Maus nachgewiesen.

In Folgeexperimenten soll durch präanalytische Behandlungen, wie der PTA-Proteinfällung und der Verwendung von Detergenzien, die Amplifikation von natürlichen Seeds anhand der bisherigen Optimierungsarbeiten im Puffersystem kombiniert werden. Da die Amplifikation in Lösung gegenüber der Amplifikation auf der Oberfläche einige Vorteile aufweist, muss das Volumenverhältnis der behandelten Probe und des Substrats noch angepasst werden. Das Hauptziel ist die Entwicklung eines blutbasierten diagnostischen Tests, der durch Amplifkation den Nachweis geringer Oligomerkonzentrationen ermöglichen soll. Das optimierte Protokoll im Puffersystem soll hierbei als Vorlage genutzt werden. Die Probe kann vermutlich durch den signalverstärkenden Amplifikationseffekt ausreichend verdünnt werden, sodass mögliche Matrixeffekte reduziert werden können.

Auch wenn die Amplifikation in Lösung einige Vorteile hat, steckt ein hohes Potenzial in der Amplifikation von Oligomeren auf der Oberfläche. Das Vorhandensein von *on-* und *off-pathway-*Oligomeren und die Auswirkungen auf das Krankheitsbild sind bisher noch unklar. Die bisher klassischen Methoden zur Diagnose der Alzheimer-Krankheit oder Parkinson-Krankheit erlauben keine gleichzeitige Detektion von *on-* und *off-pathway-*Spezies.

Die sFIDA-Technologie könnte zur Identifizierung dieser Spezies eingesetzt werden, wenn Fluorochrom-konjugiertes Substrat mit einem Fluorochrom-konjugierten Detektionsantikörper kombiniert werden. Unter der Annahme, dass ein *off-pathway*-Oligomer nicht amplifiziert werden kann oder zumindest in seiner Größe und damit in der Anlagerung von Substrat beschränkt ist, kann Fluorochrom-konjugiertes Substrat für die Identifizierung von *on-pathway*-Oligomeren genutzt werden (s. Abb. 38A). Ein zusätzlicher Detektionsantikörper kann potenziell beide Arten von Oligomeren binden. Die Ko-Lokalisation würde dann ein *on-pathway*-Oligomer kennzeichnen wohingegen Signal aus nur einem Kanal ein *off-pathway*-Oligomer bedeuten würde (s. Abb. 38B).





(A) Fluorochrom-konjugiertes Substrat lagert sich nur an on-pathway-Oligomeren an. (B) Ein Fluorochrom-konjugierter Detektionsantikörper bindet beide Arten von Oligomeren, wodurch on- und offpathway-Oligomere durch entsprechendes ko-lokalisiertes bzw. Signal aus nur einem Kanal unterschieden werden können.

## 5 Anhang

#### sFIDA-Protokolle

Protokollnr.	Assayschritt	Beschreibung
1	Aminierung	$250\mu l \text{ APTES} + 5m l \text{ Toluol}$
		$10\mathrm{min}$ im Exsikkator Vakuum ziehen
		Exsikkator mit Argongas Ballon fluten, 1 h in-
		kubieren
		2 h Vakuum ziehen
	Spacer PEG	4  mM PEG-NHS/COOH in PBS, $10  min$ bei $10.000 \times \text{g}$ (RT) zentrifugieren
		20 µl/Vertiefung PBS in 384er Mikrotiterplat- te vorlegen
		20 µl PEG-NHS/COOH-Lösung/Vertiefung hinzugeben, 1 h inkubieren, RT
		$5\times$ mit 80 µl H <sub>2</sub> O waschen, 100 µl verbleiben im letzten Schritt
	COO <sup>-</sup> -Aktivierung	$200 \text{ mM EDC}$ und $50 \text{ mM NHS}$ in $H_2O$
	-	$10 \min \text{ bei } 10.000 \times \text{g} (\text{RT}) \text{ zentrifugieren}$
		80 µl/Vertiefung abnehmen
		$20\mu$ l EDC/NHS-Lösung hinzugeben, $30\mathrm{min}$ inkubieren, RT
		$5 \times$ mit 80 µl H <sub>2</sub> O waschen, 100 µl verbleiben
		im letzten Schritt
	Fängerantikörper	$5\mu\mathrm{g/ml}$ Nab 228 in $0.1\mathrm{M}$ NaHCO_3 ansetzten
		$(Endkonzentration 2,5  \mu g/ml)$
		$10 \min$ bei $10.000 \times g$ (RT) zentrifugieren
		80 µl/Vertiefung abnehmen
		20µl Fängerantikörper-Lösung hinzugeben, 4℃ über Nacht
		Jeweils $5 \times$ mit 80 µl TBST und TBS waschen, 100 µl verbleiben im letzten Schritt
	Blocken	80 µl/Vertiefung abnehmen
		80µl SmartBlock (RT), 1h bei RT
		Jeweils $5 \times$ mit 80 µl TBST und TBS waschen, 100 µl verbleiben im letzten Schritt
	Proben	Seeds sonifizieren: $3 \times 0,1$ Sekunden und $10\%$ Amplitude
		80 µl/Vertiefung abnehmen
		20 µl/Vertiefung Probenlösung hinzugeben, 1 h inkubieren
		$5\times$ mit 80 µl TBS waschen, 100 µl verbleiben im letzten Schritt
	Detektionsantikörper	80 µl/Vertiefung abnehmen
		20 µl/Vertiefung 0,31 µg/ml Nab228-633 in TBS, 1 h, RT
		$5 \times$ mit 80 µl TBS waschen, 100 µl verbleiben im letzten Schritt
	Messpuffer	80 µl/Vertiefung TBS-Proclin
	Technische Parameter	$40 \times, 35 \text{ ms}$ bei $\lambda = 653 \text{ nm}$ und Gain 20 und
		$35 \text{ ms}$ bei $\lambda = 493 \text{ nm}$ und Gain 20
	Experiment	Amplifikation von synthetischen $A\beta_{42}$ -Seeds über die Zeit im sFIDA (Abb. 9)

Tabelle 6: sFIDA-Protokolle

Protokollnr.	Assayschritt	Beschreibung
2	Fängerantikörper	2,5 µg/ml 6E10, 40 µl/Vertiefung in 0,1 M Carbonat über Nacht bei 4 °C
	Waschen	5x TBST, 5x TBS, 80 µl abziehen
	Blocken	80 µl TBS-Proclin + 0,5 % BSA für 1,5 h bei RT
	Waschen	5x TBST, 5x TBS, 80 µl abziehen
	Substrat	20 µl/Vertiefung 100 nM A $\beta_{42}$ Substrat, optio- nal davon 10 % rot markiertes HiLyte647-A $\beta_{42}$ in TBS-Proclin, ca. 20 h bei RT
	Waschen	5x TBS, 80 µl abziehen
	Detektionsantikörper	optional 20 µl/Vertiefung 0,31 µg/ml Nab 228-633
	Waschen	5x TBS, 80 µl abziehen
	Messpuffer	80 µl/Vertiefung TBS-Proclin
	Technische Parameter	$40\times,500\mathrm{ms}$ bei $\lambda{=}653$ nm und Gain $300$
	Experiment	Spontane Aggregation des Substrats und er- höhtes Hintergrundrauschen durch die Ver- wendung von markiertem Substrat (Abb. 10)
3	Fängerantikörper	2,5 µg/ml Nab 228, 40 µl/ Vertiefung in 0,1 M Carbonat über Nacht be i $4\ ^{\circ}\mathrm{C}$
	Waschen	5x TBST, 5x TBS, 80 µl abziehen
	Blocken	80 µl TBS-Proclin $+$ 0,5 % BSA für 1 h bei RT
	Peptide	80 µl abziehen, 20 µl/Vertiefung Blockierungspeptid in TBS-Proclin + $0.5$ % BSA für 30 min bei RT, mit 60 µl TBS-Proclin + $0.5$ % BSA auffüllen
	Waschen	5x TBST, 5x TBS, 80 µl abziehen
	Probe	20 µl/Vertiefung 100 nM 10% rot-markierte HiLyte 647-A $\beta_{42}$ Aggregate in TBS-Proclin + 0,5% BSA für 1 h bei RT
	Waschen	5x TBS, 80 µl abziehen
	Messpuffer	80 µl/Vertiefung TBS-Proclin
	Technische Parameter	$50\times,300\mathrm{ms}$ bei $\lambda{=}653$ nm und Gain $300$
	Experiment	Der Effekt von $A\beta_{14}$ und $A\beta_{15}$ -Cysteamin auf die Blockierung der freien Fängerantikör- per im sFIDA zur Verhinderung der Bindung spontan entstandener Aggregate (Abb. 13)

Protokollnr.	Assayschritt	Beschreibung
4	Fängerantikörper	2,5 µg/ml Nab228 oder 6E10, 40 µl/ Vert
		fung in 0,1 M Carbonat über Nacht bei 4 °C
	Waschen	5x TBST, 5x TBS, 80 µl abziehen
	Blocken	$80~\mu l$ TBS-Proclin $+$ 0,5 $\%$ BSA für 1 h bei I
	Peptide	80 µl abziehen, 20 µl/Vertiefung Blockierung peptid in TBS-Proclin für 30 min bei RT, n 60 µl TBS-Proclin auffüllen
	Waschen	5x TBST, 5x TBS, 80 µl abziehen
	Probe	20 µl/Vertiefung 100 nM 10% rot-markier HiLyte647-A $\beta_{42}$ Aggregate in TBS-Proclin Blockierungspeptide) für 1 h bei RT
	Waschen	5x TBS, 80 μl abziehen
	Messpuffer	80 µl/Vertiefung TBS-Proclin
	Technische Parameter	$50\times,300\mathrm{ms}$ bei $\lambda{=}653$ nm und Gain 300
	Experiment	Der Effekt von $A\beta_{14}$ und $A\beta_{15}$ auf die Fäng rantikörper Nab228 und 6E10 bei Präinkul tion oder permanenter Inkubation (Abb. 15
5	Fängerantikörper	2,5 µg/ml 6E10, 40 µl/ Vertiefung in 0,1 Carbonat über Nacht bei 4 °C
	Waschen	5x TBST, 5x TBS, 80 µl abziehen
	Blocken	80 µl TBS-Proclin + 0,5 % BSA für 1,5 h l $_{\rm RT}$
	Waschen	5x TBST, 5x TBS, 80 µl abziehen
	Probe	20 µl/Vertiefung A $\beta_{42}$ -Seeds in TBS-Proc + 0,5 % BSA für 1 h bei RT
	Waschen	5x TBS, 80 µl abziehen
	Peptide	<ul> <li>80 μl abziehen, 20 μl/Vertiefung 1 μM Block rungspeptid in TBS-Proclin, 30 min, RT, n</li> <li>60 μl TBS-Proclin auffüllen und 80 μl abne men</li> </ul>
	Substrat	20 µl/Vertiefung 100 nM A $\beta_{42}$ Substrat, dav 10% rot-markiertes HiLyte647-A $\beta_{42}$ in TE Proclin, ca. 21 h bei RT
	Technische Parameter	$50\times,200\mathrm{ms}$ bei $\lambda{=}653$ nm und Gain $50$
	Experiment	Amplifikation im sFIDA unter Verwendu der Blockierungspeptide $A\beta_{14}$ und $A\beta_{15}$ f den 6E10 Eöngenentikörner (Abb. 16)

Protokollnr.	Assayschritt	Beschreibung
6	Fängerantikörper	$2,5~\mu\mathrm{g/ml}$ 6E10, 40 $\mu\mathrm{l/}$ Vertie fung in 0,1 M
		Carbonat über Nacht bei 4 °C
	Waschen	5x TBST, 5x TBS, 80 µl abziehen
	Blocken	80 µl TBS-Proclin + 0,5 % BSA für 1,5 h bei RT
	Waschen	5x TBST, 5x TBS, 80 µl abziehen
	Probe	20 µl/Vertiefung A $\beta_{42}$ -Seeds in TBS-Proclin 0,5 % BSA für 1 h bei RT
	Waschen	5x TBS, 80 µl abziehen
	Substrat	$20 \ \mu$ l/Vertiefung 100 nM A $\beta_{42}$ Substrat, davon 10% rot-markiertes HiLyte647-A $\beta_{42}$ in TBS-Proclin $\pm 1\%$ BSA, ca. 20 h bei RT
	Waschen	5x TBS, 80 µl abziehen
	Messpuffer	80 µl/Vertiefung TBS-Proclin
	Technische Parameter	$40\times,500\mathrm{ms}$ bei $\lambda{=}653$ nm und Gain 100
	Experiment	Einfluss von BSA bei der Amplifikation (Abb. 17)
7	Fängerantikörper	2,5 µg/ml 6E10, 40 µl/ Vertiefung in 0,1 M Carbonat über Nacht bei 4 °C
	Waschen	5x TBST, 5x TBS, 80 µl abziehen
	Blocken	80 µl TBS-Proclin + 0,5 % BSA für 1,5 h bei RT
	Waschen	5x TBST, 5x TBS, 80 µl abziehen
	Probe	$\begin{array}{cccc} 20 & \mu l/Vertiefung & 10\% & rot-markierte \\ HiLyte647-A\beta_{42} & -Seeds & in & TBS-Proclin \\ 0.5\% & BSA & für 2h & bei & RT \end{array}$
	Waschen	$+60\mu$ l TBS, 80 $\mu$ l abziehen
	Substrat	20 µl/Vertiefung A $\beta_{11-42}$ -Substrat in TBS- Proclin, ca. 24 h bei RT
	Waschen	5x TBS, 80 µl abziehen
	Detektionsantikörper	20 µl/Vertiefung 0,31 µg/ml 4G8-CF488A in TBS für 1 h bei RT
	Waschen	5x TBS, 80 µl abziehen
	Messpuffer	80 µl/Vertiefung TBS-Proclin
	Technische Parameter	$50 \times$ , 300 ms bei $\lambda = 653$ nm und Gain 50 und 500 ms bei $\lambda = 493$ nm und Gain 50
	Experiment	Kriterien des A $\beta_{11-42}$ -Substrats (Abb. ??) & Amplifikation von A $\beta_{42}$ -Seeds mittels A $\beta_{11-42}$ -Substrat im sFIDA (Abb. 20)

Protokollnr.	Assayschritt	Beschreibung
8	Fängerantikörper	2,5 µg/ml 6E10, 40 µl/ Vertiefung in 0,1 M Carbonat über Nacht bei 4 $^\circ\mathrm{C}$
	Waschen	5x TBST, 5x TBS, 80 µl abziehen
	Blocken	80 µl Blockierlösung (BSA, Milchpulverlösung oder kommerziell erworbene) für 1,5 h bei RT
	Waschen	5x TBST, 5x TBS, 80 µl abziehen
	Probe	20 µl/Vertiefung A $\beta_{11-42}$ -Oligomere in TBS- Proclin für 1 h bei RT
	Waschen	5x TBS, 80 µl abziehen
	Detektionsantikörper	20 µl/Vertiefung 0,31 µg/ml 4G8-CF488A in TBS für 1 h bei RT
	Waschen	5x TBS, 80 µl abziehen
	Messpuffer	80 µl/Vertiefung TBS-Proclin
	Technische Parameter	$50\times,500\mathrm{ms}$ bei $\lambda{=}493$ nm und Gain $50$
	Experiment	Untersuchung verschiedener Blockierlösung
		zur effektiven Oberflächenblockierung gegen $A\beta_{11-42}$ (Abb. 21)
9	Fängerantikörper	2,5 µg/ml 6E10, 40 µl/ Vertiefung in 0,1 M Carbonat über Nacht bei 4 °C
	Waschen	5x TBST, 5x TBS, 80 µl abziehen
	Blocken	80 µl TBS-Proclin + 0,5 % BSA für 1,5 h bei RT
	Waschen	5x TBST, 5x TBS, 80 µl abziehen
	Probe	20 µl/Vertiefung 10%rot-markierte A $\beta_{42}$ - Seeds in TBS-Proclin + 0,5% BSA für 1 h bei RT
	Waschen	5x TBS, 80 µl abziehen
	Substrat	20 µl/Vertiefung 100 nM A $\beta_{11-42}$ -Substrat, da-
		von 10% grün-markiertes HiLyte647-A $\beta_{42}$ in TBS-Proclin ca. 20h bei BT
	Waschen	5x TBS 80 ul abziehen
	Messpuffer	80 ul/Vertiefung TBS-Proclin
	Technische Parameter	$50 \times, 600 \text{ ms bei } \lambda = 653 \text{ nm und Gain 100 und}$ $600 \text{ ms bei } \lambda = 493 \text{ nm und Gain 50}$
	Experiment	Amplifikation auf der mit BSA- oder Milchpulver-blockierten sFIDA-Oberfläche (Abb. 22)

Protokollnr.	Assayschritt	Beschreibung
10	Fängerantikörper	$2.5~\mu\mathrm{g/ml}$ 6E10, 40 $\mu\mathrm{l/}$ Vertie fung in 0,1 M
		Carbonat über Nacht bei 4 °C
	Waschen	5x TBST, 5x TBS, 80 µl abziehen
	Blocken	80 µl TBS-Proclin $+$ 0,5 % BSA für 1,5 h bei
		RT
	Waschen	5x TBST, 5x TBS, 80 µl abziehen
	Probe	20  µl/Vertiefung der mit $10%$ grün- markierten A $\beta_{11-42}$ -amplifizierten Seeds ( $10\%$ rot-markiert) in TBS-Proclin für 1 h bei RT
	Waschen	5x TBS, 80 µl abziehen
	Messpuffer	80 µl/Vertiefung TBS-Proclin
	Technische Parameter	$50 \times$ , 600 ms bei $\lambda = 635$ nm und Gain 100 und 600 ms bei $\lambda = 493$ nm und Gain 50
	Experiment	Amplifikation von $A\beta_{42}$ -Seeds in Lösung mittels $A\beta_{11-42}$ -Substrat und anschließendes sFIDA-Experiment (Abb. 23)
11	Fängerantikörper	7,5 µg/ml 211, 40 µl/ Vertiefung in PBS über Nacht bei 4 °C
	Waschen	5x TBST, 5x TBS, 80 µl abziehen
	Blocken	80 µl TBS-Proclin + 0,5 % BSA für 1,5 h bei RT
	Waschen	5x TBST, 5x TBS, 80 µl abziehen
	Probe	20 µl/Vertiefung 1% grün-markierte $\alpha$ -Syn- Seeds in TBS-Proclin + 0,5% BSA +0,05% Tween für 1 h bei RT
	Waschen	5x TBS, 80 µl abziehen
	Substrat	20 µl/Vertiefung 10 µM $\alpha$ -Syn-Substrat, davon 1 % rot-markiert HiLyte647-A $\beta_{42}$ in 50 mM Tris pH 7,5 mit 0,03 % Proclin, 4 Tage bei 37°C
	Waschen	5x TBS, 80 µl abziehen
	Messpuffer	80 µl/Vertiefung TBS-Proclin
	Technische Parameter	$50 \times$ , 300 ms bei $\lambda = 653$ nm und Gain 10 und 500 ms bei $\lambda = 493$ nm und Gain 500
	Experiment	Ermittlung der Inkubationsdauer für die $\alpha$ -Syn-Amplifikation durch die Beobachtung des Aggregationsverlaufs mittels ThT und Visualisierung der Amplifikation im sFIDA-Assay (Abb. 26)

Protokollnr.	Assayschritt	Beschreibung
12	Fängerantikörper	2,5 µg/ml Nab 228, 40 µl/ Vertiefung in 0,1 M Carbonat über Nacht be i $4\ ^\circ \mathrm{C}$
	Waschen	5x TBST, 5x TBS, 80 µl abziehen
	Blocken	$\frac{80 \ \mu l}{\mathrm{RT}}$ TBS-Proclin $+$ 0,5 % BSA für 1,5 h bei RT
	Waschen	5x TBST, 5x TBS, 80 µl abziehen
	Probe	$\begin{array}{l} 20 \ \mu\text{l/Vertiefung in PBS-Proclin} + 0.5 \ \% \ \text{BSA} \\ + 0.05 \ \% \ \text{Tween für } 2 \ \text{h bei } \ \text{RT} \end{array}$
	Waschen	5x TBS, 80 µl abziehen
	Substrat	20 µl/Vertiefung Substrat für ca. 20 h bei RT (Das Substrat ggfs. vorher in Lösung mit Seeds inkubieren und als Probe auftragen)
	Waschen	5x TBS, 80 µl abziehen
	Detektionsantikörper	20 µl/Vertiefung 6E10-AF488 0,625 µg/ml + ggfs. Nab228-CF633 0,156 µg/ml in TBS-T + 0,1 % BSA für 1h RT
	Waschen	5x TBS, 80 µl abziehen
	Messpuffer	80 µl/Vertiefung TBS-Proclin
	Technische Parameter	$50 \times$ , $500 \text{ ms}$ bei $\lambda = 635 \text{ nm}$ und Gain 10 und $400 \text{ ms}$ bei $\lambda = 493 \text{ nm}$ und Gain 5
	Experiment	Optimierung der A $\beta$ -Amplifikation bei pH 7,5 oder 8 und 5 $\mu$ M A $\beta$ -Substra (Abb. 29) & Optimierung der A $\beta$ -Amplifikation in Lösung mit unkonjugiertem oder 1% Fluorochrom- konjugiertem Substrat (Abb. 32)
13	Fängerantikörper	7,5 µg/ml 211, 40 µl/ Vertiefung in 0,1 M Carbonat über Nacht bei 4 °C
	Waschen	5x TBST, 5x TBS, 80 µl abziehen
	Blocken	80 µl TBS-Proclin + 0,5 % BSA für 1,5 h bei RT
	Waschen	5x TBST, 5x TBS, 80 µl abziehen
	Probe	20 µl/Vertiefung in PBS-Proclin + 1 % BSA + 0,05 % Tween für 2 h bei RT
	Waschen	5x TBS, 80 µl abziehen
	Substrat	20 µl/Vertiefung Substrat für ca. 20 h bei 37°C(Das Substrat ggfs. vorher in Lösung mit Seeds inkubieren und als Probe auftragen)
	Waschen	5x TBS, 80 µl abziehen
	Detektionsantikörper	20 µl/Vertiefung 0,625 µg/ml 4D6-CF488A + ggfs. 0,625 µg/ml 211-CF633 in TBS für 1h RT
	Waschen	5x TBS, 80 µl abziehen
	Messpuffer	80 µl/Vertiefung TBS-Proclin
	Technische Parameter	$50 \times$ , 500 ms bei $\lambda = 635$ nm und Gain 10 und 600 ms bei $\lambda = 493$ nm und Gain 100
	Experiment	Optimierung der $\alpha$ -Syn-Amplifikation bei pH 8 und 10 $\mu$ M $\alpha$ -Syn-Substrat (Abb. 28) & Op- timierung der $\alpha$ -Syn-Amplifikation in Lösung mit 10 $\mu$ M Substrat oder 5 $\mu$ M Substrat und 12,5 mM NaCl (Abb. 31)

Protokollnr.	Assayschritt	Beschreibung
14	Fängerantikörper	7,5 µg/ml 211, 40 µl/ Vertiefung in 0,1 M Car-
		bonat über Nacht bei 4 °C
	Waschen	5x TBST, 5x TBS, 80 µl abziehen
	Blocken	80 µl TBS-Proclin + $0.5\%$ BSA für $1.5$ h bei
		RT
	Waschen	5x TBST, 5x TBS, 80 µl abziehen
	Probe	20 µl/Vertiefung ggfs. nach PTA-Fällung 2 h
		bei RT
	Waschen	5x TBS, 80 µl abziehen
	Substrat	20 µl/Vertiefung 10 textmu M Substrat (1 $\%$
		rot-markiert, $1\%$ grün-markiert) in $50\mathrm{mM}$
		Tris, pH 8 für 4 Tage bei 37°C
	Waschen	5x TBS, 80 µl abziehen
	Messpuffer	80 µl/Vertiefung TBS-Proclin
	Technische Parameter	$100\times,300\mathrm{ms}$ bei $\lambda{=}635\mathrm{nm}$ und Gain 10 und
		$600\mathrm{ms}$ bei $\lambda{=}493\mathrm{nm}$ und Gain $500$
	Experiment	Amplifikation von $\alpha$ -Syn-Seeds aus TgM83 <sup>+/-</sup> -
		Hirnhomogenat (Abb. 33)



Abb. 39: Amplifikation von A $\beta_{42}$ -Seeds mittels A $\beta_{11-42}$ -Substrat im sFIDA

Das Signal des grünen Fluoreszenzkanals erfolgte durch einen CF488A-konjugierten 4G8-Antikörper. Die Ko-Lokalisation wurde durch die Überlagerung der Signale aus beiden Fluoreszenzkanälen generiert. CutOff = 0,1 % der jeweiligen Kontrolle ohne Seeds. Vergleich der Seed-Konzentrationsreihe mit der Amplifikation der Seeds durch 100 oder 1.000 nM A $\beta_{11-42}$ -Substrat. Signalunterschiede sind durch Balkendiagramme des grünen Fluoreszenzkanals (links) und der Ko-Lokalisation (rechts) dargestellt. FK = Fängerantikörperkontrolle, die keinen Fängerantikörper beinhaltet.



Abb. 40: pH-Optimierung bei 37°C für die A $\beta_{42}$ -Amplifikation durch A $\beta_{11-42}$  in An- und Abwesenheit von 150 mM NaCl

Aggregationsverlauf von 1  $\mu$ M A $\beta_{11-42}$  in Abwesenheit (braun) oder in Anwesenheit von 10 (grün) oder 100 nM (blau) A $\beta_{42}$ -Seeds mittels ThT-Fluoreszenzfarbstoff. Unterschiedliche pH-Werte der 40 mM Tris-HCl-Puffer im Bereich von pH 7-8,5 in (A) Abwesenheit von NaCl oder (B) + 150 mM NaCl. Die Aggregationskurven wurden auf die Werte 0 und 1 normalisiert und anschließend mit einem gleitenden Mittelwert von einem Datenfenster von 5 aufeinanderfolgenden Werten geglättet. n = 2.



Abb. 41: Optimierung des pH-Wertes und der Temperatur für die Amplifikation von A $\beta_{42}$ -Seeds durch A $\beta_{11-42}$ -Substrat in Lösung

Aggregationsverlauf von 5  $\mu$ M A $\beta_{11-42}$  bei pH 7; 7,5 und 8 (in den Diagrammen von links nach rechts zu betrachten) bei Temperaturen von 37°C; 30°C oder 25°C (von oben nach unten dargestellt). Die hinzugegebenen Seedkonzentrationen sind 1, 10 oder 100 nM im Farbgradienten von grün bis blau oder 0 nM für die Kontrolle (braun). Die Daten wurden auf die Werte 0 und 1 normalisiert und anschließend gemittelt. Darstellung der Mittelwerte der Triplikate (n=3) + Standardabweichung.



Abb. 42: Ko-Aggregation von monomerem  $A\beta_{11-42}$  und  $A\beta_{42}$ 

(A) Ko-Aggregation von  $A\beta_{11-42}$  und  $A\beta_{42}$  in PBS bei 37°C. (B) Aggregation der  $A\beta_{42}$ -Kontrollen in Abwesenheit von  $A\beta_{42}$ . Die Werte wurden mit einem gleitenden Mittelwert von einem Datenfenster von 5 aufeinanderfolgenden Werten geglättet. n = 3.



Abb. 43: Spontane Aggregation von  $5\,\mu\text{M}$  A $\beta_{42}$  bei pH 7-9

 $5 \mu M A\beta_{42}$  in Tris bei unterschiedlichen pH-Werten und  $37 \,^{\circ}C.Die$  Messung erfolgte in Triplikaten n = 3. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung.



Abb. 44: Vergleich zweier A $\beta_{42}$ -Konzentrationsreihen im Plattenlesegerät und sFIDA

(A)ThT-Fluoreszenzsignal einer  $A\beta_{42}$ -Seedkonzentrationsreihe gemessen in einer 96er Mikrotiterplatte am BMG CLARIOstar Platereader mit unterschiedlichen Gain-Einstellungen. 100 µl Seeds, 100 fM-100 nM in PBS + 3 µM ThT. Standardabweichung aus drei Messungen einer Probe. (B) ThT-Fluoreszenzsignal der Konzentrationsreihe bei einem Gain von 2.000. (C) Vergleich des Signal-Rausch-Verhältnisses der gemessenen Seedkonzentrationsreihe im Plattenlesegerät und sFIDA. Die Seeds für den sFIDA-Assay waren 10 % mit dem Fluorochrom HiLyte647 konjugiert und wurden zusätzlich durch einen 4G8-CF488A-konjugierten Antikörper detektiert. Dargestellt ist das ko-lokalisierte Signal. Datensatz aus 20B. Das Signal wurde durch das Rauschen der Kontrolle (K) ohne Seeds ins Verhältnis gesetzt.



Abb. 45: Amplifikation von A $\beta_{42}$ -Seeds mit A $\beta_{11-42}$ -Substrat bei pH 8 und 25°C für 8 h.

(A) Analyse des roten Fluoreszenzkanals mit 10 % HiLyte647-konjugierten A $\beta_{42}$ -Seeds. Balkendiagramm der Pixelanzahl einer Seedkonzentrationsreihe bei einem CutOff von 0,1% mit Beispielbildern der Kontrolle ohne Seeds und 1.000 pM Seeds. (B) Analyse des grünen Fluoreszenzkanals mit 5 µM 10 % HiLyte488-konjugiertem A $\beta_{11-42}$ -Substrat. Balkendiagramm der Pixelanzahl einer Seedkonzentrationsreihe bei einem CutOff von 0,1% mit Beispielbildern der Kontrolle ohne Seeds und 1.000 pM Seeds. Unregelmäßiges Amplifikationsereignis eines Seeds wird durch dunkelgrünen Partikel im Beispielbild gekennzeichnet.

## Literaturverzeichnis

- [1] Franziska Henke. Nachweis einzelner krankheits-assoziierter Proteinaggregate als diagnostische Methode für Prionkrankheiten. Düsseldorf, univ., diss., 2009, 2009.
- [2] Matteo Bordoni, Eveljn Scarian, Federica Rey, Stella Gagliardi, Stephana Carelli, Orietta Pansarasa, and Cristina Cereda. Biomaterials in neurodegenerative disorders: A promising therapeutic approach. *International journal of molecular sciences*, 21(9), 2020.
- [3] Brittany N. Dugger and Dennis W. Dickson. Pathology of neurodegenerative diseases. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 9(7), 2017.
- [4] Johannes Brettschneider, Kelly Del Tredici, Virginia M-Y Lee, and John Q. Trojanowski. Spreading of pathology in neurodegenerative diseases: a focus on human studies. *Nature reviews. Neuroscience*, 16(2):109–120, 2015.
- [5] Melanie D. Sweeney, Kassandra Kisler, Axel Montagne, Arthur W. Toga, and Berislav V. Zlokovic. The role of brain vasculature in neurodegenerative disorders. *Nature neuroscience*, 21(10):1318–1331, 2018.
- [6] World Health Organization. Dementia: Key facts, 2021.
- [7] Frank M. LaFerla, Kim N. Green, and Salvatore Oddo. Intracellular amyloid-beta in alzheimer's disease. *Nature reviews. Neuroscience*, 8(7):499–509, 2007.
- [8] Dominic M. Walsh and Dennis J. Selkoe. A beta oligomers a decade of discovery. Journal of neurochemistry, 101(5):1172–1184, 2007.
- [9] Martin Tolar, Susan Abushakra, and Marwan Sabbagh. The path forward in alzheimer's disease therapeutics: Reevaluating the amyloid cascade hypothesis. Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association, 16(11):1553–1560, 2020.
- [10] Lary C. Walker. Prion-like mechanisms in alzheimer disease. Handbook of clinical neurology, 153:303–319, 2018.
- [11] Robin Roychaudhuri, Mingfeng Yang, Minako M. Hoshi, and David B. Teplow. Amyloid beta-protein assembly and alzheimer disease. *The Journal of biological chemistry*, 284(8):4749–4753, 2009.
- [12] G. P. Saborio, B. Permanne, and C. Soto. Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature*, 411(6839):810–813, 2001.
- [13] Jan Stöhr, Nicole Weinmann, Holger Wille, Tina Kaimann, Luitgard Nagel-Steger, Eva Birkmann, Giannantonio Panza, Stanley B. Prusiner, Manfred Eigen, and Detlev Riesner. Mechanisms of prion protein assembly into amyloid. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105(7):2409–2414, 2008.
- [14] Alzheimer Forschung Initiative e.V. Wann ist es alzheimer? diagnose der alzheimerkrankheit. 2022.

- [15] Alzheimer Forschung Initiative e.V. Alzheimer-diagnose, 2021.
- [16] Paul S. Aisen, Gustavo A. Jimenez-Maggiora, Michael S. Rafii, Sarah Walter, and Rema Raman. Early-stage alzheimer disease: getting trial-ready. *Nature reviews*. *Neurology*, 2022.
- [17] Anita Pras and Ellen A. A. Nollen. Regulation of age-related protein toxicity. Frontiers in cell and developmental biology, 9:637084, 2021.
- [18] Clifford R. Jack, David S. Knopman, William J. Jagust, Leslie M. Shaw, Paul S. Aisen, Michael W. Weiner, Ronald C. Petersen, and John Q. Trojanowski. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the alzheimer's pathological cascade. *The Lancet Neurology*, 9(1):119–128, 2010.
- [19] Reisa A. Sperling, Paul S. Aisen, Laurel A. Beckett, David A. Bennett, Suzanne Craft, Anne M. Fagan, Takeshi Iwatsubo, Clifford R. Jack, Jeffrey Kaye, Thomas J. Montine, Denise C. Park, Eric M. Reiman, Christopher C. Rowe, Eric Siemers, Yaakov Stern, Kristine Yaffe, Maria C. Carrillo, Bill Thies, Marcelle Morrison-Bogorad, Molly V. Wagster, and Creighton H. Phelps. Toward defining the preclinical stages of alzheimer's disease: recommendations from the national institute on aging-alzheimer's association workgroups on diagnostic guidelines for alzheimer's disease. Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association, 7(3):280–292, 2011.
- [20] Anne M. Fagan, Mark A. Mintun, Robert H. Mach, Sang-Yoon Lee, Carmen S. Dence, Aarti R. Shah, Gina N. LaRossa, Michael L. Spinner, William E. Klunk, Chester A. Mathis, Steven T. DeKosky, John C. Morris, and David M. Holtzman. Inverse relation between in vivo amyloid imaging load and cerebrospinal fluid abe-ta42 in humans. Annals of neurology, 59(3):512–519, 2006.
- [21] Emma Lawrence, Carolin Vegvari, Alison Ower, Christoforos Hadjichrysanthou, Frank de Wolf, and Roy M. Anderson. A systematic review of longitudinal studies which measure alzheimer's disease biomarkers. *Journal of Alzheimer's disease* : JAD, 59(4):1359–1379, 2017.
- [22] Alireza Atri. The alzheimer's disease clinical spectrum: Diagnosis and management. The Medical clinics of North America, 103(2):263–293, 2019.
- [23] Kaj Blennow and Henrik Zetterberg. The past and the future of alzheimer's disease fluid biomarkers. Journal of Alzheimer's disease : JAD, 62(3):1125–1140, 2018.
- [24] Clifford R. Jack, David A. Bennett, Kaj Blennow, Maria C. Carrillo, Billy Dunn, Samantha Budd Haeberlein, David M. Holtzman, William Jagust, Frank Jessen, Jason Karlawish, Enchi Liu, Jose Luis Molinuevo, Thomas Montine, Creighton Phelps, Katherine P. Rankin, Christopher C. Rowe, Philip Scheltens, Eric Siemers, Heather M. Snyder, and Reisa Sperling. Nia-aa research framework: Toward a biological definition of alzheimer's disease. Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association, 14(4):535–562, 2018.
- [25] Klara Kulenkampff, Adriana-M. Wolf Perez, Pietro Sormanni, Johnny Habchi, and Michele Vendruscolo. Quantifying misfolded protein oligomers as drug targets and biomarkers in alzheimer and parkinson diseases. *Nature Reviews Chemistry*, 5(4):277–294, 2021.

- [26] Youtong Huang, Kaisa E. Happonen, Patrick G. Burrola, Carolyn O'Connor, Nasun Hah, Ling Huang, Axel Nimmerjahn, and Greg Lemke. Microglia use tam receptors to detect and engulf amyloid β plaques. *Nature immunology*, 22(5):586–594, 2021.
- [27] Maitrayee Sardar Sinha, Anna Ansell-Schultz, Livia Civitelli, Camilla Hildesjö, Max Larsson, Lars Lannfelt, Martin Ingelsson, and Martin Hallbeck. Alzheimer's disease pathology propagation by exosomes containing toxic amyloid-beta oligomers. Acta neuropathologica, 136(1):41–56, 2018.
- [28] Nivedita Agarwal and Roxana Octavia Carare. Cerebral vessels: An overview of anatomy, physiology, and role in the drainage of fluids and solutes. *Frontiers in neurology*, 11:611485, 2020.
- [29] Alexander J. Dear, Georg Meisl, Andela Šarić, Thomas C. T. Michaels, Magnus Kjaergaard, Sara Linse, and Tuomas P. J. Knowles. Identification of on- and offpathway oligomers in amyloid fibril formation. *Chemical science*, 11(24):6236–6247, 2020.
- [30] Sophie Combet, Fabrice Cousin, Human Rezaei, and Sylvie Noinville. Membrane interaction of off-pathway prion oligomers and lipid-induced on-pathway intermediates during prion conversion: A clue for neurotoxicity. *Biochimica et biophysica acta. Biomembranes*, 1861(2):514–523, 2019.
- [31] Eva Birkmann, Franziska Henke, Nicole Weinmann, Christian Dumpitak, Martin Groschup, Aileen Funke, Dieter Willbold, and Detlev Riesner. Counting of single prion particles bound to a capture-antibody surface (surface-fida). Veterinary microbiology, 123(4):294–304, 2007.
- [32] Andreas Kulawik, Henrike Heise, Christian Zafiu, Dieter Willbold, and Oliver Bannach. Advancements of the sfida method for oligomer-based diagnostics of neurodegenerative diseases. *FEBS letters*, 592(4):516–534, 2018.
- [33] Yvonne Herrmann, Andreas Kulawik, Katja Kühbach, Maren Hülsemann, Luriano Peters, Tuyen Bujnicki, Kateryna Kravchenko, Christina Linnartz, Johannes Willbold, Christian Zafiu, Oliver Bannach, and Dieter Willbold. sfida automation yields sub-femtomolar limit of detection for aβ aggregates in body fluids. *Clinical biochemistry*, 50(4-5):244–247, 2017.
- [34] Y. M. Kuo, T. A. Kokjohn, W. Kalback, D. Luehrs, D. R. Galasko, N. Chevallier, E. H. Koo, M. R. Emmerling, and A. E. Roher. Amyloid-beta peptides interact with plasma proteins and erythrocytes: implications for their quantitation in plasma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 268(3):750–756, 2000.
- [35] Oliver Bannach, Eva Birkmann, Elke Reinartz, Karl-Erich Jaeger, Jan P. M. Langeveld, Robert G. Rohwer, Luisa Gregori, Linda A. Terry, Dieter Willbold, and Detlev Riesner. Detection of prion protein particles in blood plasma of scrapie infected sheep. *PloS one*, 7(5):e36620, 2012.
- [36] Lei Wang-Dietrich, Susanne Aileen Funke, Katja Kühbach, Kun Wang, Astrid Besmehn, Sabine Willbold, Yeliz Cinar, Oliver Bannach, Eva Birkmann, and Dieter Willbold. The amyloid-β oligomer count in cerebrospinal fluid is a biomarker for alzheimer's disease. Journal of Alzheimer's disease : JAD, 34(4):985–994, 2013.
- [37] Lara Blömeke, Marlene Pils, Victoria Kraemer-Schulien, Alexandra Dybala, Anja Schaffrath, Andreas Kulawik, Fabian Rehn, Anneliese Cousin, Volker Nischwitz, Johannes Willbold, Rebecca Zack, Thomas F. Tropea, Tuyen Bujnicki, Gültekin Tamgüney, Daniel Weintraub, David Irwin, Murray Grossman, David A. Wolk, John Q.

Trojanowski, Oliver Bannach, Alice Chen-Plotkin, and Dieter Willbold. Quantitative detection of  $\alpha$ -synuclein and tau oligomers and other aggregates by digital single particle counting. *NPJ Parkinson's disease*, 8(1):68, 2022.

- [38] Serena Singh and Mari L. DeMarco. In vitro conversion assays diagnostic for neurodegenerative proteinopathies. *The journal of applied laboratory medicine*, 5(1):142– 157, 2020.
- [39] Werner Buselmaier. Prionen. In Werner Buselmaier, editor, Biologie für Mediziner, Springer-Lehrbuch, pages 373–375. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2015.
- [40] M. Pitschke, R. Prior, M. Haupt, and D. Riesner. Detection of single amyloid betaprotein aggregates in the cerebrospinal fluid of alzheimer's patients by fluorescence correlation spectroscopy. *Nature medicine*, 4(7):832–834, 1998.
- [41] Natalia Salvadores, Mohammad Shahnawaz, Elio Scarpini, Fabrizio Tagliavini, and Claudio Soto. Detection of misfolded aβ oligomers for sensitive biochemical diagnosis of alzheimer's disease. *Cell reports*, 7(1):261–268, 2014.
- [42] Seong Soo A. An, Byoung-Sub Lee, Ji Sun Yu, Kuntaek Lim, Gwang Je Kim, Ryan Lee, Shinwon Kim, Sungmin Kang, Young Ho Park, Min Jeong Wang, Young Soon Yang, Young Chul Youn, and SangYun Kim. Dynamic changes of oligomeric amyloid β levels in plasma induced by spiked synthetic aβ42. Alzheimer's research & therapy, 9(1):86, 2017.
- [43] Christopher M. Dobson, Andrej Šali, and Martin Karplus. Protein folding: A perspective from theory and experiment. Angewandte Chemie International Edition, 37(7):868–893, 1998.
- [44] F. Ulrich Hartl. Protein misfolding diseases. Annual review of biochemistry, 86:21– 26, 2017.
- [45] Fabrizio Chiti and Christopher M. Dobson. Protein misfolding, amyloid formation, and human disease: A summary of progress over the last decade. Annual review of biochemistry, 86:27–68, 2017.
- [46] Christopher J. Oldfield and A. Keith Dunker. Intrinsically disordered proteins and intrinsically disordered protein regions. *Annual review of biochemistry*, 83:553–584, 2014.
- [47] Guo-Fang Chen, Ting-Hai Xu, Yan Yan, Yu-Ren Zhou, Yi Jiang, Karsten Melcher, and H. Eric Xu. Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. Acta pharmacologica Sinica, 38(9):1205–1235, 2017.
- [48] Stella A. Polido, Janine Kamps, and Jörg Tatzelt. Biological functions of the intrinsically disordered n-terminal domain of the prion protein: A possible role of liquid-liquid phase separation. *Biomolecules*, 11(8), 2021.
- [49] Gregor P. Lotz and Justin Legleiter. The role of amyloidogenic protein oligomerization in neurodegenerative disease. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 91(6):653–664, 2013.
- [50] Philip Scheltens, Kaj Blennow, Monique M. B. Breteler, Bart de Strooper, Giovanni B. Frisoni, Stephen Salloway, and Wiesje Maria van der Flier. Alzheimer's disease. *The Lancet*, 388(10043):505–517, 2016.

- [51] Harry LeVine. Thioflavine t interaction with amyloid  $\beta$ -sheet structures. Amyloid, 2(1):1-6, 1995.
- [52] Hironobu Naiki, Keiichi Higuchi, Masanori Hosokawa, and Toshio Takeda. Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavine t. Analytical Biochemistry, 177(2):244–249, 1989.
- [53] Dana J. Levine, Jan Stöhr, Lillian E. Falese, Julian Ollesch, Holger Wille, Stanley B. Prusiner, and Jeffrey R. Long. Mechanism of scrapie prion precipitation with phosphotungstate anions. ACS chemical biology, 10(5):1269–1277, 2015.
- [54] Lei Zhang, James Song, Giorgio Cavigiolio, Brian Y. Ishida, Shengli Zhang, John P. Kane, Karl H. Weisgraber, Michael N. Oda, Kerry-Anne Rye, Henry J. Pownall, and Gang Ren. Morphology and structure of lipoproteins revealed by an optimized negative-staining protocol of electron microscopy. *Journal of lipid research*, 52(1):175–184, 2011.
- [55] Peter Niraj Nirmalraj, Jonathan List, Shayon Battacharya, Geoffrey Howe, Liang Xu, Damien Thompson, and Michael Mayer. Complete aggregation pathway of amyloid  $\beta$  (1-40) and (1-42) resolved on an atomically clean interface. *Science advances*, 6(15):eaaz6014, 2020.
- [56] Mercedes Novo, Sonia Freire, and Wajih Al-Soufi. Critical aggregation concentration for the formation of early amyloid-β (1-42) oligomers. *Scientific reports*, 8(1):1783, 2018.
- [57] Matthew Biancalana and Shohei Koide. Molecular mechanism of thioflavin-t binding to amyloid fibrils. *Biochimica et biophysica acta*, 1804(7):1405–1412, 2010.
- [58] H.-D. Haubeck. Avidität. In Axel M. Gressner and Torsten Arndt, editors, *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, Springer Reference Medizin, pages 392–393. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2019.
- [59] Wenjuan Wang, Xiaoyan Dong, and Yan Sun. Modification of serum albumin by high conversion of carboxyl to amino groups creates a potent inhibitor of amyloid β-protein fibrillogenesis. *Bioconjugate chemistry*, 30(5):1477–1488, 2019.
- [60] Karolin Klement, Karin Wieligmann, Jessica Meinhardt, Peter Hortschansky, Walter Richter, and Marcus Fändrich. Effect of different salt ions on the propensity of aggregation and on the structure of alzheimer's abeta(1-40) amyloid fibrils. *Journal* of molecular biology, 373(5):1321–1333, 2007.
- [61] Yuji Goto, Masayuki Adachi, Hiroya Muta, and Masatomo So. Salt-induced formations of partially folded intermediates and amyloid fibrils suggests a common underlying mechanism. *Biophysical reviews*, 10(2):493–502, 2018.
- [62] Koichi Wakabayashi, Kunikazu Tanji, Fumiaki Mori, and Hitoshi Takahashi. The lewy body in parkinson's disease: molecules implicated in the formation and degradation of alpha-synuclein aggregates. *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology*, 27(5):494–506, 2007.
- [63] Xiao-Yu Du, Xi-Xiu Xie, and Rui-Tian Liu. The role of α-synuclein oligomers in parkinson's disease. International journal of molecular sciences, 21(22), 2020.
- [64] Lorraine V. Kalia. Diagnostic biomarkers for parkinson's disease: focus on αsynuclein in cerebrospinal fluid. Parkinsonism & related disorders, 59:21–25, 2019.

- [65] Wolfgang Hoyer, Dmitry Cherny, Vinod Subramaniam, and Thomas M. Jovin. Impact of the acidic c-terminal region comprising amino acids 109-140 on alphasynuclein aggregation in vitro. *Biochemistry*, 43(51):16233-16242, 2004.
- [66] Shigeki Kobayashi, Yhuki Tanaka, Mituhiro Kiyono, Masahiro Chino, Toshiyuki Chikuma, Keiko Hoshi, and Hideaki Ikeshima. Dependence ph and proposed mechanism for aggregation of alzheimer's disease-related amyloid-β(1–42) protein. Journal of Molecular Structure, 1094:109–117, 2015.
- [67] Ann Tiiman, Jekaterina Krishtal, Peep Palumaa, and Vello Tõugu. In vitro fibrillization of alzheimer's amyloid-β peptide (1-42). AIP Advances, 5(9):092401, 2015.
- [68] Masihuz Zaman, Ejaz Ahmad, Atiyatul Qadeer, Gulam Rabbani, and Rizwan Hasan Khan. Nanoparticles in relation to peptide and protein aggregation. *International journal of nanomedicine*, 9:899–912, 2014.
- [69] Kseniia Afitska, Anna Fucikova, Volodymyr V. Shvadchak, and Dmytro A. Yushchenko. α-synuclein aggregation at low concentrations. *Biochimica et biophysica* acta. Proteins and proteomics, 1867(7-8):701-709, 2019.
- [70] Yeu Su and Pei-Teh Chang. Acidic ph promotes the formation of toxic fibrils from β-amyloid peptide. Brain Research, 893(1-2):287–291, 2001.
- [71] Marco Emanuele and Evelina Chieregatti. Mechanisms of alpha-synuclein action on neurotransmission: cell-autonomous and non-cell autonomous role. *Biomolecules*, 5(2):865–892, 2015.
- [72] Stephanie Lohmann, Maria E. Bernis, Babila J. Tachu, Alexandra Ziemski, Jessica Grigoletto, and Gültekin Tamgüney. Oral and intravenous transmission of αsynuclein fibrils to mice. Acta neuropathologica, 138(4):515–533, 2019.
- [73] Bettina Kass, Sarah Schemmert, Christian Zafiu, Marlene Pils, Oliver Bannach, Janine Kutzsche, Tuyen Bujnicki, and Dieter Willbold. Aβ oligomer concentration in mouse and human brain and its drug-induced reduction ex vivo. *Cell reports. Medicine*, 3(5):100630, 2022.
- [74] Alexander K. Buell. The growth of amyloid fibrils: rates and mechanisms. The Biochemical journal, 476(19):2677–2703, 2019.
- [75] Suman Nag, Bidyut Sarkar, Arkarup Bandyopadhyay, Bankanidhi Sahoo, Varun K. A. Sreenivasan, Mamata Kombrabail, Chandrakesan Muralidharan, and Sudipta Maiti. Nature of the amyloid-beta monomer and the monomer-oligomer equilibrium. *The Journal of biological chemistry*, 286(16):13827–13833, 2011.
- [76] Anja Leona Biere, Beth Ostaszewski, Evelyn R. Stimson, Bradley T. Hyman, John E. Maggio, and Dennis J. Selkoe. Amyloid β-peptide is transported on lipoproteins and albumin in human plasma. *The Journal of biological chemistry*, 271(51):32916–32922, 1996.
- [77] Helen F. Stanyon and John H. Viles. Human serum albumin can regulate amyloid-β peptide fiber growth in the brain interstitium: implications for alzheimer disease. *The Journal of biological chemistry*, 287(33):28163–28168, 2012.
- [78] B. Bohrmann, L. Tjernberg, P. Kuner, S. Poli, B. Levet-Trafit, J. Näslund, G. Richards, W. Huber, H. Döbeli, and C. Nordstedt. Endogenous proteins controlling
amyloid beta-peptide polymerization. possible implications for beta-amyloid formation in the central nervous system and in peripheral tissues. *The Journal of biological chemistry*, 274(23):15990–15995, 1999.

- [79] Kazuhiro Hasegawa, Kenjiro Ono, Masahito Yamada, and Hironobu Naiki. Kinetic modeling and determination of reaction constants of alzheimer's beta-amyloid fibril extension and dissociation using surface plasmon resonance. *Biochemistry*, 41(46):13489–13498, 2002.
- [80] Adriana A. Reyes Barcelo, Francisco J. Gonzalez-Velasquez, and Melissa A. Moss. Soluble aggregates of the amyloid-beta peptide are trapped by serum albumin to enhance amyloid-beta activation of endothelial cells. *Journal of biological engineering*, 3:5, 2009.
- [81] Julijana Milojevic, Annie Raditsis, and Giuseppe Melacini. Human serum albumin inhibits abeta fibrillization through a "monomer-competitor" mechanism. *Biophysi*cal journal, 97(9):2585–2594, 2009.
- [82] Julijana Milojevic and Giuseppe Melacini. Stoichiometry and affinity of the human serum albumin-alzheimer's aβ peptide interactions. *Biophysical journal*, 100(1):183– 192, 2011.
- [83] Risto Cukalevski, Xiaoting Yang, Georg Meisl, Ulrich Weininger, Katja Bernfur, Birgitta Frohm, Tuomas P. J. Knowles, and Sara Linse. The aβ40 and aβ42 peptides self-assemble into separate homomolecular fibrils in binary mixtures but cross-react during primary nucleation. *Chemical science*, 6(7):4215–4233, 2015.
- [84] Christopher P. Sullivan, Eric A. Berg, Rosemary Elliott-Bryant, Jordan B. Fishman, Ann C. McKee, Peter J. Morin, Michael A. Shia, and Richard E. Fine. Pyroglutamate-aβ 3 and 11 colocalize in amyloid plaques in alzheimer's disease cerebral cortex with pyroglutamate-aβ 11 forming the central core. *Neuroscience letters*, 505(2):109–112, 2011.
- [85] Joseph D. Barritt, Nadine D. Younan, and John H. Viles. N-terminally truncated amyloid-β(11-40/42) cofibrillizes with its full-length counterpart: Implications for alzheimer's disease. Angewandte Chemie (International ed. in English), 56(33):9816– 9819, 2017.
- [86] The Immunoassay Handbook. Elsevier, 2013.
- [87] Natalie J. Galant, Antoinette Bugyei-Twum, Rishi Rakhit, Patrick Walsh, Simon Sharpe, Pharhad Eli Arslan, Per Westermark, Jeffrey N. Higaki, Ronald Torres, José Tapia, and Avijit Chakrabartty. Substoichiometric inhibition of transthyretin misfolding by immune-targeting sparsely populated misfolding intermediates: a potential diagnostic and therapeutic for ttr amyloidoses. *Scientific reports*, 6:25080, 2016.
- [88] Botond Penke, Mária Szűcs, and Ferenc Bogár. Oligomerization and conformational change turn monomeric β-amyloid and tau proteins toxic: Their role in alzheimer's pathogenesis. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(7), 2020.
- [89] Protein-ligand-wechselwirkungen als grundlage der arzneistoffwirkung. In Gerhard Klebe, editor, Wirkstoffdesign, pages 49–67. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2009.

- [90] Meenakshi Verma, Abhishek Vats, and Vibha Taneja. Toxic species in amyloid disorders: Oligomers or mature fibrils. Annals of Indian Academy of Neurology, 18(2):138–145, 2015.
- [91] Tao Zhang, Thomas Pauly, and Luitgard Nagel-Steger. Stoichiometric zn2+ interferes with the self-association of aβ42: Insights from size distribution analysis. *International journal of biological macromolecules*, 113:631–639, 2018.
- [92] Min Zhu, Pierre O. Souillac, Cristian Ionescu-Zanetti, Sue A. Carter, and Anthony L. Fink. Surface-catalyzed amyloid fibril formation. *The Journal of biological chemistry*, 277(52):50914–50922, 2002.
- [93] Christian Beyschau Andersen, Hisashi Yagi, Mauro Manno, Vincenzo Martorana, Tadato Ban, Gunna Christiansen, Daniel Erik Otzen, Yuji Goto, and Christian Rischel. Branching in amyloid fibril growth. *Biophysical journal*, 96(4):1529–1536, 2009.
- [94] Tadato Ban, Masaru Hoshino, Satoshi Takahashi, Daizo Hamada, Kazuhiro Hasegawa, Hironobu Naiki, and Yuji Goto. Direct observation of abeta amyloid fibril growth and inhibition. *Journal of molecular biology*, 344(3):757–767, 2004.
- [95] Alexander K. Buell, Céline Galvagnion, Ricardo Gaspar, Emma Sparr, Michele Vendruscolo, Tuomas P. J. Knowles, Sara Linse, and Christopher M. Dobson. Solution conditions determine the relative importance of nucleation and growth processes in α-synuclein aggregation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 111(21):7671–7676, 2014.
- [96] Céline Galvagnion. The role of lipids interacting with α-synuclein in the pathogenesis of parkinson's disease. Journal of Parkinson's disease, 7(3):433–450, 2017.
- [97] Martijn E. van Raaij, Jeroen van Gestel, Ine M. J. Segers-Nolten, Simon W. de Leeuw, and Vinod Subramaniam. Concentration dependence of alpha-synuclein fibril length assessed by quantitative atomic force microscopy and statistical-mechanical theory. *Biophysical journal*, 95(10):4871–4878, 2008.
- [98] Dongjoon Im, Chae Eun Heo, Myung Kook Son, Chae Ri Park, Hugh I. Kim, and Jeong-Mo Choi. Kinetic modulation of amyloid-β (1-42) aggregation and toxicity by structure-based rational design. Journal of the American Chemical Society, 144(4):1603–1611, 2022.
- [99] V. N. Uversky, J. Li, and A. L. Fink. Evidence for a partially folded intermediate in alpha-synuclein fibril formation. *The Journal of biological chemistry*, 276(14):10737– 10744, 2001.
- [100] Marie P. Schützmann, Filip Hasecke, Sarah Bachmann, Mara Zielinski, Sebastian Hänsch, Gunnar F. Schröder, Hans Zempel, and Wolfgang Hoyer. Endo-lysosomal aβ concentration and ph trigger formation of aβ oligomers that potently induce tau missorting. *Nature communications*, 12(1):4634, 2021.
- [101] Lothar Gremer, Daniel Schölzel, Carla Schenk, Elke Reinartz, Jörg Labahn, Raimond B. G. Ravelli, Markus Tusche, Carmen Lopez-Iglesias, Wolfgang Hoyer, Henrike Heise, Dieter Willbold, and Gunnar F. Schröder. Fibril structure of amyloid-β(1-42) by cryo-electron microscopy. *Science (New York, N.Y.)*, 358(6359):116–119, 2017.

- [102] Ingrid M. van der Wateren, Tuomas P. J. Knowles, Alexander K. Buell, Christopher M. Dobson, and Céline Galvagnion. C-terminal truncation of α-synuclein promotes amyloid fibril amplification at physiological ph. *Chemical science*, 9(25):5506– 5516, 2018.
- [103] Jung-Youn Han, Hyung-Sup Jang, Alison J. E. Green, and Young Pyo Choi. Rtquic-based detection of alpha-synuclein seeding activity in brains of dementia with lewy body patients and of a transgenic mouse model of synucleinopathy. *Prion*, 14(1):88–94, 2020.
- [104] Graham Fairfoul, Lynne I. McGuire, Suvankar Pal, James W. Ironside, Juliane Neumann, Sharon Christie, Catherine Joachim, Margaret Esiri, Samuel G. Evetts, Michal Rolinski, Fahd Baig, Claudio Ruffmann, Richard Wade-Martins, Michele T. M. Hu, Laura Parkkinen, and Alison J. E. Green. Alpha-synuclein rt-quic in the csf of patients with alpha-synucleinopathies. Annals of clinical and translational neurology, 3(10):812–818, 2016.
- [105] Connor Bargar, Wen Wang, Steven A. Gunzler, Alexandra LeFevre, Zerui Wang, Alan J. Lerner, Neena Singh, Curtis Tatsuoka, Brian Appleby, Xiongwei Zhu, Rong Xu, Vahram Haroutunian, Wen-Quan Zou, Jiyan Ma, and Shu G. Chen. Streamlined alpha-synuclein rt-quic assay for various biospecimens in parkinson's disease and dementia with lewy bodies. Acta neuropathologica communications, 9(1):62, 2021.
- [106] Rafael Ramis, Joaquín Ortega-Castro, Bartolomé Vilanova, Miquel Adrover, and Juan Frau. Unraveling the nacl concentration effect on the first stages of α-synuclein aggregation. *Biomacromolecules*, 21(12):5200–5212, 2020.
- [107] Peter Faller and Christelle Hureau. Reproducibility problems of amyloid- $\beta$  self-assembly and how to deal with them. *Frontiers in chemistry*, 8:611227, 2020.
- [108] J. Li, V. N. Uversky, and A. L. Fink. Effect of familial parkinson's disease point mutations a30p and a53t on the structural properties, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. *Biochemistry*, 40(38):11604–11613, 2001.
- [109] Thibault Viennet, Michael M. Wördehoff, Boran Uluca, Chetan Poojari, Hamed Shaykhalishahi, Dieter Willbold, Birgit Strodel, Henrike Heise, Alexander K. Buell, Wolfgang Hoyer, and Manuel Etzkorn. Structural insights from lipid-bilayer nanodiscs link α-synuclein membrane-binding modes to amyloid fibril formation. Communications biology, 1:44, 2018.
- [110] Mara Zielinski, Christine Röder, and Gunnar F. Schröder. Challenges in sample preparation and structure determination of amyloids by cryo-em. *The Journal of biological chemistry*, 297(2):100938, 2021.